ADS DE CHIMIE

THÈME : LA CHITINE : RESSOURCES ET APPLICATIONS

- Temps de préparation : 2 h
- Temps de présentation devant le jury : 15 min
- Entretien avec le jury : 25 min

DOCUMENTS FOURNIS

Article n°1 : « Biocatalyse et oligosaccharides de chitine pour une agriculture plus verte », p 20 à 29, l'Actualité Chimique n°470, février 2022.

Article n°2 : « Les insectes, nouveaux chimistes au service de l'humanité », p 75 à 80, l'Actualité Chimique n°438-439, mars-avril 2019.

ANNEXE

Une classification périodique des éléments est fournie.

TRAVAIL À EFFECTUER

Présenter un exposé d'une quinzaine de minutes sur « la chitine : ressources et applications » en utilisant les textes fournis et en faisant appel à votre culture personnelle.

Biocatalyse et oligosaccharides de chitine pour une agriculture plus verte

Résumé La prolifération d'algues toxiques en Bretagne ainsi que les accidents industriels d'AZF à Toulouse et plus récemment du port de Beyrouth ont mis en lumière les dangers de l'utilisation massive d'engrais azotés en agriculture et l'urgence d'adopter des pratiques plus durables. Les plantes, qui au fil de l'évolution ont développé la capacité à assimiler les nutriments du sol et à se défendre contre des agents pathogènes, sont une source d'inspiration pour réduire les intrants (eaux, pesticides, fertilisants). La chitine, un polysaccharide azoté constitutif de la paroi des champignons et de la cuticule des insectes et crustacés, joue un rôle complexe et majeur chez les plantes. Afin de mieux comprendre et tirer avantage des mécanismes de perception de la chitine et de ses oligosaccharides par les plantes, il est indispensable de maîtriser la synthèse et la modification de ces molécules dont la chimie est particulièrement délicate. La biocatalyse est un précieux outil pour mener ce travail.

Mots-clés **Chitine, oligosaccharides, biocatalyse, agriculture durable.**

Abstract **Biocatalysis and chitin oligosaccharides for a greener agriculture**
The proliferation of toxic algae in Brittany as well as the industrial accidents of AZF in Toulouse and more recently of the port of Beirut have highlighted the hazards of the massive use of nitrogen fertilizers in agriculture and the urgency to adopt more sustainable practices. Plants, which have developed the ability to assimilate soil nutrients and defend themselves against pathogens, are a source of inspiration for reducing inputs (water, pesticides, and fertilizers). Chitin, a nitrogenous polysaccharide that forms the wall of fungi and the cuticle of insects and crustaceans, plays an intricate and major role in plants. In order to better understand and take advantage of chitin perception mechanisms by plants, it is essential to control the synthesis and modification of these molecules whose chemistry is particularly complex. Biocatalysis is a precious tool to carry out this work.

Keywords **Chitin, oligosaccharides, biocatalysis, sustainable agriculture.**

La *N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) est un sucre majeur dans la nature (*figure 1*). Présente chez les espèces animales comme végétales, la GlcNAc entre dans la composition des glycanes situés à la surface des cellules, ainsi que dans celle des polysaccharides structuraux tels que les glycosaminoglycanes (composants des matrices extracellulaires des tissus conjonctifs), le peptidoglycane (constituant de l'enveloppe bactérienne) et la chitine (principal élément de la cuticule des insectes et de la carapace des crustacés).

La chitine

La chitine, polymère d'unités GlcNAc liées entre elles par des liaisons glycosidiques β-1,4, est un polysaccharide très abondant sur Terre (*figure 1*). Elle assure un rôle structural au sein de la paroi cellulaire des crustacés, des insectes ou encore des champignons, et sa bioproduction annuelle est estimée à 10^{11} tonnes. Avec 6 à 8 millions de tonnes générées par an en tant que déchet de l'industrie de la pêche principalement en Asie, la chitine et ses dérivés possèdent un fort potentiel de valorisation dans le domaine des biomatériaux, celui de la santé ou encore en agriculture.

Les oligosaccharides de chitine

Les fragments solubles de chitine constitués de deux à dix unités GlcNAc, communément appelés oligosaccharides de chitine (CO), sont étudiés depuis le début des années 1990 pour leur activité élicitrice, c'est-à-dire de stimulation des défenses naturelles chez les plantes [1]. Dépourvus de chitine, les végétaux ont en effet développé des mécanismes de résistance basés sur la perception de fragments de ce polysaccharide qui compose majoritairement la paroi cellulaire de leurs pathogènes que sont les insectes et les champignons. Les CO à longue chaîne, c'est-à-dire ceux ayant au moins six unités GlcNAc consécutives, sont ainsi capables de déclencher une réponse immunitaire chez une grande variété d'espèces, le chitinoctaose (*figure 1*) étant le plus actif à ce jour. Les CO à courte chaîne, c'est-à-dire ceux comportant entre trois et cinq unités GlcNAc, présentent en revanche une activité biologique différente. Ils participent à la mise en place de symbioses entre des micro-organismes du sol (champignons et bactéries) et les plantes contribuant ainsi à leur croissance. Les lipochitinoligosaccharides (LCO)[(1)], une classe de glycolipides à base de CO à courte chaîne, sont les plus actifs dans la mise en place de ces symbioses [2] (*figure 1*).

Les lipochitinoligosaccharides

Les LCO sont produits par des bactéries et des champignons présents dans le sol. D'abord découverts chez les bactéries du genre rhizobium en 1990, les LCO ont été identifiés comme molécules clés dans l'établissement de la symbiose entre les plantes légumineuses et les bactéries fixatrices d'azote [3] (*figure 2*). Une symbiose est une association bénéfique pour les deux espèces. La bactérie s'associe avec la plante au niveau de son système racinaire, dans un nouvel organe appelé nodule, pour transformer l'azote atmosphérique en ammoniaque au profit de la plante. En échange, la plante fournit des composés carbonés pour le métabolisme de la bactérie. Il y a une dizaine d'années, il a été montré que les LCO interviennent également dans une autre symbiose entre des champignons endomycorhiziens et la quasi-totalité des plantes terrestres [4]. En permettant l'établissement de connexions

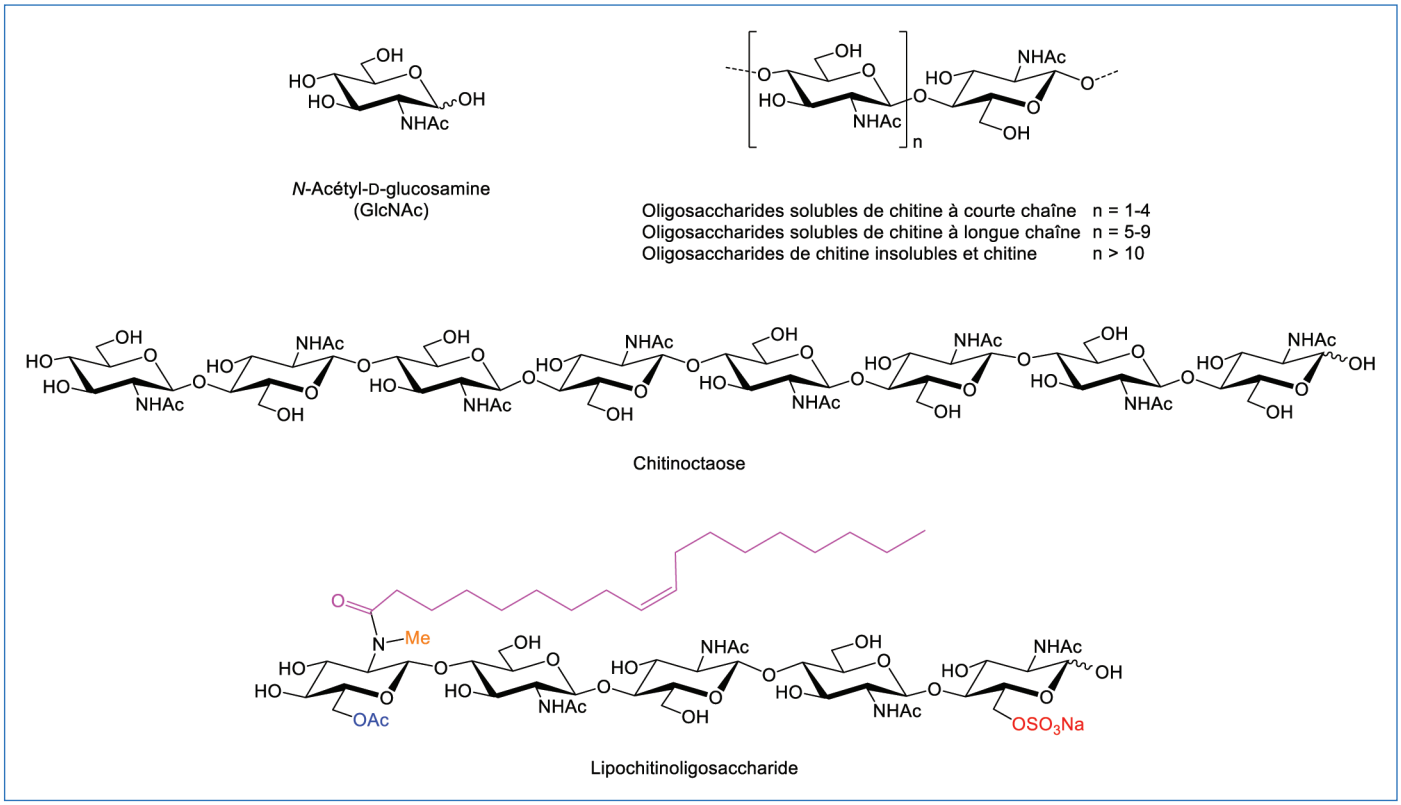


Figure 1 - Structure chimique des oligosaccharides de chitine et d'un lipochitinoligosaccharide.

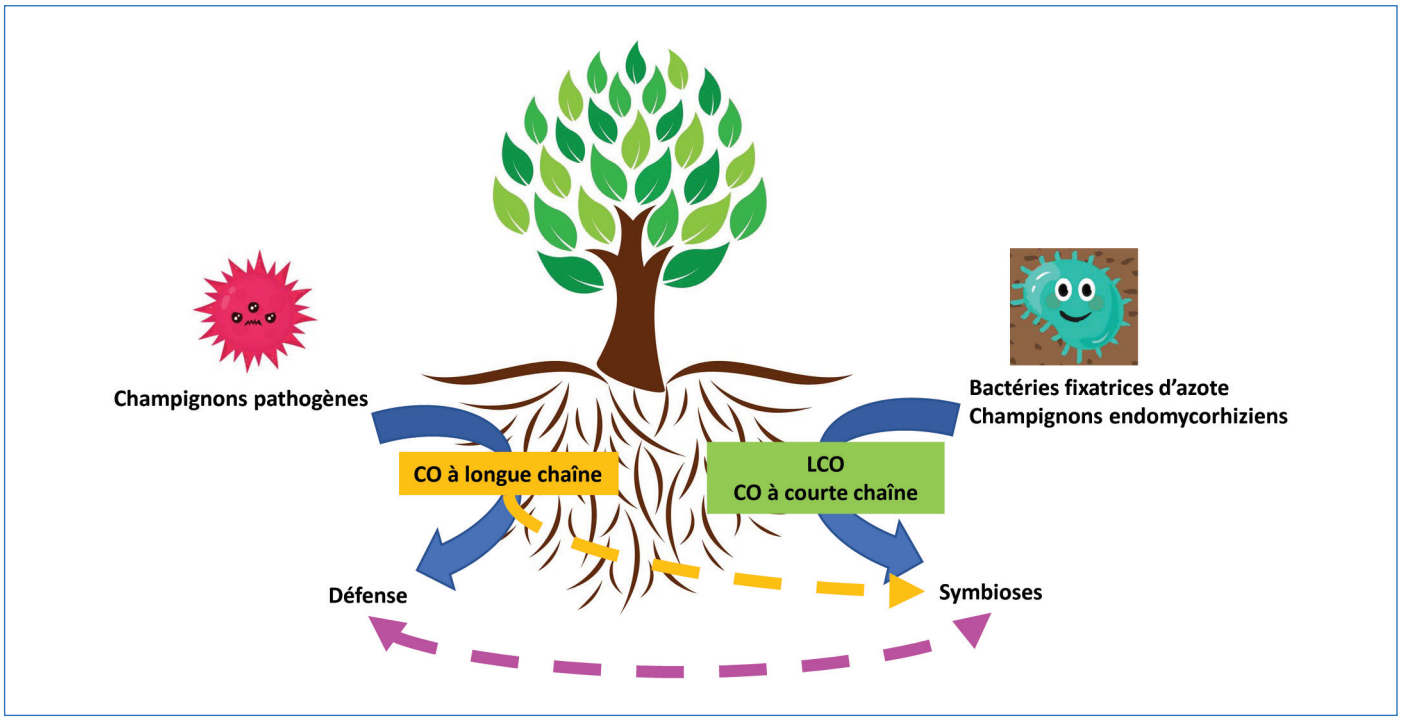


Figure 2 - Illustration des rôles joués par les oligosaccharides de chitine (CO) et les lipochitinoligosaccharides (LCO) dans les mécanismes de défense des plantes et les symbioses rhizobienne et endomycorhizienne[2]. Les flèches pleines indiquent les voies de signalisation caractérisées à ce jour et les flèches en pointillés celles pour lesquelles des questions persistent.

entre un réseau dense et étendu d'hyphes du champignon et les racines de la plante, les LCO favorisent sa croissance grâce à une meilleure assimilation de l'eau et des nutriments du sol comme le potassium. En 2020, une étude a démontré que les LCO n'étaient pas uniquement produits par des champignons symbiotiques mais qu'ils sont en réalité sécrétés par de nombreuses autres espèces fongiques [5]. Ce résultat soulève de nouvelles questions quant aux fonctions biologiques de ces molécules.

