

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب
Université de Ain Témouchent Belhadj Bouchaib
Faculté des Sciences et de Technologie
Département de Biologie



Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention du diplôme de Master en: Microbiologie Appliquée
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée
Thème

**Caractérisation bioinformatique des chitines de
*Pseudomonas guariconensis***

Présenté Par :

- 1) Mlle. ABDELLAOUI Rihab Hadil
- 2) Mlle. BOUKRAA Ikram

Devant le jury composé de :

Dr. Amara Mohamed MCA UAT.B.B (Ain Temouchent) Président
Dr. Benyamina Sofiane Mourad MCB UAT.B.B (Ain Temouchent) Examineur
Dr. BAKLI Mahfoud MCA UAT.B.B (Ain Temouchent) Encadrant

Année Universitaire 2022/2023

Remerciements

En terminant notre mémoire de fin d'étude, il nous est agréable d'adresser nos vifs remerciements à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à élaborer ce travail.

Les mots ne peuvent exprimer nos gratitude envers notre superviseur, **Dr. BAKLI Mahfoud** pour nous avoir suivies et supervisés avec ses conseils et sa patience. Nous somme ravis de son expérience et de sa disponibilité dévouée tout au long de cette démarche.

Nous tenons également à exprimer nos sincères remerciements aux jurys, **M. Amara Mohamed, M. Benyamina Sofiane Mourad** et **M. BAKLI Mahfoud**, pour avoir honorablement accepté d'évaluer et examiner notre travail acharné.

Nous ne manquerons pas de mentionner toute la formation et l'assistance précieuses des enseignants qui ont conduit à ce moment.

Enfin, nous tenons à remercier nos parents et amis qui ont fait de nous les personnes compétentes que nous sommes aujourd'hui et qui ont toujours été là pour nous comme soutien moral, intellectuel et émotionnel.



Dédicace

Je dédie ce travail à plusieurs années d'études :

A la mémoire de mon père décédé, je vous dédie de tout cœur cet événement important de ma vie pour toujours me pousser et me motiver dans mes études.

A ma chère maman, aucune dédicace ne peut exprimer mon respect, mon amour pour tes sacrifices, soutien et les prières tout au long de mes études que vous avez faits pour mon instruction.

A ma sœur Achwak et mon frère Ilyas pour leurs encouragements et leur soutien.

A mes amis Halima et Nihed pour leurs aides dans les moments difficiles.

Mlle. ABDELLAOUI Rihab Hadil





Dédicace

Mes larmes, ma sueur et mon sang ont contribué à la réalisation de ce projet, je ne peux donc dédier ce travail qu'à...

...moi-même.

Mlle. BOUKRAA Ikram



Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

Revue Bibliographique

1. Chitine 3

1.1. Histoire et définition de la chitine3

1.2. Structure de la chitine et de ses dérivés 3

1.3. Propriétés de la chitine et de ses dérivés 5

1.4. Sources de la chitine dans la nature 5

1.4.1. Arthropodes6

1.4.1.1. Insectes 6

1.4.1.2. Crustacés 6

1.4.2. Champignons 6

1.4.3. Nématodes7

1.4.4. Mollusques 7

1.4.5. Protistes7

1.5. Méthode d'extraction de la chitine et de ses dérivés 8

1.6. Applications de la chitine et de ses dérivés 8

2. Chitinases 9

2.1. Les chitinases et leur classification9

2.1.1. Classification selon le site d'action 10

2.1.2. Classification selon la séquence du gène 10

2.1.3. Classification selon les séquences d'acide aminé 11

2.1.3.1. Famille des glycosides hydrolases 18 11

2.1.3.2. Famille des glycosides hydrolases 19 12

2.1.3.3. Famille des glycosides hydrolases 23 12

2.1.3.4. Famille des glycosides hydrolases 48 12

2.2. Sources de chitinases 12

2.2.1. Organismes contenant de la chitine 12

2.2.1.1. Chitinases fongiques12

2.2.1.2. Chitinases des arthropodes et autres 13

2.2.2. Organismes ne contenant pas de la chitine	13
2.2.2.1. Chitinases des vertébrés	13
2.2.2.2. Chitinases des plantes	13
2.2.2.3. Chitinases bactériennes	14
2.3. Propriétés enzymatiques des chitinases bactériennes	15
2.4. Applications des chitinases bactériennes	16
3. <i>Pseudomonas guariconensis</i>	17
3.1. Historique d'isolement et échantillonnage	17
3.1.1. Procédure d'isolement	18
3.1.2. Caractéristiques phénotypiques	18
3.1.2.1. Morphologie	18
3.1.2.2. Analyse des pigments fluorescents	18
3.1.2.3. Caractérisation biochimique	19
3.1.2.4. Milieu et conditions de culture	19
3.1.3. Caractéristiques génotypiques	19
3.1.3.1. Séquençage de gènes et analyse comparative	19
3.1.3.2. Analyse de la composition en bases azotées et hybridation ADN-ADN	19
3.1.4. Classification	20
3.2. Applications de <i>Pseudomonas guariconensis</i>	20

Matériel et Méthodes

1. Récupération et caractérisation des séquences protéiques requêtes	24
2. Analyse des propriétés physico-chimiques	24
3. Prédiction du signal peptide	24
4. Localisation subcellulaire	24
5. Prédiction de la solubilité protéique	24
6. Analyse de la structure secondaire	25
7. Analyse de la structure tertiaire	25
7.1. Prédiction de la structure tertiaire	25
7.2. Raffinement de la structure tertiaire prédite	26
7.3. Validation des structures tertiaires initiales et raffinées	26
8. Analyse fonctionnelle	26
8.1. Recherche de domaines conservés	26

8.2. Recherche de motifs protéiques	26
8.3. Analyse de site actif.....	27

Résultats et discussion

1. Récupération et caractérisation des séquences protéiques requêtes	29
2. Analyse des propriétés physicochimiques	29
3. Prédiction du signal peptide	32
4. Localisation subcellulaire	32
5. Prédiction de la solubilité protéique	33
6. Analyse de la structure secondaire	33
7. Analyse de la structure tertiaire	36
7.1. Prédiction de la structure tertiaire	36
7.2. Raffinement de la structure tertiaire prédite	36
7.3. Validation des structures tertiaires initiales et raffinées	37
8. Analyse fonctionnelle	39
8.1. Recherche de domaines conservés	39
8.2. Recherche de motifs protéiques	41
8.3. Analyse du site actif.....	42

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives	48
Références Bibliographiques	50
Résumé	

Liste des figures

Figure 1: Comparaison entre les structures chimiques de la chitine et la cellulose.	4
Figure 2: Les différents allomorphes de la chitine.	4
Figure 3: Structure générale de la paroi cellulaire fongique (levure)	7
Figure 4: Le procédé de traitement et d'extraction de la chitine	8
Figure 5: Une représentation graphique illustrant les différents domaines d'utilisation de la chitine et leurs sources correspondantes.	9
Figure 6: Mode d'action des enzymes chitinolytiques.	10
Figure 7: Modèle de clivage des enzymes chitinases avec une activité endo.	10
Figure 8: Principales sources d'enzymes bactériennes dégradant la chitine	14
Figure 9: Les grands domaines d'application des chitinases bactériennes et leurs produits générés.	16
Figure 10: Activité antifongique de <i>P. guariconensis</i> (RA1) contre <i>A. niger</i>	21
Figure 11: Résultats de prédiction de la localisation subcellulaire pour les chitinases putatives.	32
Figure 12: Diagrammes d'hydropathie et de charge nette pour la prédiction de la solubilité protéique des chitinases putative de <i>P. guariconensis</i> générée par le serveur SOSUI.	33
Figure 13: Prédiction de la structure secondaire de la chitinase de <i>P. guariconensis</i> (gi 1086853717) par le serveur PSIPRED.	34
Figure 14: Prédiction de la structure secondaire de la chitinase de <i>P. guariconensis</i> (gi 1086851230) par le serveur PSIPRED.	35
Figure 15: La structure 3D du modèle le plus homologue, c4ok7A, suggéré par Phyre ² comme prédiction de la structure tertiaire des séquences gi 1086853717 et gi 1086851230 et visualisée à l'aide de PyMOL.	36
Figure 16: Structures 3D raffinées des chitinases de <i>P. guariconensis</i> raffinées par ModRefiner et visualisées par le logiciel PyMOL.	37
Figure 17: Résultats de la validation des structures de chitinase de <i>P. guariconensis</i> , gi 1086853717, par le diagramme de Ramachandran généré par PROCHECK (serveur SAVES).....	38
Figure 18: Résultats de la validation des structures de chitinase de <i>P. guariconensis</i> , gi 1086851230, par le diagramme de Ramachandran généré par PROCHECK (serveur SAVES).....	38

Figure 19: Résultats complets de l'analyse de domaines protéiques de deux chitinases de <i>P. guariconensis</i> par le programme CDD.	40
Figure 20: Proposition de voie évolutive pour le transfert et l'acquisition de gènes de chitinase de la famille GH19 provenant de plantes	41
Figure 21: Emplacements des motifs de MEME dans les deux chitinases putatives et la valeur- p pour chacune des séquences gi 1086853717 et gi 1086851230	42
Figure 22: Prédiction de GO pour la fonction moléculaire proposée par COFACTOR et codés par couleur selon leur score de confiance (CscoreGO), les scores les plus élevés signifiant une meilleure confiance.	43
Figure 23: Site de liaison de ligand de la chitinase gi 1086853717 de <i>P. guariconensis</i> prédit par COFACTOR et visualisé par le logiciel PyMOL.	44
Figure 24: Figure 24: Modèle de surface de 1WVU (structure cristalline de la chitinase C de <i>Streptomyces griseus</i> HUT6037) illustrant la fente large et ouverte de son site actif (coloré en rouge) (modifiée)	44
Figure 25: Logos des motifs conservés trouvés par MEME et qui partagent une similitude avec le site actif et/ou sont récurrents tout au long de la séquence de la chitinase gi 1086853717	45
Figure 26: Site de liaison de ligand de la chitinase gi 1086851230 de <i>P. guariconensis</i> prédit par COFACTOR et visualisé par le logiciel PyMOL.	46
Figure 27: Logos des motifs conservés trouvés par MEME et qui partagent une similitude avec le site actif de la chitinase gi 1086851230..	46