Perception des CO et LCO par les plantes

Les multiples propriétés biologiques des CO et LCO témoignent de mécanismes de perception de ces molécules extrêmement subtils et complexes. Qu'ils soient à courte ou longue chaîne, les CO ont en effet une capacité à créer chez les plantes des oscillations calciques (fluctuations de la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+}) caractéristiques des stades précoces des symbioses [6]. Les CO à longue chaîne,

activateurs des défenses immunitaires, pourraient ainsi agir en synergie avec les LCO. Mais alors comment les plantes font-elles la discrimination entre les signaux symbiotiques et ceux capables de déclencher leur système immunitaire ?
Une récente étude menée par un consortium international a permis de mettre en évidence pour la première fois les déterminants moléculaires de l'immunité et de la symbiose rhizobienne au sein des protéines de reconnaissance (récepteurs) des CO et LCO [7]. Quelques acides aminés seulement diffèrent entre un récepteur immunitaire et un récepteur symbiotique. Il a également été montré qu'il est possible de reprogrammer un récepteur de l'immunité en récepteur symbiotique en modifiant ces acides aminés (par mutation génétique contrôlée). En plus de contribuer à la compréhension des mécanismes de défense et de croissance des plantes à l'échelle moléculaire, ces travaux constituent une première étape pour transférer la capacité à enclencher une symbiose rhizobienne(2) chez d'autres types de plantes que les légumineuses, ouvrant ainsi des perspectives prometteuses pour le développement d'une agriculture plus durable grâce à une réduction des apports nécessaires en engrais azotés pour tous types de culture.

Les sondes moléculaires

La découverte et l'étude des récepteurs impliqués dans les symbioses et dans les mécanismes de défense chez les plantes requièrent de disposer de sondes moléculaires de grande pureté et de structure parfaitement définie. Une sonde moléculaire est généralement un dérivé synthétique du ligand(3) naturel étudié ou un analogue modifié avec un marqueur permettant sa visualisation dans un milieu biologique complexe (chromophore, fluorophore), un groupe chimique permettant d'optimiser l'interaction avec son partenaire biologique, ou encore une fonction réactive permettant de se lier à ce partenaire afin de l'isoler. Les propriétés biochimiques de cet analogue doivent être équivalentes à celles du ligand naturel. La synthèse des sondes dérivées de la chitine est un travail complexe et notre équipe s'est spécialisée dans ce domaine en développant des approches biotechnologiques et chimio-enzymatiques innovantes. Bien que la synthèse chimique présente l'avantage d'une grande adaptabilité, la préparation d'oligosaccharides nécessite un nombre très important d'étapes limitant généralement les rendements obtenus. Les enzymes, qu'elles aient pour fonction de synthétiser (glycosyltransférases) ou de dégrader les polysaccharides (glycoside hydrolases), agissent dans des conditions réactionnelles douces et permettent de s'affranchir des contraintes que sont l'utilisation de solvants organiques et de groupements protecteurs. La biocatalyse, à travers l'utilisation d'enzymes commerciales bon marché, de protéines recombinantes sauvages ou modifiées par mutagenèse dirigée, ou encore l'ingénierie de voies métaboliques chez la bactérie *E. coli*, offre de formidables opportunités pour la synthèse d'oligosaccharides de chitine.

Utilisation d'une enzyme commerciale non spécifique pour la production de CO

La chitine, du fait de sa cristallinité et de son insolubilité en milieu aqueux, est un polysaccharide récalcitrant à l'hydrolyse enzymatique. Les organismes chitinolytiques utilisent des « cocktails » associant plusieurs enzymes – chitinases, hexosaminidases et monooxygénases polysaccharidiques lytiques (LPMO) – qui sont nécessaires pour dépolymériser la chitine efficacement et il en résulte la formation de mono- et disaccharides majoritairement [8]. Du fait de la mauvaise expression de ces enzymes dans les systèmes bactériens utilisés pour la production de protéines en laboratoire, leur accessibilité est un frein pour la préparation de CO.
Afin de pallier ces problèmes, nous avons développé une voie de production utilisant une enzyme peu spécifique mais très accessible : le lysozyme du blanc d'œuf de poule (HEWL)(4). Le lysozyme est une glycoside hydrolase dont le substrat naturel est le peptidoglycane, un polysaccharide de la paroi cellulaire des bactéries également constitué de GlcNAc. Cette enzyme, peu coûteuse car extraite en grande quantité du blanc d'œuf, est utilisée comme agent antibactérien dans les industries pharmaceutique et alimentaire. Elle présente l'avantage d'agir sur la chitine lorsque celle-ci est partiellement désacétylée et devient soluble dans l'eau. Nous avons donc cherché à tirer avantage de cette propriété pour développer une nouvelle voie d'accès aux oligosaccharides de chitine, et notamment ceux à longue chaîne. Compte tenu du nombre important de paramètres à étudier pour optimiser cette réaction – le degré d'acétylation de la chitine, sa concentration ainsi que celle de l'enzyme, la température, la composition et le pH du milieu réactionnel, ou encore la durée d'hydrolyse –, un plan d'expérience a été mis en œuvre. Une série de réactions préliminaires a été réalisée afin de déterminer les paramètres les moins impactants sur le procédé. La composition du milieu réactionnel, la température et la quantité d'enzyme ont ainsi pu être fixées et trois variables ont été retenues : le degré d'acétylation de la chitine, sa concentration et la durée d'hydrolyse. Le choix de la méthode d'optimisation s'est porté vers un plan de Box-Behnken à dix-sept expériences [9]. Par rapport à d'autres, ce plan nécessite moins d'expériences et limite celles réalisées dans des conditions extrêmes, pour lesquelles des résultats insatisfaisants pourraient être obtenus. À l'issue de l'optimisation, la production de CO allant jusqu'au nonasaccharide a été réalisée avec un rendement de 52 % et une excellente reproductibilité (*figure 3*). Ces oligosaccharides, et notamment le chitinoctaose, ont permis de mener un ensemble d'études biologiques conduisant à des avancées significatives dans la compréhension des mécanismes de perception des CO par les plantes [6-7].

Transformation d'une enzyme hydrolytique en outil de synthèse

L'action d'une glycoside hydrolase sur un polysaccharide conduit généralement à la formation d'une population d'oligosaccharides sans contrôle de leur taille. Ces enzymes présentent parfois la capacité de catalyser des réactions de synthèse (transglycosylation(5)) en tant qu'activité secondaire. La préparation de CO grâce à l'activité de transglycosylation des chitinases ou des lysozymes sauvages a fait l'objet de nombreux travaux. L'obtention de CO à longue chaîne reste cependant difficile du fait de la rapide dégradation par l'enzyme des produits formés. La suppression de l'activité hydrolytique des hydrolases au profit de leur activité de transglycosylation est possible par mutagenèse dirigée. Ainsi les glycosynthases(6) sont des mutants dépourvus d'activité d'hydrolyse mais capables de catalyser des réactions de glycosylation à partir d'un donneur activé chimiquement par un groupe fonctionnel oxazoline ou un atome de fluor.

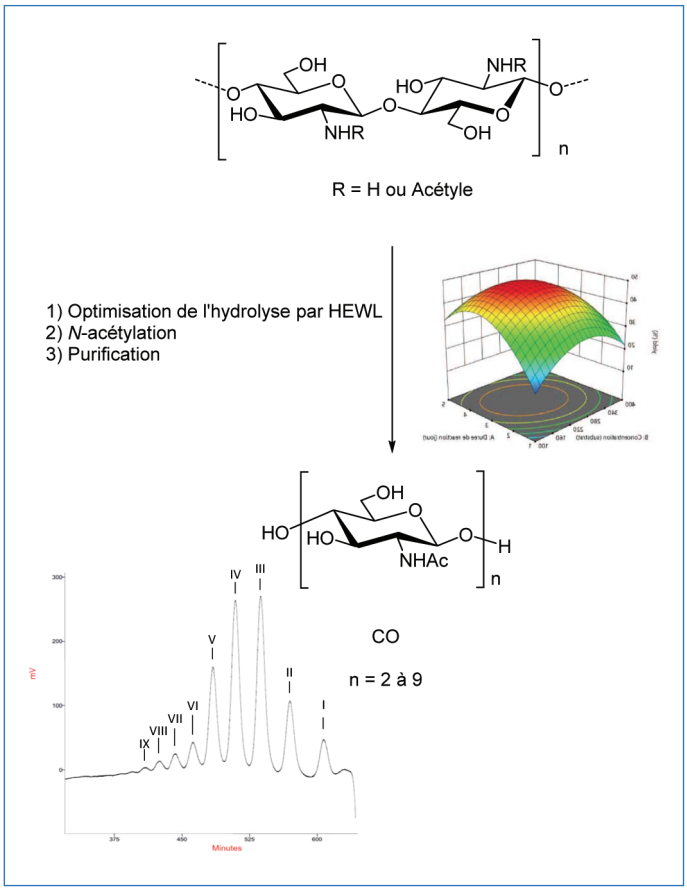


Figure 3 - Production d'oligosaccharides par dépolymérisation enzymatique de la chitine. L'hydrolyse enzymatique de chitine partiellement désacétylée par le lysozyme de blanc d'œuf de poule (HEWL) a été optimisée par un plan d'expérience afin de générer des oligosaccharides de tailles variées. Les CO ont été isolés par chromatographie d'exclusion stérique jusqu'au nonasaccharide après *N*-acétylation sélective des fonctions amines libres des oligosaccharides produits.

En présence d'une glycosynthase appropriée, ce donneur réagit sur lui-même pour conduire à la formation de néo-polysaccharides sans contrôle de leur taille. Lorsque le donneur est sélectivement protégé pour éviter sa polycondensation, il peut réagir sur un accepteur pour former un oligosaccharide de taille contrôlée.

Nous avons développé plusieurs glycosynthases dérivées de chitinases pour la synthèse de CO à longue chaîne. La réaction entre un accepteur et un donneur activé par une oxazoline et protégé par un galactose à son extrémité non réductrice[7] a conduit majoritairement à la formation de l'oligosaccharide escompté. Cependant, de façon inattendue, ces mutants de chitinases, bien qu'inaptes à l'hydrolyse, ont conservé la capacité de réaliser des réactions de transglycosylation sur des oligosaccharides dépourvus d'oxazoline. Le produit de la réaction peut donc être transformé par l'enzyme, conduisant malheureusement à un mélange d'oligosaccharides de tailles variables [10] (*figure 4*).

Devant la difficulté à obtenir des composés de taille parfaitement définie avec les chitinases mutées, nous avons transformé le lysozyme HEWL en glycosynthase. HEWL agit avec un mécanisme différent de celui des chitinases mettant en jeu un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme dans son mécanisme d'hydrolyse, une particularité permettant généralement la création de glycosynthases performantes. Dans ce cas, le donneur de glycosyle requis n'est plus activé par une oxazoline, mais par un atome de fluor. La production de protéines d'origine eucaryote comme HEWL est généralement peu efficace dans les systèmes d'expression bactériens classiquement utilisés en laboratoire. Plusieurs mutants du lysozyme dépourvus d'activité hydrolytique ont donc été produits chez la levure *Pichia pastoris*. Après optimisation de l'expression en fermenteur, plusieurs dizaines de milligrammes de protéine par litre de culture ont pu être purifiés. Parmi les protéines