Liste des tableaux

Tableau 1: Sources d'insectes et rendement potentiel de la chitine.	6
Tableau 2: Les sources de chitine découvertes dans les protistes au cours des années.	7
Tableau 3: Propriétés des enzymes chitinase dans les quatre familles GH : GH18, GH19, GH23 et GH48 (modifiée).	11
Tableau 4: Exemples de production de chitinase induite par le stress chez des espèces végétales.	14
Tableau 5: Sources de chitinases bactériennes et leurs familles GH correspondantes.	15
Tableau 6: Le poids moléculaire, pH et température optimales des chitinases provenant de différentes sources bactériennes (modifiée)	16
Tableau 7: Les effets des chitinases produites par les bactéries chitinolytiques sur la croissance des plantes et le contrôle des pathogènes.	17
Tableau 8: Composition en bases d'ADN G + C d'espèces <i>Pseudomonas</i> étroitement apparentées (modifiée).	20
Tableau 9: Classification systématique de <i>P. guariconensis</i>	20
Tableau 10: Paramètres par défaut de SOPMA.	25
Tableau 11: Caractérisation des séquences requêtes de chitinase provenant de <i>P. guariconensis</i>	29
Tableau 12: Propriétés physico-chimiques des chitinase <i>P. guariconensis</i>	29
Tableau 13: Valeurs de thermostabilité des chitinases bactériennes par rapport aux chitinases de <i>P. guariconensis</i> LMG 27394.	31
Tableau 14: Score hydrophobe et position des protéines chitinase de <i>P. guariconensis</i> à l'aide de l'outil ProtScale.	31
Tableau 15: Résultats de l'analyse de la localisation subcellulaire des séquences gi 1086853717 et gi 1086851230 de <i>P. guariconensis</i>	32
Tableau 16: Prédiction de la structure secondaire des chitinases de <i>P. guariconensis</i> par SOPMA.	34
Tableau 17: Résultats de prédiction de la structure tertiaire des chitinases putatives de <i>P. guariconensis</i> par Phyre ²	36
Tableau 18: Statistiques de la validation des structures tertiaires initiales et raffinées des chitinases de <i>P. guariconensis</i> par les diagrammes de Ramachandran.	39
Tableau 19: Résultats des séquences alignées appartenant à la même espèce avec un pourcentage d'identité supérieur à 98% générés par blastp contre nr.	41

Liste des abréviations

3D: tridimensionnelle

µm: micromètre

aa: acide aminé

AI: Aliphatic index (l'indice aliphatique)

Ala: Alanine

anr: Any Number of Repetitions

API: Indice de profil analytique

Arg: Arginine

Asn: Asparagine

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BLASTp: protein-protein BLAST

CAZy: Carbohydrate-Active Enzymes

CBD: Domaine de liaison à la chitine

CDD: Conserved Domain Database

CDS: Coding sequence

COS: Chitooligosaccharides

Cys: Cystéine

CYT: Cytsol

Da: Daltons

DAPG: 2,4-diacétylphloroglucinol

EC: Extinction Coefficient (Coefficient d'extinction)

EC : Enzyme Commission

EXT: Extra-cellular (extracellulaire)

FASTA: FAST Alignment

g: grammes

GH: Glycosyl Hydrolases

GlcNAc: N-acétyl-D-glucosamine

Gln: Glutamine

Glu: Acide glutamique

Gly: Glycine

GO: Gene Ontology

GRAVY: Grand Average of Hydropathy (Grande moyenne d'hydropathie)

His: Histidine
II: Indice d'instabilité
Ile: Isoleucine
Lys: Lysine
Met: Méthionine
MEME: Multiple Em for Motif Elicitation
ml: millilitres
MW: Molecular weight (poids moléculaire)
NCBI: National Center for Biotechnology Information
nm: nanometer
nr: non-redondant
nt: nucleotide
OM: Outer Membrane (membrane externe)
PDB: Protein Data Bank
Pfam: Protein families
PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
P. guariconensis: *Pseudomonas guariconensis*
Phe: Phénylalanine
Phyre²: Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0
pI: point isoélectrique
PM: Plasma Membrane (membrane plasmique)
PR: Pathogenesis-Related
PSI-BLAST: Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool
PSIPRED: PSI-BLAST-based secondary structure PREDiction
R+: nombre de résidus chargés positivement
R-: nombre de résidus chargés négativement
RCSB PDB: Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank
RMN: Résonance Magnétique Nucléaire
SAVES: Structural Analysis and Verification Server
Ser: Sérine
SOPMA: Self-Optimized Prediction Method with Alignment
Thr: Thréonine
TSA: Trypticase Soy Agar
Tyr: Tyrosine

UDP-GlcNAc: uridine-diphospho-N-acétyl glucosamine

YED-P: Yeast-Extract Dextrose Agar Plates

Introduction

Les chitinases (EC 3.2.1.14) font partie des enzymes chitinolytiques capables d'hydrolyser la chitine, le deuxième biopolymère le plus abondant sur cette terre et, avec une certaine affinité, ses dérivés (Dutta *et al.*, 2021). Ce substrat allomorphe est le composant structurel de divers organismes vivants eucaryotes y compris ceux qui sont pathogènes (Beier & Bertilsson, 2013).

Les chitinases ont une variété de sources, de caractéristiques et de mécanismes d'action (Oyeleye & Normi, 2018) et sont efficaces dans une large gamme d'applications respectueuses de l'environnement, notamment la gestion des déchets et la production de chitooligosaccharides. Elles portent également le potentiel en tant qu'agents de lutte biologique (Poria *et al.*, 2021). Commercialement, les chitinases microbiennes (en particulier bactériennes) sont plus économiques et stables pour la production industrielle que celles des plantes et des animaux (Dutta *et al.*, 2021).

Néanmoins, la caractérisation des chitinases bactériennes fait défaut notamment contrairement à celles des eucaryotes. De plus, selon la base de données PDB (Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/>), sur les 890 structures protéiques résolues de chitinase, seulement 307 sont d'origine bactérienne dont deux du genre *Pseudomonas*. (Consultée le 10 mai 2023).

Pseudomonas guariconensis est une espèce bactérienne rhizosphérique ayant une aptitude en tant que PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) de favoriser la croissance des plantes (Patel *et al.*, 2015). Ce groupe fonctionnellement diversifié affecte le développement des plantes par des voies directes et indirectes telles que la production de régulateurs de croissance et l'élimination des phytopathogènes respectivement (Jeyanthi & Kanimozhi, 2018) et reçoit souvent de la nourriture et de l'énergie en retour (Folders *et al.*, 2001).