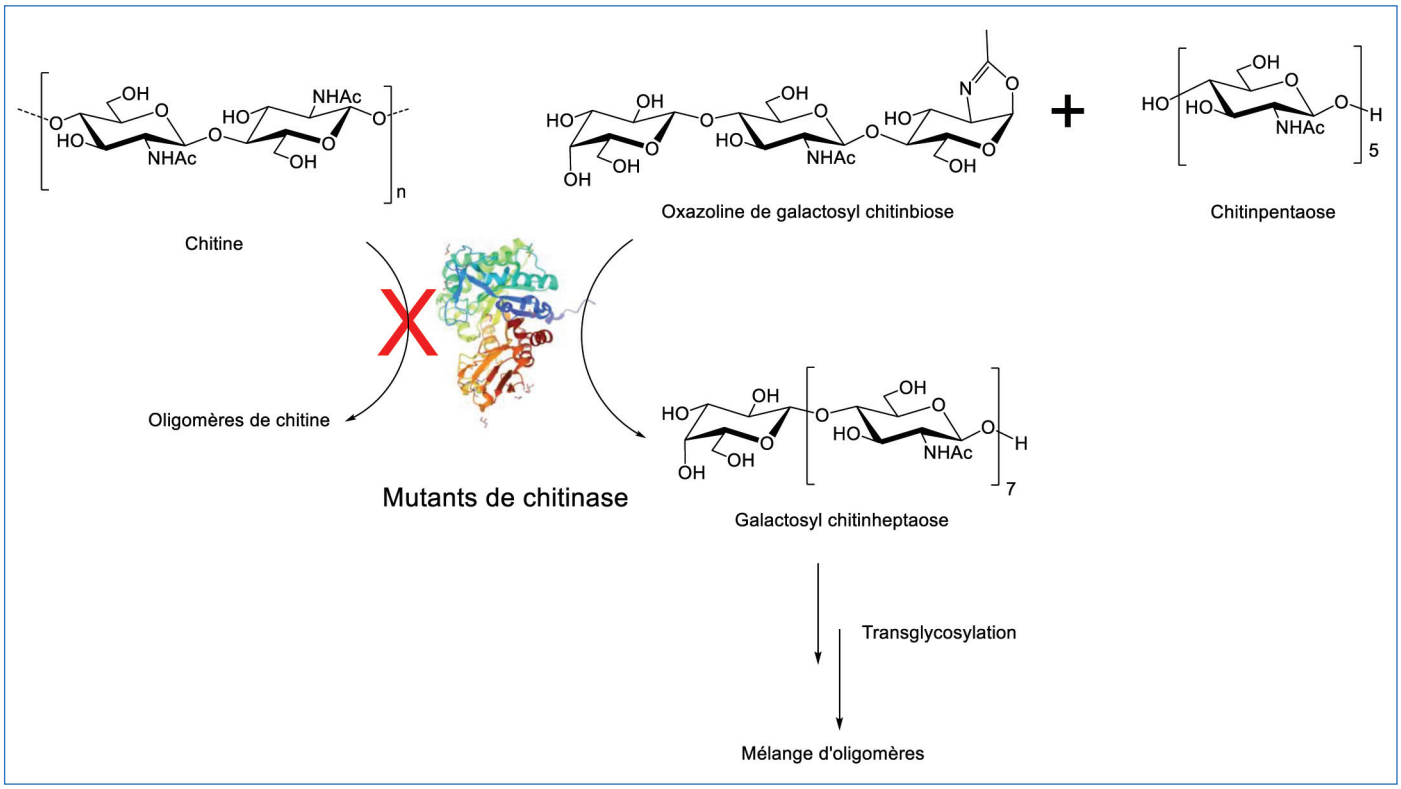


Figure 4 - Synthèse de chitinoligosaccharides à longue chaîne catalysée par une glycosynthase dérivée d'une chitinase. Une mutation spécifique au sein du site actif d'une chitinase permet d'abolir son activité d'hydrolyse et transforme l'enzyme en glycosynthase. Celle-ci peut catalyser le transfert d'un donneur à la fois activé par une fonction oxazoline et protégé par un galactosyle sur un accepteur. L'oligosaccharide obtenu peut cependant être modifié par l'enzyme, ce qui conduit à la formation d'un mélange sans contrôle de la taille des produits formés.

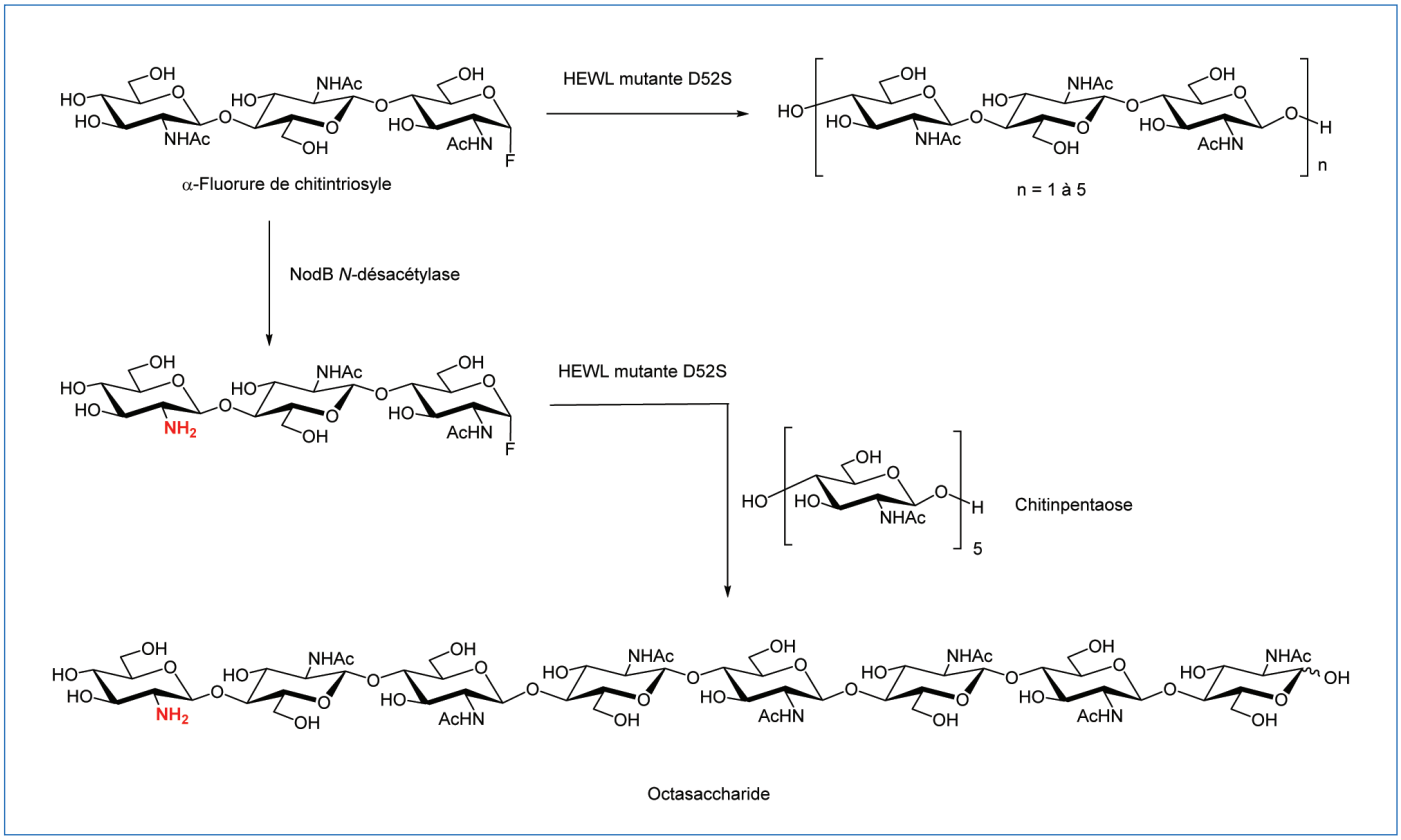


Figure 5 - Synthèse de chitinoligosaccharides à longue chaîne catalysée par une glycosynthase dérivée du lysozyme du blanc d'œuf de poule (HEWL D52S). Le fluorure de glycosyle donneur désacétylé sur son unité non réductrice par l'enzyme NodB n'est pas polymérisable par la glycosynthase mais conduit, en présence de chitinpentaose accepteur, à la formation d'un produit unique de glycosylation octasaccharidique.

exprimées, le mutant D52S (où l'acide aspartique 52 est substitué par une sérine) a montré une activité de polycondensation de l'α-fluorure de chitintriosyle (*figure 5*).

Cette nouvelle glycosynthase a par la suite été utilisée dans une cascade enzymatique avec la chitinoligosaccharide *N*-désacétylase NodB[8] de *Sinorhizobium meliloti* pour la préparation de CO à longue chaîne et de taille parfaitement contrôlée [11]. En tirant profit de la différence d'affinité entre une unité glucosamine et une unité GlcNAc au sein du site actif du lysozyme, nous avons fait l'hypothèse que la désacétylation sélective de l'unité non réductrice du fluorure de chitintriosyle fournirait un composé capable d'agir comme donneur de glycosyle mais pas comme accepteur, bloquant ainsi sa polycondensation. En présence d'un accepteur, la glycosynthase devrait alors conduire à la formation d'un produit de condensation unique. Une cascade enzymatique en un seul pot en utilisant NodB pour désacétyler le donneur, puis la glycosynthase pour catalyser son transfert sur un accepteur, a finalement permis de synthétiser un octasaccharide avec un excellent rendement de 65 %. En plus de rendre possible un accès aux CO à longue chaîne, cette nouvelle approche permet d'envisager la synthèse de nouveaux LCO longs et de sondes variées du fait de la présence d'une amine libre du côté non réducteur des oligosaccharides synthétisés.

Une usine bactérienne pour produire les LCO

Les LCO peuvent être extraits de cultures de bactéries du genre rhizobium ou bien de champignons endomycorhiziens. Les quantités isolées, au prix d'un lourd travail de purification, sont toutefois trop faibles pour répondre aux besoins des études biologiques en laboratoire et en champ. La synthèse des LCO, envisagée selon des approches chimiques ou enzymatiques, a donc fait l'objet de nombreux travaux.

Bien que les glycoside hydrolases et les glycosynthases permettent la synthèse *in vitro* d'oligosaccharides, les enzymes les mieux adaptées à la production de ces molécules sont les glycosyltransférases dont c'est la fonction naturelle. L'emploi de glycosyltransférases *in vitro* souffre cependant d'inconvénients. Ces enzymes souvent membranaires sont difficiles à exprimer et purifier sous forme active. La plupart utilisent comme substrats des nucléotides sucres onéreux, et l'emploi de ces enzymes nécessite un recyclage *in situ* des sous-produits de la réaction qui inhibent le biocatalyseur. L'utilisation de glycosyltransférases *in vitro* présente donc d'importantes limitations. En revanche, *in vivo,* elles permettent des synthèses à des échelles compatibles avec des développements industriels. Un procédé biotechnologique d'usine cellulaire a été développé au sein de notre équipe pour la production d'oligosaccharides *in vivo* dans des souches d'*E. coli* génétiquement modifiées. Le métabolisme de la bactérie est détourné de façon à accumuler les nucléotides sucres nécessaires à la synthèse et l'expression de gènes hétérologues codant les glycosyltransférases d'intérêt permet la réalisation des réactions de glycosylation souhaitées non présentes chez la bactérie sauvage. La culture à haute densité cellulaire des souches modifiées conduit à l'accumulation d'oligosaccharides à des échelles de plusieurs grammes par litre de culture, rendant le procédé extrêmement économique et compétitif. Un des premiers succès de cette approche a été la synthèse des précurseurs de LCO (*figure 6*).

Le nucléotide sucre (UDP-GlcNAc) nécessaire à la synthèse de CO est naturellement présent chez *E. coli* car il entre dans les

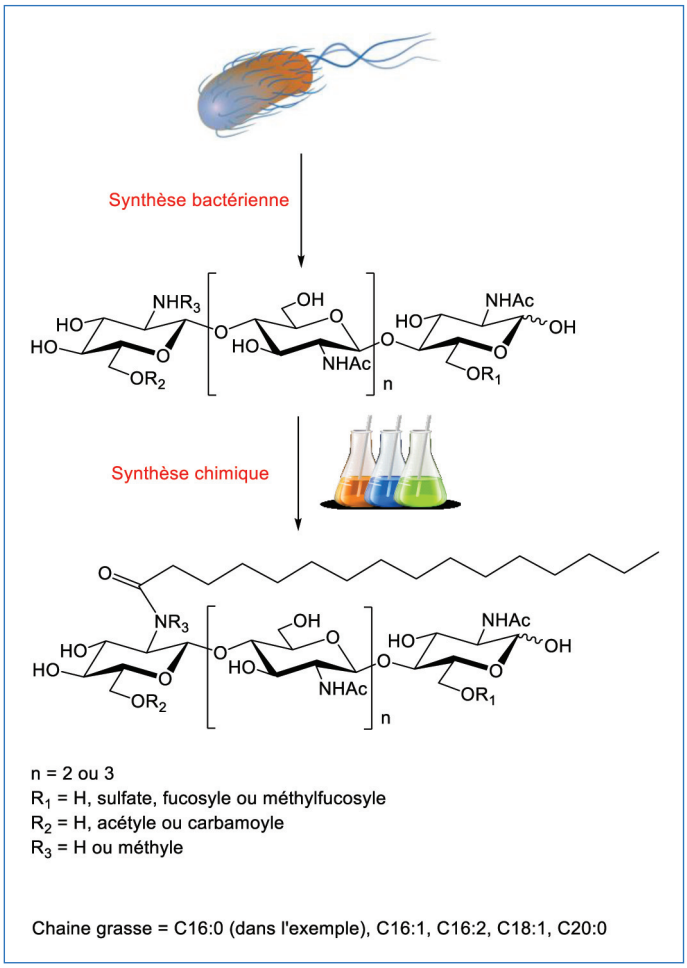


Figure 6 - Diversité moléculaire des lipochitinoligosaccharides synthétisés dans l'équipe « Chimie et biotechnologie des oligosaccharides » au CERMAV. Le squelette saccharidique est construit par synthèse enzymatique chez la bactérie *E. coli* avant d'être modifié chimiquement pour fournir les LCO.

processus de biosynthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. En revanche, les gènes codant la *N*-acétylglucosaminyltransférase NodC[9] d'*Azorhizobium caulidonans* et la chitinoligosaccharide *N*-désacétylase NodB de *Sinorhizobium meliloti* ont été clonés et introduits dans la bactérie de façon à permettre la synthèse du squelette saccharidique et à réaliser la désacétylation sélective de l'unité située du côté non réducteur. À l'issue de la fermentation, le produit majoritaire formé est le pentasaccharide, avec un taux de production de l'ordre de 2,5 g/L de culture difficilement égalable par une approche *in vitro* [12]. Un couplage chimique permet ensuite l'addition de la chaîne grasse et la synthèse de LCO (*figure 6*).

L'utilisation d'une *N*-acétylglucosaminyltransférase NodC d'une autre origine bactérienne (*Sinorhizobium meliloti*) a par la suite permis de favoriser la synthèse du tétrasaccharide avec un taux de production équivalent [13]. D'autres enzymes impliquées dans les « décorations » des CO ont également été surexprimées pour fournir des précurseurs de LCO plus élaborés ; parmi elles, NodH de *Sinorhizobium meliloti* qui est responsable de la sulfatation en catalysant le transfert d'un groupement sulfate du 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS) sur le O-6 de l'extrémité réductrice d'un CO. Le PAPS[10] est également naturellement présent chez *E. coli*, ce qui signifie que tout comme la synthèse du squelette saccharidique, la machinerie cellulaire a pu être détournée sans modification majeure du métabolisme de la bactérie. Au final, plusieurs précurseurs *O*-sulfatés, mais aussi *O*-fucosylés, *O*-acétylés, *O*-carbamoylés et *N*-méthylés, ont ainsi été produits avec des rendements de synthèse permettant leur exploitation à l'échelle industrielle (entre 0,2 et 2 g/L de culture) (*figure 6*).

Modification chimique des oligosaccharides de chitine

La synthèse enzymatique constitue une approche efficace et économe en atomes pour la préparation d'oligosaccharides. La modification de ces oligosaccharides par voie chimique reste néanmoins intéressante lorsque des réactions chimio- et régiosélectives sont possibles.

Les CO synthétisés dans les souches recombinantes d'*E. coli* et dont l'unité terminale du côté non réducteur est une glucosamine se sont avérés d'excellents précurseurs pour la préparation de LCO (*figure 6*). Les premières réactions d'acylation ont été réalisées avec des anhydrides obtenus à partir du chlorure d'acyle correspondant. Les chaînes grasses les plus représentatives (acide oléique et palmitique) ont ainsi été couplées aux CO sulfatés ou non avec des rendements allant de 30 à 50 % [14]. Par la suite, l'utilisation d'un agent de couplage peptidique de type uronium a permis une mise en œuvre plus simple en un seul pot à partir de l'oligosaccharide et de l'acide gras, sans toutefois améliorer vraiment l'efficacité du couplage [15]. C'est finalement l'utilisation d'un ester activé de *N*-hydroxysuccinimide qui a conduit aux meilleurs résultats. Malgré des temps de réactions assez longs, de l'ordre d'une semaine, l'acylation est alors quasi quantitative [16].

L'usine cellulaire est un procédé efficace pour la synthèse de précurseurs de LCO à 4 ou 5 unités GlcNAc, mais elle demeure restreinte à des structures naturelles. Pour accéder à des LCO non naturels, nous avons imaginé une synthèse à partir de CO obtenus par hydrolyse de la chitine (*figure 7*). Les chitinoligosaccharide *N*-désacétylases NodB de *Sinorhizobium meliloti* et VC1280[11] de *Vibrio cholerae* ont pour cela été surexprimées chez *E. coli* puis purifiées. Nous avons ainsi montré pour la première fois qu'il était possible d'utiliser NodB *in vitro* pour synthétiser des LCO à l'échelle du gramme [17]. VC1280 présente une spécificité différente puisqu'elle désacétyle sélectivement la pénultième unité GlcNAc du côté non réducteur de l'oligosaccharide. L'acylation en présence d'un ester activé a permis d'obtenir une bibliothèque de LCO non décrits jusqu'alors avec des degrés de polymérisation allant de 4 à 6 et dont la chaîne grasse est localisée sur l'avant-dernière unité [16]. Nous disposons donc désormais d'un panel d'outils enzymatiques utilisables *in vivo* ou *in vitro* permettant la synthèse à façon de LCO de manière beaucoup plus simple et rapide que par extraction à partir de cultures de rhizobia ou de champignons.

Sondes enzymatiques fluorescentes

Les glycoside hydrolases agissant sur les polysaccharides insolubles tels que l'amidon, la cellulose et la chitine sont des outils intéressants pour la transformation et donc la valorisation de cette biomasse saccharidique. La production et l'utilisation de ces enzymes impliquent de disposer de méthodes de dosage sensibles et en continu de leur activité. Nous avons pour cela développé la synthèse de sondes fluorescentes basées sur le principe du transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET).

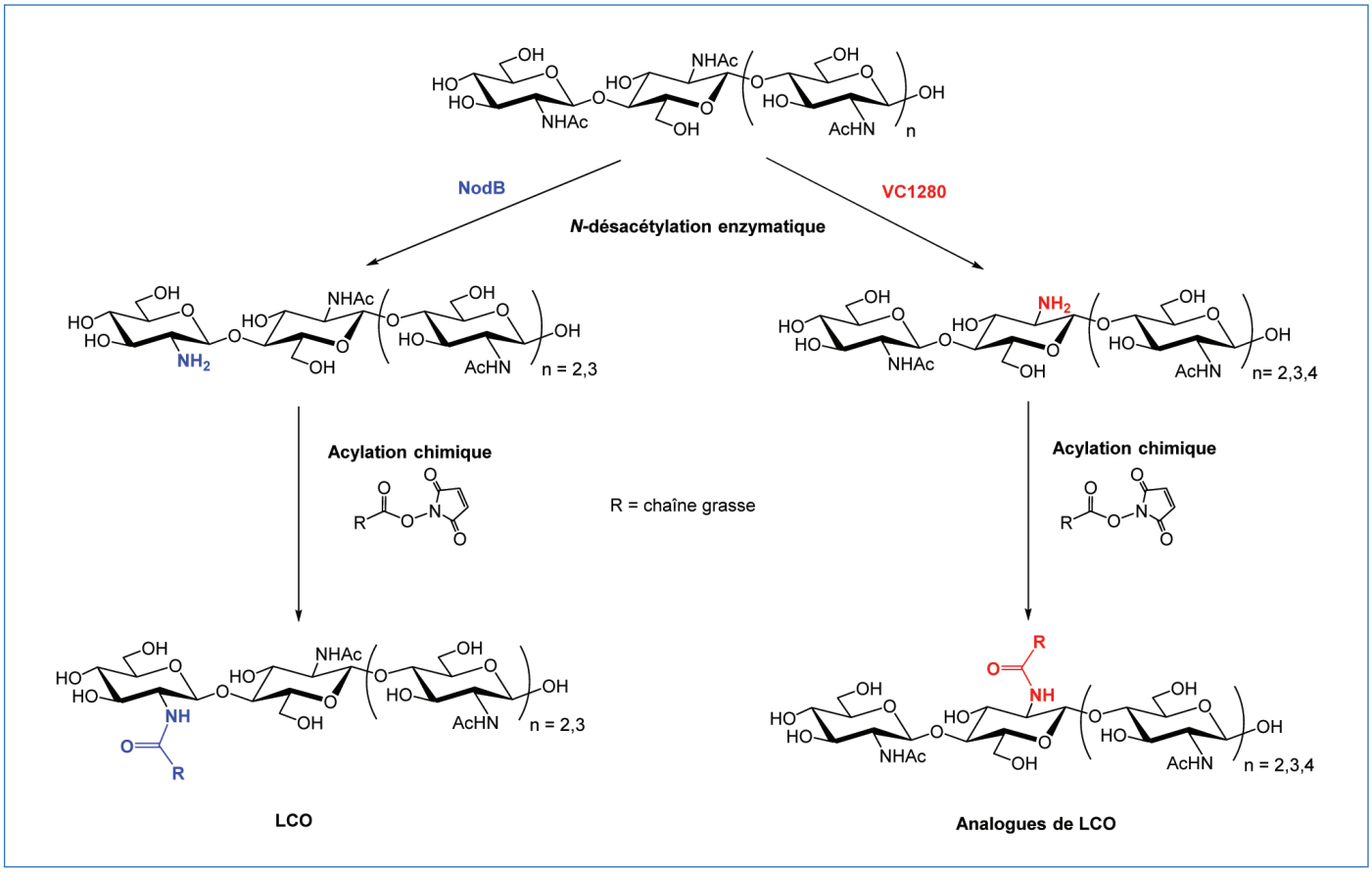


Figure 7 - Synthèse chimio-enzymatique *in vitro* de LCO et d'analogues. Les chitinoligosaccharide *N*-désacétylases NodB de *Sinorhizobium meliloti* et VC1280 de *Vibrio cholerae* désacétylent respectivement la dernière et la pénultième unité du côté non réducteur d'un CO. La fonction amine libre réagit ensuite sur une chaîne grasse activée sous forme d'un ester de *N*-hydroxysuccinimide pour produire un LCO naturel ou un analogue.

Lorsque le substrat naturel d'une hydrolase est insoluble, la mesure de son activité nécessite l'utilisation de dérivés du polysaccharide modifiés de façon à être solubles ou à libérer un chromophore. L'inconvénient de cette approche est l'hétérogénéité du nouveau substrat et les limitations qui en découlent pour des études biochimiques approfondies. L'alternative consiste à utiliser des substrats oligosaccharidiques sélectivement modifiés en bout de chaîne par un chromophore, dont la libération suite à l'action de l'enzyme peut être mesurée par absorbance (ou fluorescence). L'inconvénient majeur réside ici dans le fait qu'une enzyme qui agit uniquement en milieu de chaîne saccharidique n'est pas systématiquement détectée. Par ailleurs, cette stratégie ne permettra pas non plus de discriminer une enzyme agissant sur le polymère (chitinase) d'une enzyme agissant naturellement sur des oligomères (par exemple une *N*-acétylhexosaminidase) dans un milieu biologique complexe.

Nous avons ainsi développé des substrats oligomériques qui permettent la mesure de l'activité enzymatique grâce au principe du transfert d'énergie de fluorescence par résonance de type Förster (*figure 8*). Ces molécules sont exclusivement dégradées par des hydrolases agissant sur des polysaccharides, et pour lesquels l'aglycone n'a pas besoin d'être libéré pour induire une réponse en fluorescence ou absorbance. En absence d'enzyme, le substrat n'émet pas de fluorescence en raison d'un effet Förster intramoléculaire entre un groupement fluorescent donneur et un groupement absorbant et/ou fluorescent accepteur situés à chaque extrémité de l'oligosaccharide. Lorsqu'une enzyme hydrolyse le substrat, l'éloignement des deux groupements rend ce transfert d'énergie impossible et la partie saccharidique porteuse du groupement fluorescent donneur peut alors être détectée et quantifiée. Ce type de substrat permet de mettre en évidence et caractériser biochimiquement (constantes cinétiques) l'activité de polysaccharidases de façon spécifique à l'aide d'une concentration micromolaire de substrat synthétique [18].

Sondes pour le marquage de protéines

Plus récemment, nous nous sommes intéressés à la préparation de sondes d'affinité pour le marquage et la purification de protéines interagissant avec les sucres. La 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine, qui est principalement connue pour son utilisation dans la préparation de mélamine, présente une réactivité permettant sa fonctionnalisation par trois fonctions chimiques orthogonales. La synthèse de glycosides de triazinyle avait été explorée pour leur activité antitumorale potentielle dès 1982, mais ce sont les travaux de Shoda et ses collaborateurs de l'Université de Tokyo en 2008 montrant la possibilité de fonctionnaliser l'extrémité réductrice d'oligosaccharides en phase aqueuse qui ont suscité notre intérêt. Nous avons développé une série d'oligosaccharides de triazinyle modifiés par deux fonctions « clickables » orthogonales, un alcyne permettant des réactions de type cycloaddition azoture-alcyne et un groupe furane permettant des réactions de Diels-Alder avec un maléimide par exemple.