En raison de l'efficacité possible des chitinases de *P. guariconensis*, une caractérisation *in silico* à l'aide d'outils bioinformatiques a été réalisée comme alternative aux méthodes expérimentales coûteuses, chronophages et parfois incompatibles (Bakli *et al.*, 2020). Notre étude bioinformatique vise à mieux comprendre les propriétés physico-chimiques des chitinases sélectionnées et avoir un aperçu sur leur structure protéique primaire, de la localisation subcellulaire et de la solubilité prévue. Nous nous efforçons également d'analyser leurs structures secondaires et tertiaires prédites ainsi que les analyses fonctionnelles des enzymes modélisées, y compris les domaines conservés, les motifs et la recherche de sites actifs.

Revue

Bibliographique

1. Chitine

1.1. Histoire et définition de la chitine

L'histoire de la chitine remonte à environ 400 ans. J.-C., lorsque Aristote a décrit vaguement la structure coulée entourant un insecte (Moussian, 2019). Après presque 18 siècles, Henri Braconnot a extrait une substance d'une paroi cellulaire fongique et l'a nommée « fungine » (Braconnot, 1811). Une décennie plus tard, Auguste Odier, sans le savoir, a extrait la même substance, mais d'un scarabée et l'a appelée « chitine » (Odier, 1823). En 1859, Georg Städler a suggéré que la chitine était un glucide après l'avoir extraite des crabes (Städler, 1859). Près de deux décennies plus tard, Georg Ledderhose a hydrolysé l'arthropode chitine et découvert son premier dérivé, la glucosamine (Ledderhose, 1876). À la fin des années 1800, Felix Hoppe-Seyler a découvert que la chitine arthropode (insectes, crabes, araignées et scorpions) et la *Pilzcellulose* (le polysaccharide fongique) nommés par Winterstein étaient de la même composition ; un polysaccharide contenant de l'acide acétique et de l'azote (Hoppe-Seyler, 1894).

Il a ensuite été découvert au début du 20^e siècle, que le monomère de chitine était la N-acétyl-glucosamine (Fränkel & Kelly, 1901). Et pourtant, pendant un certain temps, cela a été débattu par des scientifiques tels que Morgulis (1916), jusqu'à ce que Gonell (1926) propose une structure qui a ensuite été confirmée par Meyer et Pankow en 1935, après avoir utilisé la diffraction aux rayons X (cristallographie) pour identifier l' α -chitine, la rendant ainsi largement acceptable (Moussian, 2019). Cela a été suivi par la découverte de la β -chitine en utilisant la même méthode (Lotmar & Picken, 1950), puis de la γ -chitine dans le calmar (Rudall, 1963). Au fil des ans, ces structures de chitine ont été trouvées dans différents organismes à travers différents phylums (Moussian, 2019).

Par conséquent, la chitine est considérée comme l'un des biopolymères les plus anciens (Shaala *et al.*, 2019) et les plus importants en raison de son abondance dans la nature et de sa capacité de renouvellement ; juste derrière la cellulose (Khoushab & Yamabhai, 2010; Song *et al.*, 2012).

1.2. Structure de la chitine et de ses dérivés

La structure de la chitine ressemble beaucoup à celle de la cellulose (**Figure 1**). Alors que la cellulose est un polysaccharide constituée de monomères de glucose (**Figure 1.b**), la chitine diffère par sa possession d'un groupement acétamide (CH_3CONH_2) en position C2 où se trouve généralement le groupement hydroxyle (OH). Ces sucres aminés ou résidus de N-acétyl-D-glucosamine forment des chaînes linéaires homopolymériques par l'intermédiaire

de liaisons glycosidiques β -(1 \rightarrow 4), formant ce que l'on appelle des polysaccharide de GlcNAc ou β -(1 \rightarrow 4) N-acétyl-D-glucosamine (**Figure 1.a**) (Iber *et al.*, 2022; Veliz *et al.*, 2017). Ces unités sont tournées de 180° alternativement, chaque paire formant un disaccharide N, N'-diacétylchitobiose [(GlcNAc)₂] comme sous-unité structurale (Beier & Bertilsson, 2013).

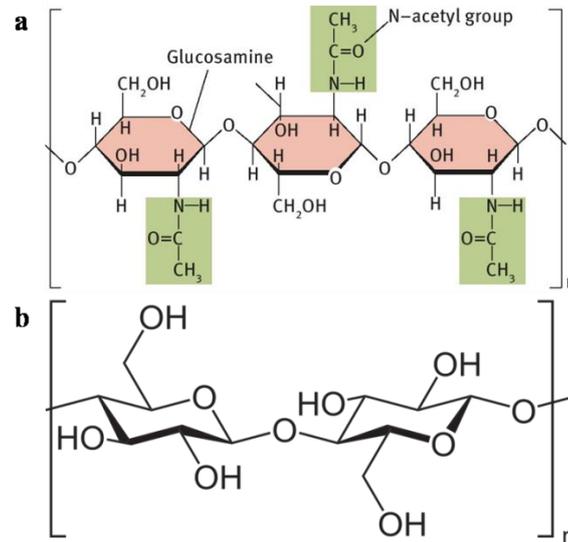


Figure 1: Comparaison entre les structures chimiques de la chitine et la cellulose. (a) Structure chimique de la chitine (Berezina, 2016). **(b)** Structure chimique de la cellulose (Nishiyama *et al.*, 2002).

L'analyse de diffraction aux rayons X a suggéré que la chitine est un produit chimique polymorphe (Rudall & Kenchington, 1973). La structure de chitine fibrillaire se retrouve en trois formes cristallographiques ou allomorphes connues sous le nom de : α , β , and γ chitine (Iber *et al.*, 2022) (**Figure 2**). Ils possèdent chacun des arrangements de chaînes polymères et des propriétés mécaniques différents (Jang *et al.*, 2004).