Nous avons montré pour la première fois que les glycosides de triazinyle permettent de réaliser le marquage spécifique de protéines interagissant avec la partie saccharidique, et ceci

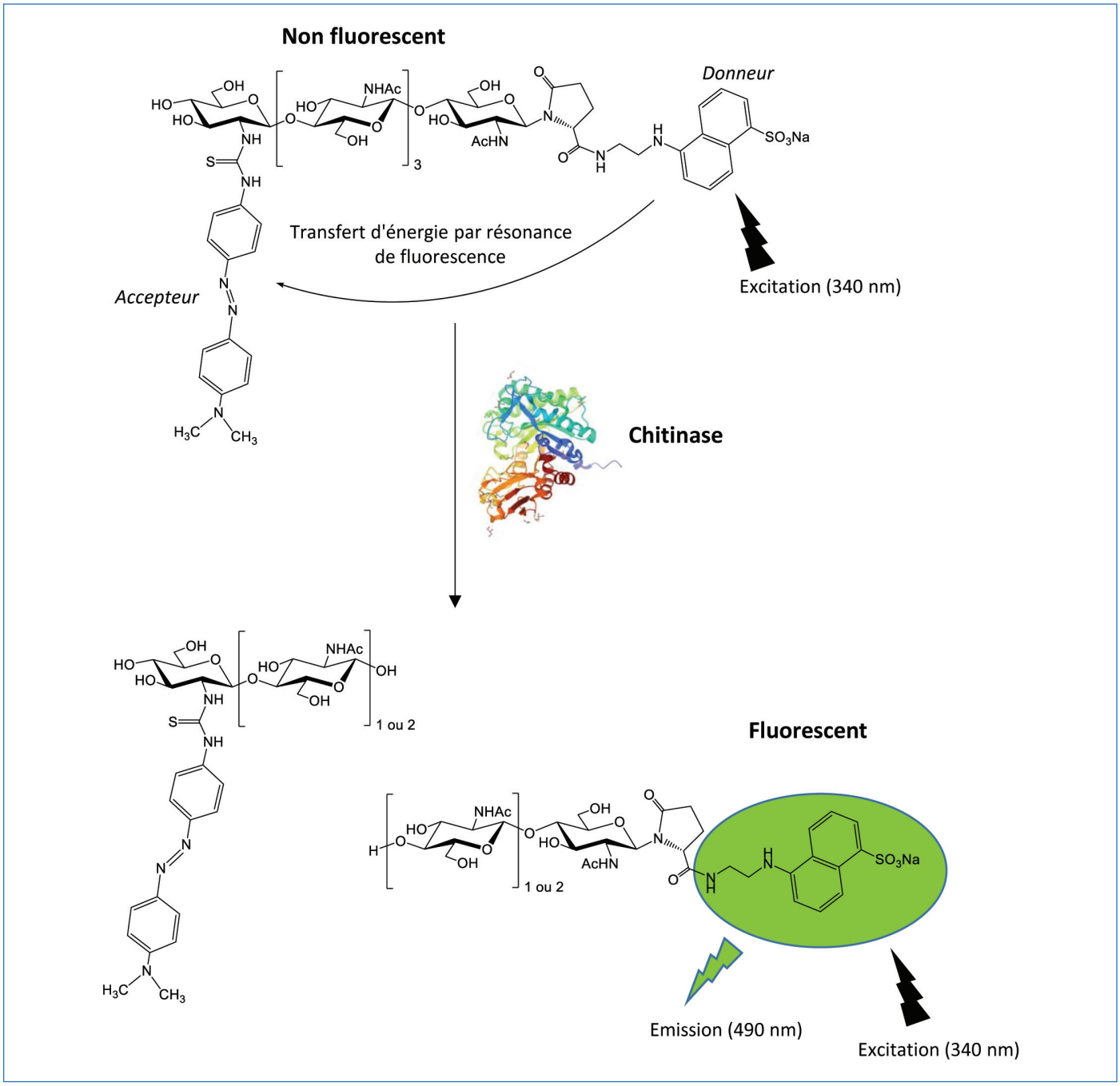


Figure 8 - Sonde fluorescente FRET pour la détection de l'activité des chitinases. En absence d'enzyme, aucune fluorescence n'est émise par la sonde en raison d'une extinction du signal lié à un transfert intramoléculaire d'énergie par résonance de type Förster entre le donneur et l'accepteur. Sous l'action d'une chitinase, l'émission de fluorescence va alors se produire.

sans activation particulière, selon la notion de « chimie-click » [19] (*figure 9*). Dans notre preuve de concept, la lectine de *Triticum vulgaris* ou « wheat germ agglutinin » (WGA) spécifique des oligosaccharides de GlcNAc a été marquée de manière covalente par un groupe fluorescent après incubation avec un dérivé de chitinpentaose fonctionnalisé par le groupe *s*-triazine sur son extrémité réductrice. Ce nouveau type de sonde permet de s'affranchir de groupements photoactivables plus complexes à manipuler et source de marquage non spécifique. Validée avec plusieurs protéines modèles, cette sonde est actuellement utilisée pour la découverte de récepteurs de CO et de LCO.

Apprendre de la nature pour assurer le futur

Au cours de l'évolution, les plantes ont développé de subtils mécanismes nécessaires à leur croissance et à leur défense contre des agents pathogènes basés sur la perception d'oligosaccharides de chitine. L'étude et la compréhension de ces processus ouvrent d'excitantes perspectives pour le développement d'une agriculture plus soucieuse de l'environnement. Dans ce contexte, la biocatalyse associée aux techniques de chimie bio-orthogonale sont de puissants outils qui permettent d'aborder cette problématique par des études fondamentales et d'apporter des réponses d'un point de vue socio-économique. Les sondes moléculaires synthétiques qui permettent aujourd'hui de progresser dans notre connaissance du monde végétal ont contribué à la mise en place de nouveaux outils chimiques ou enzymatiques qui trouveront également des applications dans le domaine de la santé humaine. Ces outils constituent un axe de développement majeur de la chémobiologie, un pan de la recherche en plein essor qui vise à la compréhension au niveau moléculaire des processus complexes au sein des organismes. Les molécules

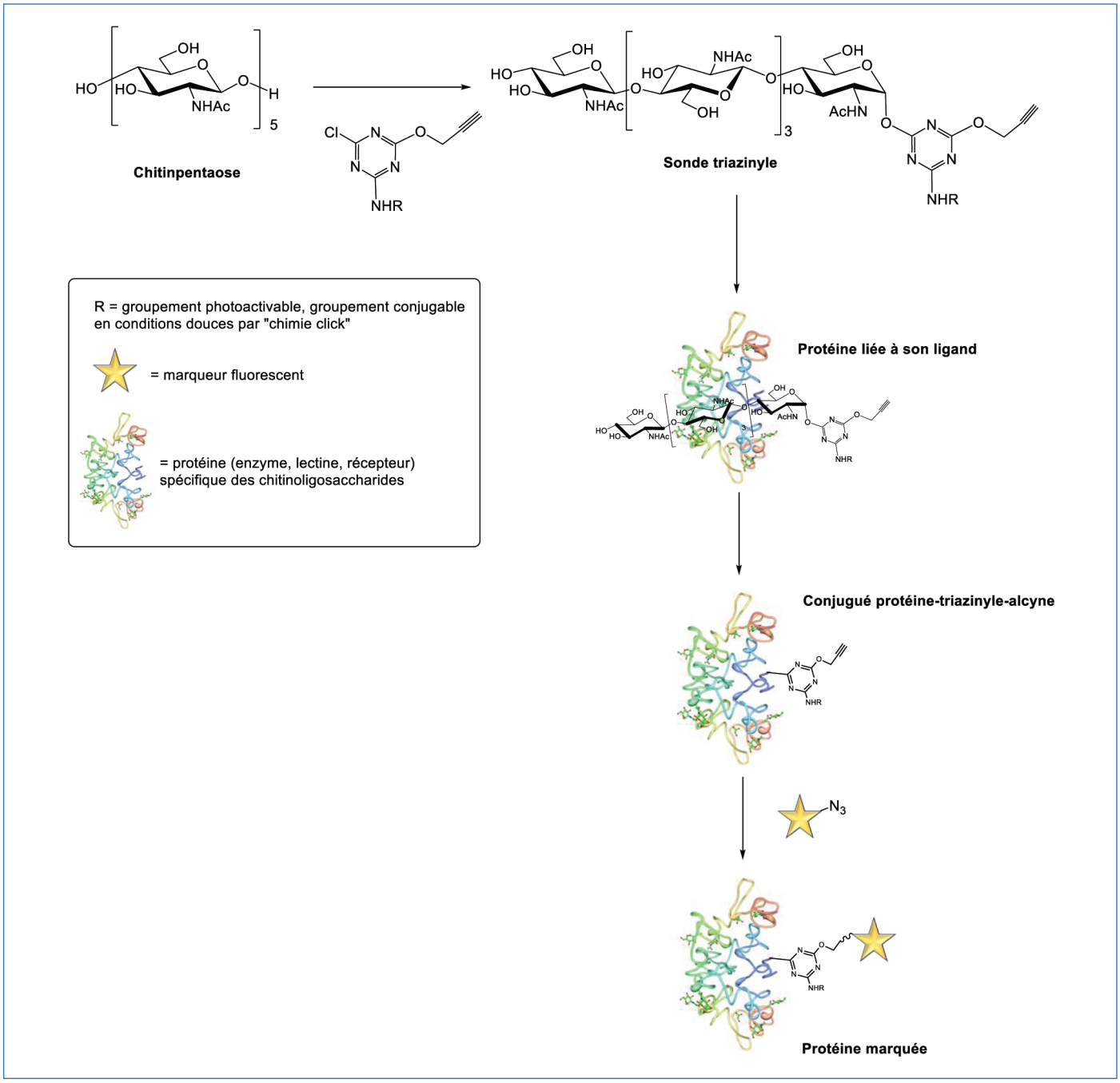


Figure 9 - Marquage d'une protéine par affinité avec une sonde oligosaccharidique fonctionnalisée par un groupe triazinyle « clickable ». Un oligosaccharide de chitine est sélectivement fonctionnalisé sur son extrémité réductrice par un groupe 1,3,5 triazinyle porteur d'une fonction alcyne. En présence d'une protéine interagissant spécifiquement avec l'oligosaccharide, un greffage covalent du groupe triazinyle sur la protéine intervient. La fonction alcyne introduite à la surface de la protéine permet alors son marquage avec un groupe fluorescent via une cycloaddition azoture-alcyne.

ou procédés développés dans ce contexte ne sont pas limités à des études fondamentales mais ils répondent également à une attente socio-économique. Les LCO par exemple sont aujourd'hui produits industriellement et utilisés en Amérique du nord pour la culture du soja, de la cacahuète, des légumineuses (pois, haricots, luzerne), du maïs ou encore du thé. Leur activité est telle que les quantités utilisées sont extrêmement faibles, de l'ordre du centième de milligramme par hectare, contribuant ainsi à la réduction des intrants en agriculture.

(1) LCO (lipochitinoligosaccharide) : oligosaccharide de chitine modifié par une chaîne grasse sur l'unité terminale du côté non réducteur.
(2) Symbiose rhizobienne : symbiose plante-bactérie (rhizobium) ; symbiose endomycorhizienne : symbiose plante-champignon (endomycorhizien).
(3) Ligand : molécule qui se lie de manière réversible à une protéine (récepteur).
(4) HEWL (« hen egg-white lysozyme ») : enzyme capable d'hydrolyser la chitine soluble et ses oligosaccharides.
(5) Transglycosylation : réaction de transfert d'une partie d'un oligosaccharide sur un autre oligosaccharide.
(6) Glycosynthase : enzyme génétiquement modifiée pour ne plus hydrolyser les sucres mais capable de catalyser des réactions de glycosylation.
(7) Unité réductrice (ou côté réducteur) d'un oligosaccharide : unité saccharidique dont la fonction hémiacétalique est libre.
(8) NodB : enzyme qui hydrolyse sélectivement le groupe *N*-acétyle de l'unité terminale du côté non réducteur d'un oligosaccharide de chitine.
(9) NodC : glycosyltransférase qui catalyse la synthèse d'oligosaccharides de chitine à partir d'un donneur nucléotide sucre.
(10) PAPS : substrat de sulfotransférase, donneur de groupe sulfate.
(11) VC1280 : enzyme qui hydrolyse sélectivement le groupe *N*-acétyle de la pénultième unité GlcNAc du côté non réducteur d'un oligosaccharide de chitine.

[1] C. Zipfel, G.E.D. Oldroyd, Plant signalling in symbiosis and immunity, *Nature*, **2017**, *543*, p. 328-336.

[2] Y. Liang, K. Tóth, Y. Cao, K. Tanaka, C. Espinoza, G. Stacey, Lipochitooligosaccharide recognition: an ancient story, *J. Physiol.*, **2014**, *204*, p. 289-296.
[3] P. Lerouge, P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet *et al.*, Symbiotic host-specificity of Rhizobium meliloti is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal, *Nature*, **1990**, *344*, p. 781-784.
[4] F. Maillet, V. Poinsot, O. André, V. Puech-Pagés, A. Haouy *et al.*, Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza, *Nature*, **2011**, *469*, p. 58-63.
[5] T.A. Rush, V. Puech-Pagès, A. Bascaules, P. Jargeat, F. Maillet *et al.*, Lipo-chitooligosaccharides as regulatory signals of fungal growth and development, *Nat. Commun.*, **2020**, *11*, art. 3897.
[6] F. Feng, J. Sun, G.V. Radhakrishnan, Lee T., S. Fort *et al.*, A combination of chitooligosaccharide and lipochitooligosaccharide recognition promotes arbuscular mycorrhizal associations in *Medicago truncatula*, *Nat. Commun.*, **2019**, *10*, art. 5047.
[7] Z. Bozsoki, K. Gysel, S.B. Hansen, D. Lironi, S. Fort *et al.*, Ligand-recognizing motifs in plant LysM receptors are major determinants of specificity, *Science*, **2020**, *369*, p. 663-670.
[8] W.J. Jung, R.D. Park, Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives, *Mar. Drugs*, **2014**, *12*, p. 5328-56.
[9] A. Masselin, A. Rousseau, S. Pradeau, L. Fort, S. Fort *et al.*, Optimizing chitin depolymerization by lysozyme to long-chain oligosaccharides, *Mar. Drugs*, **2021**, *19*, 320.
[10] E.A. Martinez, H. Boer, A. Koivula, E. Samain, H. Driguez *et al.*, Engineering chitinases for the synthesis of chitin oligosaccharides: catalytic amino acid mutations convert the GH-18 family glycoside hydrolases into transglycosylases, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2012**, *74*, p. 89.
[11] A. Rousseau, S. Armand, S. Cottaz, S. Fort, Size-controlled synthesis of β(1⟶4)-GlcNAc oligosaccharides using an endo-glycosynthase, *Chem. - A Eur. J.*, **2021**, 27, p. 17637-646, doi:10.1002/chem.202103212.
[12] E. Samain, S. Drouillard, A. Heyraud, H. Driguez, R.A. Geremia, Gram-scale synthesis of recombinant chitooligosaccharides in *Escherichia coli*, *Carbohydr. Res.*, **1997**, *302*, p. 35-42.
[13] E. Samain, V. Chazalet, R.A. Geremia, Production of O-acetylated and sulfated chitooligosaccharides by recombinant *Escherichia coli* strains harboring different combinations of nod genes, *J. Biotechnol.*, **1999**, *72*, p. 33-47.
[14] F. Gressent, S. Drouillard, N. Mantegazzai, E. Samain, R.A. Geremia *et al.*, Ligand specificity of a high-affinity binding site for lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in Medicago cell suspension cultures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, p. 4704-09.
[15] M.O. Rasmussen, B. Hogg, J.J. Bono, E. Samain, H. Driguez, New access to lipo-chitooligosaccharide nodulation factors, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, p. 1908-10.
[16] R. Chambon, G. Despras, A. Brossay, B. Vauzeilles, S. Fort *et al.*, Efficient chemoenzymatic synthesis of lipo-chitin oligosaccharides as plant growth promoters, *Green Chem.*, **2015**, *17*, p. 3923-30.
[17] R. Chambon, S. Pradeau, S. Fort, S. Cottaz, S. Armand, High yield production of rhizobium NodB chitin deacetylase and its use for in vitro synthesis of lipo-chitinoligosaccharide precursors, *Carbohydr. Res.*, **2017**, *442*, p. 25-30.
[18] S. Cottaz, B. Brasme, H. Driguez, A fluorescence-quenched chitopentaose for the study of endo-chitinases and chitobiosidases., *Eur. J. Biochem.*, **2000**, *267*, p. 5593-600.
[19] A. Masselin, A. Petrelli, M. Donzel, S. Armand, S. Cottaz, S. Fort, Unprecedented affinity labeling of carbohydrate-binding proteins with s-triazinyl glycosides, *Bioconjug. Chem.*, **2019**, *30*, p. 2332-39.

Antoine ROUSSEAU, doctorant, **Sylvie ARMAND**, maître de conférences à l'Université Grenoble Alpes, **Sylvain COTTAZ**, professeur à l'Université Grenoble Alpes, et **Sébastien FORT***, directeur de recherche au CNRS, Centre de recherches sur les macromolécules végétales (CERMAV), UPR CNRS 5301, équipe « Chimie et biotechnologie des oligosaccharides », Grenoble.

*sebastien.fort@cermav.cnrs.fr

Les insectes, nouveaux chimistes au service de l'humanité

Date de création : 2011

Implantation : Évry

Secteur d'activité : production de produits à base d'insectes

Technologies : élevage et transformation d'insectes

Fondateurs : Antoine Hubert, Alexis Angot, Fabrice Berro, Jean-Gabriel Levon

Financement, subventions, crédits : Demeter, Emertec, Bpifrance, NPC, Quadia

Produits : poudre de protéine, matières premières à base d'insectes, fertilisants

Une ambition : contribuer à nourrir durablement le monde

• www.ynsect.com/fr

Bref historique de la relation entre l'insecte et l'homme

Les insectes présentent la plus grande variété parmi les espèces eucaryotes présentes sur Terre, et malgré cela, leur formidable potentiel a été extrêmement sous-exploité jusqu'à présent. Pire, dans le monde occidental, ils ont été majoritairement considérés comme des nuisibles à éradiquer. Rappelons que déjà dans l'Ancien Testament, l'invasion des criquets était considérée comme l'une des sept plaies qui frappèrent l'Égypte.

Deux exceptions notables à cet état des lieux général sont présentées par les vers à soie et les abeilles. En effet, les vers à soie, qui sont en réalité les chenilles des papillons *Bombyx mori*, sont cultivés en Chine depuis le troisième millénaire avant notre ère. De manière assez intéressante, il s'agit aujourd'hui du seul insecte que l'on peut considérer comme domestique, car il a perdu sa capacité à se reproduire sans l'aide de l'homme. Un autre point remarquable de la sériciculture concerne son implantation dans le monde occidental, et notamment dès le XIVe siècle en France, où elle a rapidement pu bénéficier de l'aide des pouvoirs publics. Elle prend de l'importance avec Henri IV, qui a favorisé son développement en intensifiant la culture des muriers blancs, seul aliment consommé par les vers à soie, et en fournissant gratuitement les plants aux paysans ainsi que les œufs des insectes [1].

Dans le cas des abeilles, l'histoire est légèrement différente. Leur utilisation par l'homme daterait de la Préhistoire ; on peut en effet les apercevoir sur les peintures rupestres des cuevas de la Araña, ou grottes de l'Araignée en français, près de Valence en Espagne. Le développement de l'apiculture a été néanmoins très progressif, lié notamment au mode d'alimentation de l'abeille qui nécessite une grande liberté de mouvement. Ainsi au troisième millénaire avant notre ère, les Égyptiens utilisaient des pots à usage unique, brisés en fin de cycle afin de récupérer le miel, tandis que les ruches, semblables à celles utilisées actuellement, sont apparues au Moyen Âge [2].

Des utilisations plus récentes d'insectes sont également à signaler, telles que la lutte biologique avec l'exploitation de certains insectes pour en combattre d'autres, par exemple des larves de coccinelles ou des chrysopes pour attaquer les pucerons, ou encore des trichogrammes, de toutes petites guêpes de quelques millimètres seulement, qui parasitent les œufs de certains papillons et autres mouches nuisibles pour des cultures [3]. Un autre usage des insectes est dans l'alimentation des nouveaux animaux de compagnie (NAC), ainsi que dans les appâts pour la pêche. Et pour finir, on ne peut pas passer à côté de l'utilisation d'un parasite des cactus, *Dactylopius coccus*, autrement dit la cochenille, dont le pigment rouge vif, appelé carmin, est utilisé dans nombre de préparations alimentaires sous la désignation E120 [4].

Mais c'est dans un contexte différent que l'industrie des insectes a vu le jour depuis les dix dernières années. En effet, le nouvel intérêt pour les insectes a été suscité par la recherche de sources de protéines nouvelles et/ou complémentaires pour la nourriture humaine et animale. On a alors commencé à envisager une bioraffinerie des insectes, c'est-à-dire une séparation de l'insecte, considéré comme matière première, en plusieurs produits ou types de produits d'intérêt (*figure 1*).

Le premier niveau de raffinage concerne ainsi les métabolites primaires majoritaires, tels que les protéines, les lipides ou encore les déjections. Le deuxième niveau concerne essentiellement les métabolites primaires minoritaires, plus spécifiquement la chitine, issue de l'exosquelette des insectes, et le chitosane qui en résulte. Enfin, le troisième niveau de raffinage concerne les métabolites secondaires, tels que les peptides antimicrobiens (AMP) ou autres molécules produites en faible quantité pour des besoins vitaux des animaux.

Bioraffinerie des insectes

Premier niveau de raffinage

Dans le premier niveau de raffinage des insectes, nous retrouvons les métabolites primaires majoritaires, les protéines, les lipides et les déjections.

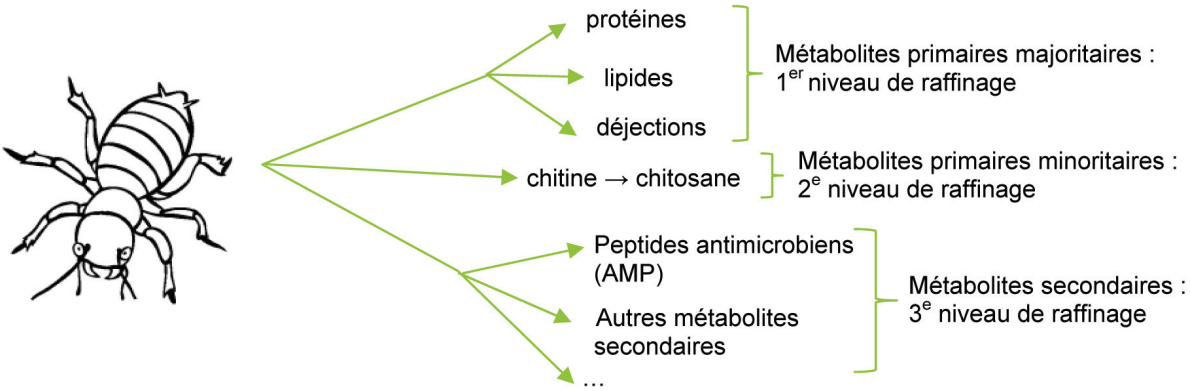


Figure 1 - Différents niveaux de raffinage dans l'industrie de l'insecte.

En termes de tonnage, les **déjections** sont le premier produit de la bioraffinerie des insectes et le plus aisément obtenu dans la plupart des cas. Les déjections des insectes herbivores et plus généralement végétariens sont utilisées comme fertilisants organiques naturels. En effet, de même que les déjections d'autres animaux végétariens, tels les bovins ou les équidés, ces composés sont riches en flore et faune du microbiote et ne sont que partiellement digérés étant donné la faible efficacité générale du métabolisme des composés d'origine végétale. Certains animaux, tels les lapins, ont l'habitude de consommer leurs propres déjections afin d'en améliorer la digestion. Dans d'autres cas, une symbiose s'établit, comme par exemple entre les chiens de berger et les ovins qu'ils gardent et dont ils consomment les déjections.

Parmi les insectes les plus utilisés en bioraffineries, ce sont les déjections des coléoptères, et plus précisément celles de *Tenebrio molitor*, qui sont le plus fréquemment mises sur le marché, notamment par la société Ynsect.

En termes de chiffre d'affaires en revanche, le premier produit est sans doute la **protéine**. De même que pour les autres métabolites primaires, la qualité des protéines, leur composition en acides aminés, les longueurs des chaines peptidiques et la digestibilité associée sont dépendantes de l'insecte considéré. De plus, la proportion de protéines et de lipides varie en fonction de l'insecte et de son mode de vie.

Ainsi, les orthoptères, criquets et autres grillons nécessitent une grande force musculaire pour les sauts qui constituent leur mode de locomotion préféré. Ils sont donc très majoritairement composés de protéines, ce taux pouvant atteindre et même dépasser dans certains cas 80 % de la matière sèche de l'animal.

A contrario, les lépidoptères ou les diptères, papillons ou mouches, nécessitent beaucoup d'énergie pour assurer leurs vols et ces insectes sont donc majoritairement constitués de lipides.

Les coléoptères, quant à eux, ont généralement des compositions plus équilibrées [5].

Par ailleurs, les orthoptères étant allomorphes, ils ont besoin de beaucoup de place pour l'élevage dès l'éclosion et ceci conduit à un élevage industriel plus onéreux. Les protéines en résultant sont par conséquent majoritairement destinées à la consommation humaine directe.

En revanche, dans le cas des coléoptères et des diptères les premiers débouchés sont dans le domaine de l'alimentation animale, et notamment en aquaculture. Il faut rappeler que le régime alimentaire de certains poissons est naturellement constitué de plus de 70 % d'insectes. Des essais portant sur la croissance de certains poissons en fonction de leur alimentation ont mis en évidence une augmentation significative de la croissance des poissons après une incorporation de farine de *T. molitor* (*figure 2*).

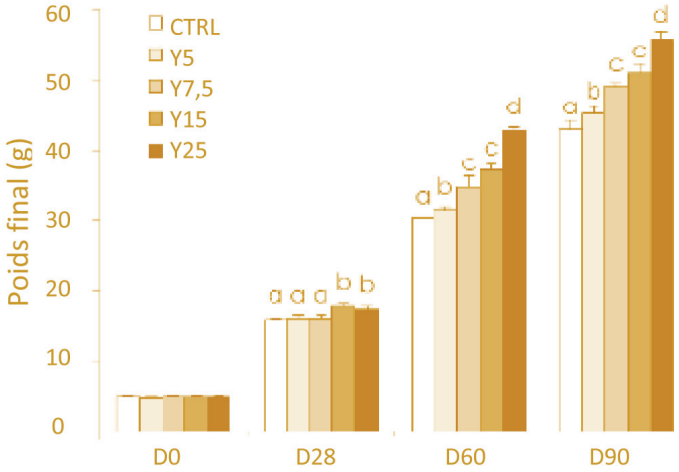


Figure 2 - Suivi de la croissance de la truite arc-en-ciel sur une durée de 90 jours après addition de farine de *T. molitor* dans la ration alimentaire : entre 0 % (référence) et jusqu'à la substitution complète de la farine de poisson pour le régime Y25.

Pour ce qui est des **lipides**, la teneur et la composition en acides gras peuvent varier de manière très significative en fonction des différents genres et espèces (*tableau I*). La teneur en acides gras insaturés peut ainsi varier de 29 à 85 % pour les hémiptères et les orthoptères, respectivement, et celle en acides gras polyinsaturés de 1 à 29 % pour les dictyoptères et les coléoptères, respectivement [6].

Les applications des lipides issus des insectes peuvent par conséquent être très variées. Il peut notamment s'agir d'applications dans l'alimentation humaine ou animale pour certaines huiles, notamment celle de *T. molitor* dont la composition est proche de celle de l'huile d'arachide. L'ensemble des applications non alimentaires, déjà développées pour les huiles végétales, telles que des polymères (polyuréthanes sans isocyanate (NIPU)), le biodiesel, des spécialités... peuvent être envisagées pour les huiles issues d'insectes.