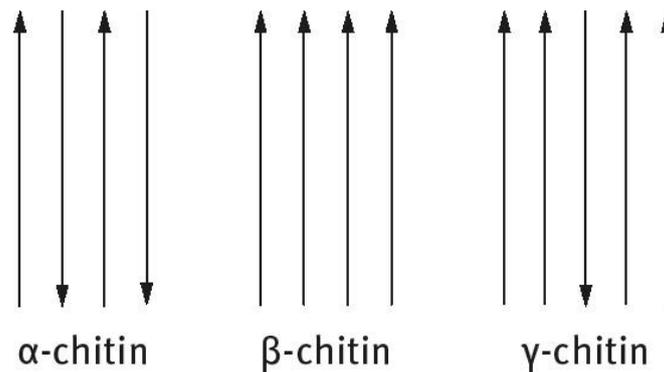


Figure 2: Les différents allomorphes de la chitine (Berezina, 2016).

Les chaînes de α -chitine sont organisées en alignements antiparallèles caractérisés par de fortes liaisons hydrogène (Sikorski *et al.*, 2009). La β -chitine, au contraire, est organisée en chaînes parallèles et possède à la fois des liaisons intermoléculaires et intramoléculaires, ce qui permet la formation de cristaux monocycliques (Ni'mah *et al.*, 2019). La γ -chitine est structurellement proche de l' α -chitine (Kaya *et al.*, 2017) et contient à la fois

des chaînes antiparallèles et parallèles en alternation (Iber *et al.*, 2022). Elle possède (ainsi que l' α -chitine) deux types de liaisons hydrogènes : entre un groupe carbonyle et la chaîne latérale CH₂OH (inter-feuillet) et entre deux amides de deux monomères mais dans le même feuillet de fibre de chitine (intra-feuillet) (Jang *et al.*, 2004).

La chitine peut être trouvée à divers degrés de désacétylation (Beier & Bertilsson, 2013). La désacétylation totale ou partielle de la chitine est connue sous le nom de chitosane (Ravi Kumar, 2000). Mais le seuil exact de N-désacétylation pour séparer entre la chitine et le chitosane n'a pas été défini (Ravi Kumar, 2000).

1.3. Propriétés de la chitine et de ses dérivés

Les propriétés physiques de la chitine sont définies par sa structure. Dans sa forme naturelle, elle est forte, souple et translucide (Iber *et al.*, 2022). Les chaînes antiparallèles de l' α -chitine sont responsables de sa structure stable et rigide (Iber *et al.*, 2022) avec l'indice de cristallinité de ses fibres atteignant 80 % (João *et al.*, 2015). L'écart entre les chaînes de la β -chitine réduit l'indice de cristallinité de 10% (par rapport à l' α -chitine) ce qui la rend plus sensible à la dissolution (João *et al.*, 2015).

L'immiscibilité de la chitine dans l'eau et d'autres solvants organiques à pH neutre contribue à sa résistance et à sa rigidité et est due à ses liaisons hydrogènes inter- et intramoléculaires, à son degré de polymérisation élevé et à son acétylation pratiquement complète (Iber *et al.*, 2022; Song *et al.*, 2012).

Le degré de désacétylation (hydrolyse du groupe acétamide) affecte non seulement les propriétés biologiques (biodégradabilité, biodisponibilité, biocompatibilité, antioxydant...etc.), mais également les propriétés physico-chimiques, telles que la flexibilité, la porosité, la viscosité, la solubilité et la résistance à la traction (Fan *et al.*, 2012; Park & Kim, 2010).

La chitine est très souvent modifiée. Ses différentes chaînes se lient à d'autres polymères structuraux tels que les β -glucanes, des protéines comme la sclérotine et des composés chimiques comme le carbonate de calcium, modifiant ainsi ses caractéristiques (Iber *et al.*, 2022; Rathore & Gupta, 2015). La cristallinité, la pureté et la composition des chaînes polymères de chitine isolées à partir de diverses sources diffèrent selon l'origine et la proportion de chitine qui y est inhérente (Abidin *et al.*, 2020).

1.4. Sources de la chitine dans la nature

L'abondance de la chitine s'incarne dans sa présence en tant qu'élément structurel dans 70% des organismes vivants, y compris les arthropodes, les nématodes, les champignons, les mollusques et les protistes. L' α -chitine est de loin la plus abondante, souvent présente dans

les organismes à carapace dure, suivie de la β - et γ -chitine, les allomorphes les plus flexibles de la chitine (Kaya *et al.*, 2017).

1.4.1. Arthropodes

L'alignement antiparallèle des chaînes α -chitine est ce qui donne aux arthropodes, tels que les insectes et les crustacés, leurs exosquelettes ou coquilles dures (Muzzarelli, 2011).

1.4.1.1. Insectes

A partir de 1,3 million, les insectes représentent 900 000 espèces dans le monde et peuvent contenir jusqu'à 60 % de chitine. Leur exosquelette chitineux est généralement couplé à de la sclérotine dans des proportions diverses. Cela peut être vu en comparant la paroi corporelle d'une chenille, qui est souple car elle est constituée principalement de chitine, et l'élytre d'un coléoptère, qui est rigide en raison de la forte proportion de sclérotine (Azuma *et al.*, 2014; Jayakumar *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2007; Wan & Tai, 2013).

1.4.1.2. Crustacés

Les principales sources commerciales de chitine sont les carapaces de crabe, d'écrevisses et de crevettes (Abidin *et al.*, 2020; Younes & Rinaudo, 2015), un sous-produit de la transformation des aliments marins (Arbia *et al.*, 2013). Ils peuvent contenir plus de 30 % de chitine (Vijayendra & Shamala, 2014) (**Tableau 1**) et sont souvent combinés avec du carbonate de calcium (CaCO₃) pour en faire une forme composite plus forte et moins cassante de la chitine (Azuma *et al.*, 2014; Jayakumar *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2007; Wan & Tai, 2013).

Tableau 1: Sources d'insectes et rendement potentiel de la chitine.