Deuxième niveau de raffinage

Comme présenté plus haut, le deuxième niveau de raffinage concerne essentiellement la **chitine** et le **chitosane** qui en résulte.

La chitine est le second biopolymère le plus répandu sur Terre après la cellulose et est son équivalent dans le règne animal, essentiellement présent dans l'exosquelette des arthropodes [7]. Sa production à l'échelle mondiale est aujourd'hui essentiellement obtenue par retraitement des coquilles des

Tableau I - Composition indicative en acides gras des lipides issus de différents insectes.

Ordre	14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Coléoptères	1	0	20	5	5	38	19	10
Lépidoptères	1	0	26	6	2	32	8	22
Hémiptères	42	1	20	2	3	16	9	1
Orthoptères	2	0	29	3	8	32	12	9
Diptères	3	1	23	26	4	28	12	2
Hyménoptères	2	0	16	4	4	46	11	16
Dictyoptères	3	0	34	7	4	42	1	0

Principaux jalons de la découverte et de l'identification de la chitine

Découverte

1799 : A. Hatchett décrit « *un matériau particulièrement résistant aux produits chimiques usuels* »

1811 : Henri Braconnot isole la « fongine » d'extraits de champignons

1823 : Auguste Ogier isole la « chitine » (de « chiton », « tunique » en grec) de l'exosquelette d'insectes

Élucidation de la structure chimique

1843 : Anselme Payen isole la cellulose

1843 : Jean Louis Lassaigne constate la présence d'azote dans la structure

1879-1894 : George Ledderhouse et Eugène Gilson font d'autres études structurelles

1946 : E.R. Purchase et C.E. Braun élucident la structure moléculaire de la chitine

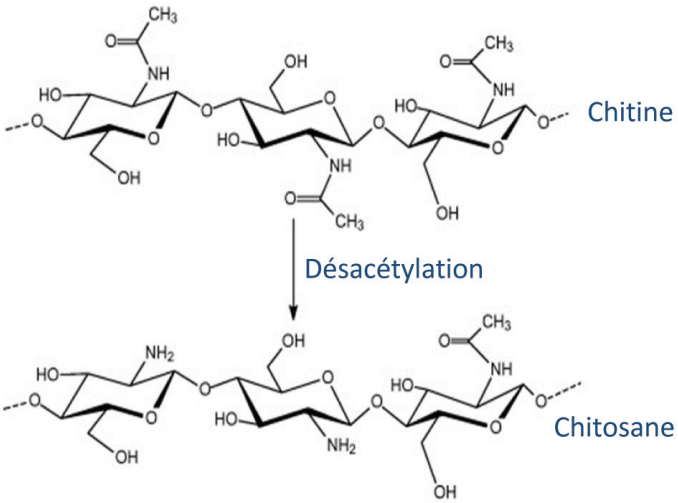


Figure 3 - Structure de la chitine et sa transformation en chitosane par désacétylation.

crustacés. Cependant, la découverte de la chitine a été faite lors de l'étude des champignons et des insectes (voir *encadré*). La chitine est un polysaccharide composé essentiellement d'unités *N*-acétyl-glucosamine (*figure 3*). L'arrangement des chaines peut adopter trois dispositions : antiparallèle – α, parallèle – β, et mixte – γ. L'arrangement α est à la fois le plus répandu dans la nature et le plus résistant, ce qui complexifie l'extraction de la chitine. Ainsi, la chitine β, que l'on trouve essentiellement dans les plumes, était jusqu'à présent extrêmement prisée par les industriels recherchant les chitines et chitosanes avec des masses moléculaires élevées. Or l'industrie des insectes a mis en évidence que la spécificité de la production de chitine par des insectes, caractérisée par de longues fibres de section nanométrique et de longueur micrométrique, permettait l'obtention de longues chaines purifiées de chitine et chitosane (y compris à partir de la chitine de type α) [7].

Des techniques à la fois biologiques et chimiques ont été mises au point afin d'extraire la chitine, le plus difficile étant de la débarrasser des minéraux dans le cas des crustacés et des protéines dans le cas des insectes. Les méthodes chimiques font ainsi appel à des traitements acides et basiques successifs, alors que les méthodes biologiques plus douces permettent l'hydrolyse des protéines à l'aide de protéases purifiées ou de microorganismes entiers les excrétant [7].

La principale fonction naturelle de la chitine étant la protection, c'est un polymère très peu sensible à des traitements chimiques ou physiques, ce qui rend ses applications délicates. Ainsi, elle est généralement transformée en chitosane par désacétylation (*figure 3*), afin de subir les transformations nécessaires à son utilisation.

Parmi les principales utilisations du chitosane, nous pouvons citer les applications biomédicales (fils de suture, prothèses, etc.) [8], les applications dans le domaine des matériaux actifs (supports de catalyse chirale par exemple) [9], ou encore dans la purification de l'eau [10].

Dans l'agriculture, en revanche, on retrouve aussi bien la chitine que le chitosane, la chitine servant à la protection de graines [11], alors que le chitosane joue le rôle d'un éliciteur [12].

Troisième niveau de raffinage

Une grande diversité de molécules peut être obtenue à partir du troisième niveau de raffinage. Ainsi, les insectes, qui n'ont que l'immunité innée, possèdent de nombreux **peptides antimicrobiens** qui, selon l'espèce, peuvent être produits soit spontanément, soit à la suite d'une sollicitation (due à une contrainte ou à une menace). Par ailleurs, un grand nombre de petites molécules organiques ont été identifiées pour des applications thérapeutiques extrêmement variées.

• *Peptides antimicrobiens (AMP)*

Le premier peptide antimicrobien à avoir été identifié chez un insecte est la **cécropine**, trouvée chez un papillon, *Hyalophora cecropia*, dans les années 1980 (*figure 4*) [13]. Depuis, de nombreux AMP ont été identifiés chez les insectes. Ces molécules sont généralement classées en six catégories : **défensines**, **cécropines**, **attacines**, **lébocines** (et autres AMP riches en proline), **moricines** et **glovérines**, ces deux dernières catégories ayant été identifiées uniquement chez les lépidoptères jusqu'à présent. Les cécropines présentent le spectre thérapeutique le plus large ; ils sont en effet actifs non seulement contre les

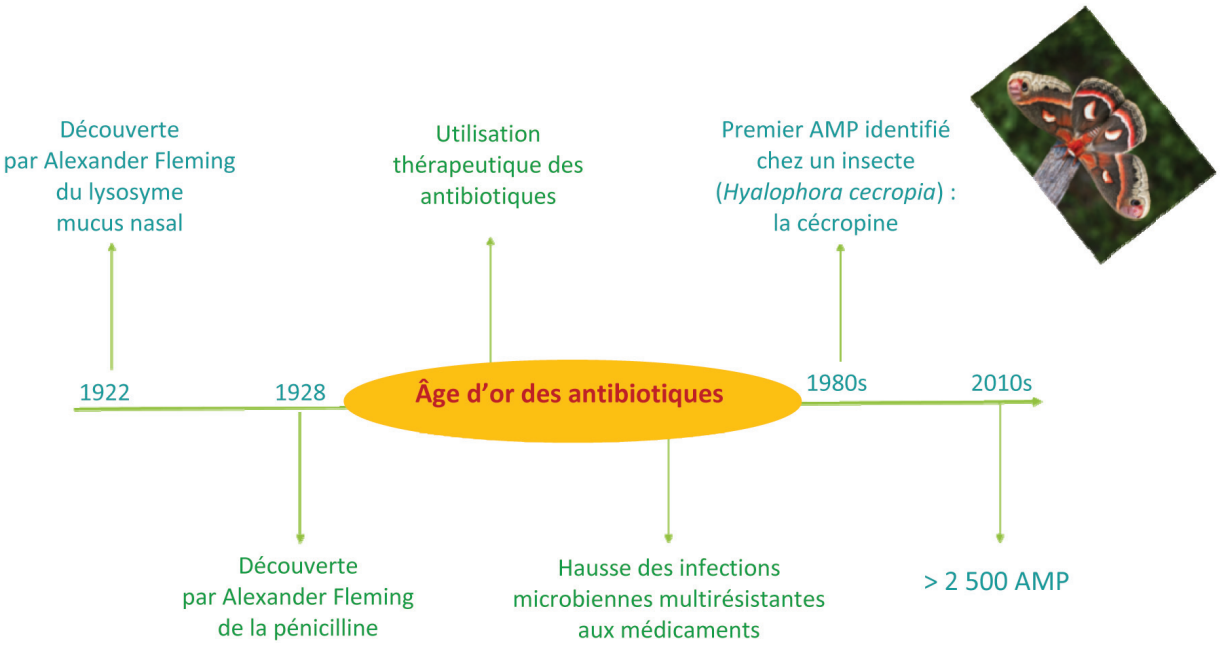


Figure 4 - Bref historique du développement des peptides antimicrobiens (AMP).

bactéries Gram-positives et Gram-négatives, mais également contre les champignons microscopiques, les parasites viraux, et même la prolifération des cellules cancéreuses [14].

Structurellement, ces AMP sont très différents. Il s'agit de petits peptides cationiques (30-50 kDa) pour les défensines et les cécropines, de peptides basiques pour les moricines et les glovérines ; les attacines possèdent une acidité versatile, alors que les lébocines sont riches en proline.

Même s'il n'y a pas encore de consensus sur leur mode d'action, les études s'accordent généralement sur le principe de destruction de la membrane des cellules du pathogène (*figure 5*). Ce mode d'action peut s'exercer de quatre façons, les différences étant essentiellement liées à la façon dont le peptide aborde la paroi cellulaire.

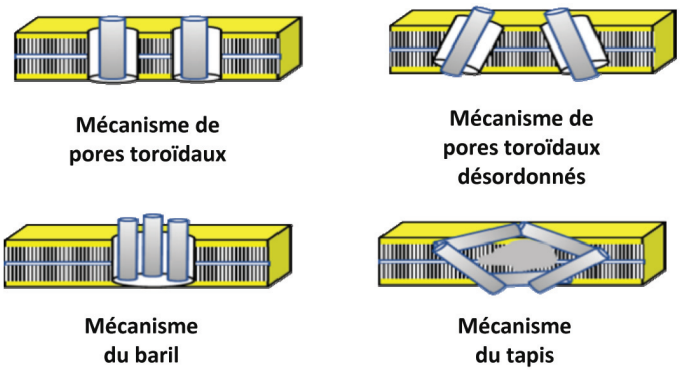


Figure 5 - Différents mécanismes d'actions des peptides antimicrobiens (AMP).

Les AMP peuvent être relativement abondants chez certains insectes. Ceux naturellement soumis à des situations de risque sanitaire, *i.e.* charognards, nécrophages, etc., telles les mouches par exemple, en produisent spontanément, tandis que la plupart des animaux, eu égard aux dépenses énergétiques nécessaires à la production des AMP, n'en synthétisent que lorsque cela est nécessaire.

L'utilisation des AMP issus des insectes est très limitée pour le moment et le seul exemple vraiment pertinent concerne les larves de mouches domestiques pour l'épuration des plaies. Dans ce cas, les larves consomment non seulement les tissus nécrosés, mais elles déposent également les AMP, ce qui évite un risque de réinfection.

• ***Autres molécules d'intérêt***

De nombreuses activités thérapeutiques ont été recensées chez les insectes (*tableau II*). On peut ainsi remarquer que l'activité la mieux représentée est celle qui concerne l'activité antibiotique, même si les activités analgésiques, cicatrisantes, diurétiques ou anti-malaria sont aussi fortement présentes.

A contrario, des effets à plus long terme et plus difficilement détectables tels que les activités hépatiques, abortives, anti-vieillissement, intestinales ou encore anti-inflammatoires ont été pour l'heure moins documentées. Une particularité concerne les effets aphrodisiaques, trouvés de manière assez fréquentes (quinze occurrences au moins), ce qui semble traduire surtout l'intérêt de certaines cultures pour ce type d'effets ainsi que la réputation des insectes à être particulièrement féconds.

En outre, nous pouvons constater que certaines espèces présentent davantage d'activités que d'autres ; c'est le cas notamment des dictyoptères, isoptères, orthoptères, et plus particulièrement même des hémiptères, coléoptères, lépidoptères et hyménoptères. Néanmoins, nous pouvons attribuer cela non seulement à une surabondance de molécules actives de ces espèces, mais également à la promiscuité de ces espèces avec les activités humaines, ce qui en a fait des sujets d'étude privilégiés.

Enfin, quelques cas de symbiose ont tout particulièrement attiré notre intérêt également. Il s'agit notamment de la **batrachotoxine** (*figure 6*), un poison très violent qui accroit la perméabilité aux ions Na^+, en bloquant ainsi les influx nerveux et provoquant une contraction permanente des muscles, conduisant à un inéluctable arrêt cardiaque. La DL_{50} de ce produit est d'à peine 50 µg/kg, alors qu'il est présent en quantités supérieures au gramme chez les grenouilles dendrobates d'Amazonie. Les populations locales en tiraient d'ailleurs le poison dont ils enduisaient les flèches de leurs sarbacanes. Mais ce qu'il y a de plus curieux avec cette toxine est que les grenouilles ne la produisent pas, mais l'accumulent à partir de deux espèces de fourmis, *Brachymyrmex* et *Paratrechina*,

Tableau II - Principales activités thérapeutiques connues pour diverses espèces d'insectes.