Nom	Rendement de la chitine (%)	Référence
<i>Astacus fluviatilis</i>	36%	(Tolaimate <i>et al.</i> , 2003)
<i>Litopenaeus vannameil</i>	35%	(Mohammed <i>et al.</i> , 2013)
<i>Potamon algeriense</i>	NA	(Yeo <i>et al.</i> , 2008)

NA (Not Available) : Pas disponible.

De nombreuses sources sont découvertes à ce jour pour une évaluation commerciale potentielle telle que *Potamon algeriense*, un crabe d'eau douce répandu existant en Algérie, au Maroc et en Tunisie (Cumberlidge & Daniels, 2008; Yeo *et al.*, 2008).

1.4.2. Champignons

Après les crustacés, les champignons sont la deuxième source de chitine la plus populaire (Iber *et al.*, 2022) avec un rendement pouvant atteindre 20 % (Tombs & Harding, 1998). L' α - et la γ -chitine ont été extraites du mycélium et des parois cellulaires de la levure (Campana-Filho *et al.*, 2007; Younes & Rinaudo, 2015) (**Figure 3**) et même de leurs spores. La chitine se trouve dans plusieurs phylums tels que les deutéromycètes, les ascomycètes, les

basidiomycètes et les zygomycètes, à l'exception des oomycètes qui ont été exclus car leur paroi cellulaire était constituée de cellulose.

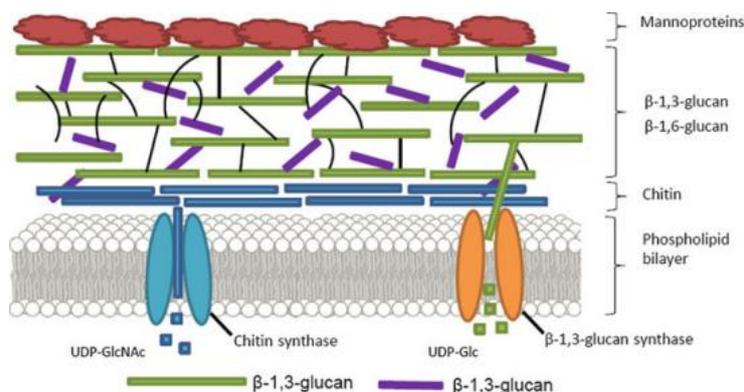


Figure 3: Structure générale de la paroi cellulaire fongique (levure) (Steinfeld *et al.*, 2019).

1.4.3. Nématodes

Les coquilles d'œufs de nématodes parasites des plantes et des animaux tels que *Meloidogyne artiellia* (Fanelli *et al.*, 2005) et *Caenorhabditis elegans* (Johnston *et al.*, 2010) sont également connues pour être composées de chitine et sont nécessaires au développement embryonnaire. C'est aussi un composant du pharynx de certaines espèces (Y. Zhang *et al.*, 2005).

1.4.4. Mollusques

Les recherches de ces dernières années ont montré que les mollusques tels que les aplacophores et les céphalopodes sont riches en β -chitine (Lavall *et al.*, 2007). Il a été extrait de l'encornet de l'espèce *Loligo pealei* (Campana-Filho *et al.*, 2007) et elle peut même être trouvée dans leur bec (Ioelovich, 2014). Les genres *Solenogastres* et *Caudofoveata* appartenant à l'ancien taxon paraphylétique (*Aplacophora*) ont des cuticules à chitine (Peters, 1972).

1.4.5. Protistes

Alors que les informations disponibles sur la chitine se sont développées en ce qui concerne les insectes et les champignons, les recherches sur la biologie de la chitine produite par les protistes sont relativement rares et intermittentes (Steinfeld *et al.*, 2019) (Tableau 2).

Tableau 2: Les sources de chitine découvertes dans les protistes au cours des années.

Espèce	Référence
<i>Chaos illinoisensis</i>	(Sachs, 1956)
<i>Phacodinium metschnikoffi</i>	(Bussers, 1976)
<i>Giardia lamblia</i>	(Ortega-Barria <i>et al.</i> , 1990)
<i>Rhinosporidium seeberi</i>	(Mendoza <i>et al.</i> , 2003)
<i>Plasmodiophora brassicae</i>	(Schwelm <i>et al.</i> , 2015)

1.5. Méthode d'extraction de la chitine et de ses dérivés

Le processus d'extraction précis de la chitine ou de ses produits dépend principalement de la source initiale utilisée, des propriétés de la partie du corps extraite et de l'utilisation prévue. Aucune méthode exacte et standardisée n'a été édictée, malgré plusieurs propositions, pour cette raison. Généralement, le processus consiste en un prétraitement, une déprotéinisation, une déminéralisation et une décoloration pour avoir de la chitine plus ou moins pure. L'ordre exact de ces étapes diffère également selon le traitement privilégié, chimique ou biologique (enzymatique ou par fermentation) (Younes & Rinaudo, 2015) (Figure 4).

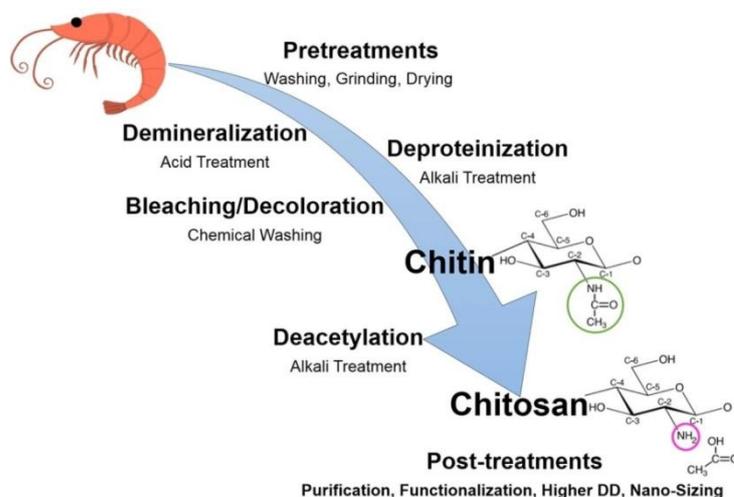


Figure 4: Le procédé de traitement et d'extraction de la chitine : prétraitement (lavage-broyage-séchage), déminéralisation, déprotéinisation, décoloration pour obtenir de la chitine pure suivie d'une désacétylation pour obtenir du chitosane et autres post-traitements (purification, fonctionnalisation, etc.) selon l'utilisation envisagée ou dérivé recherché (Pakizeh *et al.*, 2021).

1.6. Applications de la chitine et de ses dérivés

Les applications de la chitine ainsi que celles de ses dérivés, trouvées sous forme de gels, membranes, nano- et microfibres, ainsi que de nanoparticules (Ravi Kumar, 2000), sont souvent spécifiques à une source (Joseph *et al.*, 2021) et sont assez étendues couvrant de nombreux domaines et industries, notamment celui de la biomédecine et de la biotechnologie ainsi que le traitement des eaux usées, les industries cosmétique, le papier et les textiles et bien d'autres encore (Al-Rooqi *et al.*, 2022) (Figure 5).

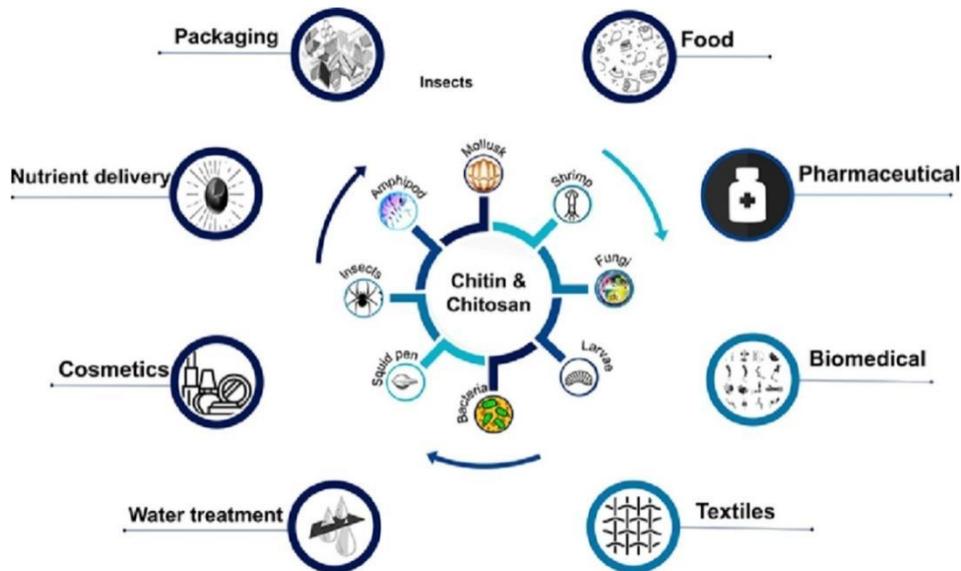


Figure 5: Une représentation graphique illustrant les différents domaines d'utilisation de la chitine et leurs sources correspondantes (Joseph *et al.*, 2021).

En raison de la demande croissante de pratiques agricoles respectueuses de l'environnement, la chitine peut être considérée comme une alternative biologique aux procédures chimiques. Ses utilisations comme engrais, pesticide et régulateur de croissance des plantes lui confèrent un potentiel pour le marché futur (Shamshina *et al.*, 2019).

Les chitooligosaccharides (COS), qui se présentent à divers degrés de polymérisation, sont connus pour leur grande solubilité et leur faible viscosité (Cui *et al.*, 2021; Lodhi *et al.*, 2014). Cela leur permet d'être utilisés pour réduire la pression artérielle et le cholestérol, contrôler les infections et l'arthrite, améliorer la qualité des aliments et la nutrition, entre autres (Lodhi *et al.*, 2014). Ils ne sont pas seulement appliqués en biomédecine et en alimentation, mais aussi pour l'agriculture durable, car ils peuvent être considérés comme des agents de lutte biologique et des éliciteurs de l'immunité innée des plantes (Cui *et al.*, 2021; Das *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2023). L'application de chitine avec des enzymes chitinolytiques qui utilisent ce substrat comme source d'énergie augmente l'efficacité des sécréteurs enzymatiques, garantissant un établissement à long terme pour ces derniers et un profit pour la culture ciblée. Le COS résultant induit une résistance des plantes aux agents pathogènes tels que *Magnaporthe oryzae* et *Phytophthora sojae* car ils sont capables de se lier aux constituants cellulaires chargés négativement, induisant ainsi la lyse cellulaire (Das *et al.*, 2015; Xia *et al.*, 2023).

2. Chitinases

2.1. Les chitinases et leur classification

Un processus chitinoclastique est celui qui entraîne la dégradation globale de la chitine. Si la liaison glycosidique β -(1→4) est hydrolysée, le processus est chitinolytique

(Figure 6) et les chitinases extracellulaires relèvent du spectre des enzymes chitinolytiques (Beier & Bertilsson, 2013; Padder *et al.*, 2022). Elles sont définies comme des glycosyl hydrolases (GH), dont la nomenclature est EC 3.2.1.14, et qui catalysent l'hydrolyse des polymères de chitine (Dutta *et al.*, 2021) en clivant leurs liens glycosidiques de manière non processive *et aléatoire*, générant ainsi des COS (GlcNAc)₂₋₆ (National Center for Biotechnology Information, 2023; Sahai & Manocha, 1993).