Ordre	super famille	famille	phase	origine	Activités																						Total
					antibiotique	intestins	anticancéreux	antidote	anti-inflammatoire	traitement arthrose	immunorégulation	cicatrisation	hémostatique	anticoagulant	analgésique	antiépileptique	anti-malaria	diurétique	troubles hépatiques	anti-diabète	diarrhée	digestion	antivieillissement	aphrodisiaque	abortif	autres	
Thysanoures		1	1	1	■				■			■				■		■							■		6
Odonates			1	1	■										■		■										3
Dermaptères			1	1	■											■											2
Dictyoptères	2	3	3	4	■				■		■	■	■	■	■	■	■	■	■					■	■		13
Isoptères		1	3	4	■				■	■	■	■	■		■			■			■	■		■			11
Exopterygota	1		1	1							■	■			■												3
Orthoptères		5	2	4	■			■	■		■	■		■	■	■	■	■	■	■				■		■	13
Phthiraptères		1	1	2	■										■		■	■	■								5
Hémiptères	2	6	7	4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	■		■		■	19
Mégaloptères		1	1	1	■	■									■												3
Névroptères		1	1	2	■									■		■	■										4
Coléoptères		15	3	4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■			■	■	■	19
Diptères		5	3	3	■									■	■	■	■					■		■	■	■	9
Lépidoptères		13	7	5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■		■	20
Trichoptères		1	1	1													■	■							■		3
Hyménoptères		9	10	5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	21
Total					**43**	**7**	**11**	**14**	**7**	**10**	**19**	**25**	**16**	**17**	**31**	**17**	**21**	**23**	**5**	**7**	**10**	**9**	**6**	**15**	**5**	**21**	

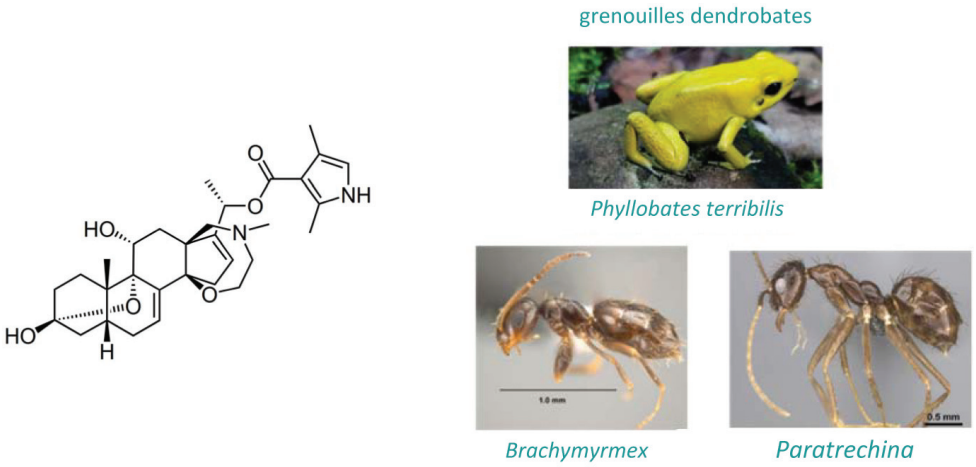


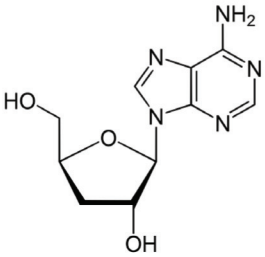
Figure 6 - La batrachotoxine et des animaux impliqués dans sa biosynthèse et son stockage.

qu'elles consomment. Le mode de production de cette toxine par les fourmis n'est pas connu pour l'heure ; il pourrait s'agir là encore d'une accumulation à partir d'autres sources de nourriture [4].

Un autre composé présentant également une certaine particularité est la **cordycépine** (*figure 7*). Ce composé aux nombreuses vertus prisées par le monde asiatique est produit dans les montagnes tibétaines par un ascomycète entomopathogène, *Cordyceps sinensis*. Lors de sa croissance, ce champignon colonise les larves d'un papillon du genre *Titharodes*, dont le rôle dans la production de la cordycépine n'est pas encore totalement élucidé. Cependant, étant donné que toute tentative de culture artificielle de *Cordyceps sinensis* ne donne pas de production satisfaisante de cordycépine, les scientifiques se penchent sur l'induction ou le transfert de cette substance entre le papillon et le champignon microscopique qui le parasite.

Les insectes, des protéines alternatives et durables

L'exploitation industrielle des insectes se met en place (dernière décennie) et concerne essentiellement le premier niveau de raffinage. Néanmoins, le potentiel des insectes est non seulement immense pour les applications résultant de ce premier raffinage, mais également pour les produits résultant des deuxième et troisième niveaux de raffinage puisque la valeur ajoutée est bien plus importante dans les domaines de la santé ou de certaines spécialités.



Cordyceps sinensis

Thitarodes

Figure 7 - La cordycépine et des animaux impliqués dans sa biosynthèse et son stockage (photos de gauche à droite : © Can Stock Photo/ibogdan ; © Can Stock Photo/Prot56 ; tirée de Maczey N. *et al.*, 2010, Zenodo, http://doi.org/10.5281/zenodo.293957).

Ordre	Envisagé pour la bioraffinerie	Disponibilité de la chitine et facilité d'extraction	AMP	Autres molécules actives
Thysanoures				+
Odonates			+	+
Dermaptères				+
Dictyoptères				+
Isoptères	+	+	++	+
Exopterygota				+
Orthoptères	++	++	+	++
Phthiraptères				+
Hémiptères			++	++
Mégaloptères				+
Névroptères				+
Coléoptères	+++	+++	++	+++
Diptères	+++	+++	+++	+
Lépidoptères	++	+++	+++	+++
Trichoptères				+
Hyménoptères			++	+++

Tableau III - Comparaison des insectes pour les différents aspects de bioraffinerie.

Les contraintes liées au premier niveau de raffinage induisent une sélection des insectes pour l'industrialisation essentiellement basée sur la facilité de l'élevage (insectes non sociaux, faibles contraintes thermiques et autres), la disponibilité et le prix des substrats d'élevage (comme le son de blé par exemple), ainsi que sur la qualité des produits issus du premier niveau de raffinage. Cela conduit à la sélection préférentielle des espèces des ordres des orthoptères, lépidoptères et plus certainement encore des coléoptères et des diptères.

Lorsque l'on regarde l'intérêt pour les deuxième et troisième niveaux de raffinage, on peut constater que, en dehors des hyménoptères, de forts recoupements existent entre les espèces présentant des molécules à haute valeur ajoutée et celles sélectionnées pour le premier niveau de raffinage (*tableau III*). Nous pouvons donc légitimement anticiper une arrivée future sur le marché de produits issus des deuxième et troisième niveaux de raffinage des insectes.

La société Ynsect poursuit actuellement son développement à l'échelle industrielle et vient tout juste d'annoncer une levée de fonds de 110 millions d'euros. En effet, à partir de la validation à l'échelle pilote qui a permis de finaliser des marchés dans les domaines de l'alimentation humaine, de l'alimentation animale (aquaculture, animaux domestiques) et de l'oléochimie, une usine est actuellement en construction dans la Somme.

[1] www.museedutissage.com/histoire-de-la-soie (consulté en juin **2018**).
[2] www.catoire-fantasque.be/animaux/abeille/histoire-apiculture.html (consulté en juin **2018**).
[3] www.planetnatural.com/beneficial-insects-101 (consulté en juin **2018**).
[4] Lupoli R., *L'insecte médicinal*, Ancyrosoma, **2010**.
[5] Berezina N., Hubert A., Berro F., Levon J.-G., Le Roux K., Socolsky C., Sanchez L., Laurent S., Chitin, hydrolysate and method for the production of one or more desired products from insects by means of enzymatic hydrolysis, Brevet WO 2016108033, **2016**.
[6] Berezina N., Insects: novel source of lipids for a fan of applications, *Oilseeds and fats Crops and Lipids*, **2017**, *24*, art. D402.
[7] Berezina N., Production and application of chitin, in *Biomaterials series: Biological Production of Fuels and Chemicals*, De Gruyter, **2016**, p. 61-72.
[8] Khor H., *Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise*, Elsevier Insights, 2nd ed., **2014**.
[9] Clousier N., Moucel R., Naik P., Madec P.J., Gaumont A.C., Dez I., Catalytic materials based on catalyst containing ionic liquid phase supported on chitosan or alginate: importance of the support, *C.R. Chimie*, **2011**, *14*, p. 680.
[10] Crini G., Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment, *Prog. Polym. Sci.*, **2005**, *30*, p. 38.
[11] Tronsmo A., Skaugrud O., Harman G.E., Use of chitin and chitosan in biological control of plant diseases, in *Chitin Enzymology*, Eur. Chitin Soc., **1993**, p. 265-270.
[12] Lienart Y., Gautier C., Dubois-Dauphin R., Domard A., Tetramers of chitin (chitosan) as elicitors in Rubus protoplast, in *Chitin Enzymology*, Eur. Chitin Soc., **1993**, p. 271-276.
[13] Zhang L.J., Gallo R.L., Antimicrobial peptides, *Curr. Biol.*, **2016**, *26*, p. 14.
[14] Yi H.Y., Chowdhury M., Huang Y.D., Yu X.Q., Insect antimicrobial peptides and their applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2014**, *98*, p. 5807.

Nathalie BEREZINA,
directrice R & D de la transformation des insectes de Ynsect.

* Ynsect, 1 rue Pierre Fontaine, 91058 Évry.
Courriel : nbe@ynsect.com

Classification Périodique

légende

numéro atomique	4
symbole (2)	Be
nom	Béryllium
masse atomique en g.mol^{-1} (1)	9,0

notes : (1) basé sur le ^{12}C
(2) état physique du corps pur simple à 25°C et 1,013 bar :
Fe = solide ; O = gaz ; Br = liquide ; Tc = préparé par synthèse

période	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
I	1 1,0 H Hydrogène																	2 4,0 He Hélium
II	3 6,9 Li Lithium	4 9,0 Be Béryllium											5 10,8 B Bore	6 12,0 C Carbone	7 14,0 N Azote	8 16,0 O Oxygène	9 19,0 F Fluor	10 20,2 Ne Néon
III	11 23,0 Na Sodium	12 24,3 Mg Magnésium											13 27,0 Al Aluminium	14 28,1 Si Silicium	15 31,0 P Phosphore	16 32,1 S Soufre	17 35,5 Cl Chlore	18 39,9 Ar Argon
IV	19 39,1 K Potassium	20 40,1 Ca Calcium	21 45,0 Sc Scandium	22 47,9 Ti Titane	23 50,9 V Vanadium	24 52,0 Cr Chrome	25 54,9 Mn Manganèse	26 55,8 Fe Fer	27 58,9 Co Cobalt	28 58,7 Ni Nickel	29 63,5 Cu Cuivre	30 65,4 Zn Zinc	31 69,7 Ga Gallium	32 72,6 Ge Germanium	33 74,9 As Arsenic	34 79,0 Se Sélénium	35 79,9 Br Brome	36 83,8 Kr Krypton
V	37 85,5 Rb Rubidium	38 87,6 Sr Strontium	39 88,9 Y Yttrium	40 91,2 Zr Zirconium	41 92,9 Nb Niobium	42 95,9 Mo Molybdène	43 99 Tc Technétium	44 101,1 Ru Ruthénium	45 102,9 Rh Rhodium	46 106,4 Pd Palladium	47 107,9 Ag Argent	48 112,4 Cd Cadmium	49 114,8 In Indium	50 118,7 Sn Étain	51 121,8 Sb Antimoine	52 127,6 Te Tellure	53 126,9 I Iode	54 131,3 Xe Xénon
VI	55 132,9 Cs Césium	56 137,3 Ba Baryum	57 138,9 La Lanthane	72 178,5 Hf Hafnium	73 180,9 Ta Tantale	74 183,9 W Tungstène	75 186,2 Re Rhénium	76 190,2 Os Osmium	77 192,2 Ir Iridium	78 195,1 Pt Platine	79 197,0 Au Or	80 200,6 Hg Mercure	81 204,4 Tl Thallium	82 207,2 Pb Plomb	83 209,0 Bi Bismuth	84 210 Po Polonium	85 210 At Astate	86 222 Rn Radon
VII	87 223 Fr Francium	88 226 Ra Radium	89 227 Ac Actinium															

VI	58 140,1 Ce Cérium	59 140,9 Pr Praséodyme	60 144,2 Nd Néodyme	61 145 Pm Prométhium	62 150,4 Sm Samarium	63 152,0 Eu Europium	64 157,3 Gd Gadolinium	65 158,9 Tb Terbium	66 162,5 Dy Dysprosium	67 164,9 Ho Holmium	68 167,3 Er Erbium	69 168,9 Tm Thulium	70 173,0 Yb Ytterbium	71 175,0 Lu Lutétium
VII	90 232,0 Th Thorium	91 231,0 Pa Protactinium	92 238,0 U Uranium	93 237,0 Np Neptunium	94 242 Pu Plutonium	95 243 Am Américium	96 247 Cm Curium	97 247 Bk Berkélium	98 251 Cf Californium	99 254 Es Einsteinium	100 253 Fm Fermium	101 256 Md Mendélévium	102 254 No Nobélium	103 257 Lr Lawrencium

(H Prépa, Chimie PC SI)