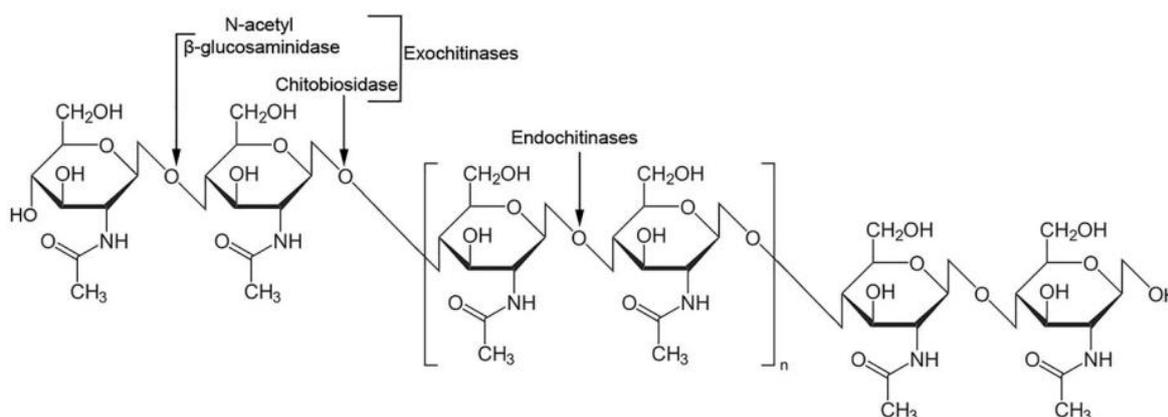


Figure 6: Mode d'action des enzymes chitinolytiques (Mathew *et al.*, 2020).

Sur la base de différents critères, les chitinases sont classées selon leur site d'action, leurs séquences de gènes et d'acides aminés (Poria *et al.*, 2021).

2.1.1. Classification selon le site d'action

En général, les enzymes chitinolytiques sont classées en deux catégories : les enzymes à action endo et exo. Les chitinases appartiennent à la première catégorie car elles peuvent cliver les chaînes de chitine en interne (Figure 7) et générer ainsi des oligomères à faible poids moléculaire de N-acétylglucosamine, (GlcNAc)₂₋₆, y compris le chitobiose, le chitotriose et le diacétylchitobiose (Poria *et al.*, 2021; Sahai & Manocha, 1993).

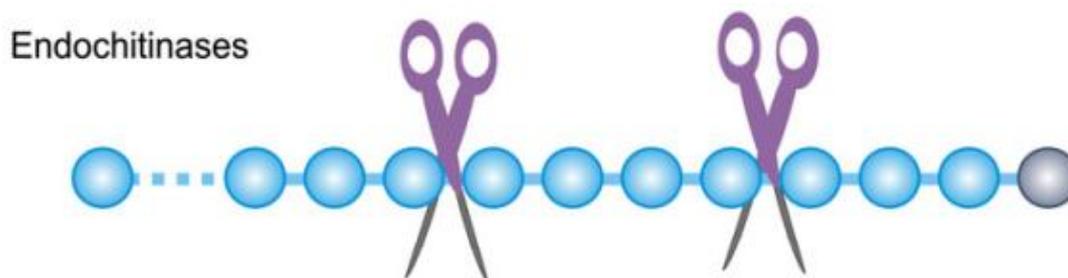


Figure 7: Modèle de clivage des enzymes chitinases avec une activité endo (Seidl, 2008).

2.1.2. Classification selon la séquence du gène

Il existe six classes différentes d'enzymes chitinolytiques, classées en fonction de leurs séquences génétiques (Poria *et al.*, 2021). Ils sont disposés selon les paramètres suivants : point isoélectrique, peptide signal, localisation, inducteurs et composition de la séquence N-terminale (Patil *et al.*, 2000).

Les chitinases de classe I ont un peptide signal riche en leucine ou en valine, sont localisées dans la vacuole (pour les plantes) et possèdent une extrémité N-terminale riche en l'acide aminé Cys. Ils sont en outre classés en deux sous-classes, les classes Ia et Ib en fonction de la nature alcaline de la première et de la nature acide de la seconde. Cette classe est en grande partie composée de chitinases dérivées de plantes (Patil *et al.*, 2000).

Les chitinases de classe II sont des exo-enzymes (Oyeleye & Normi, 2018). Les chitinases de la classe III diffèrent grandement en similarité de séquence par rapport aux classes précédentes (Patil *et al.*, 2000).

Les chitinases de classe IV partagent des caractéristiques similaires avec celles de classe I mais sont plus petite en raison de l'absence de certaines des boucles (random coil) (Oyeleye & Normi, 2018) qui relie deux conformations de structure secondaire (Choi *et al.*, 2013).

Les études sur les deux dernières classes (V et VI) sont quelque peu manquantes. Vraisemblablement, la caractéristique N-terminale riche en cystéine de la plupart des chitinases n'est pas présente dans les enzymes de classe V (Poria *et al.*, 2021).

2.1.3. Classification selon les séquences d'acide aminé

Conformément à la base de données de classification des familles basée sur la similarité des séquences en acides aminés, Carbohydrate-Active EnZymes (CAZy), les chitinases appartiennent à quatre familles GH : GH18, GH19, GH23 et GH48 (Lombard *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2018) (Tableau 3).

Tableau 3: Propriétés des enzymes chitinase dans les quatre familles GH : GH18, GH19, GH23 et GH48 (modifiée) (Poria *et al.*, 2021).

GH Family	Clan	Mechanism	Catalytic Domain 3D Structure	Catalytic Nucleophile/Base	Catalytic Proton Donor	Enzyme Name
GH18	GH-K	Retaining	(β/α) ₈ -barrel	Carbonyl oxygen of C-2 acetamido group of the substrate	Glutamate	Chitinase
GH19	-	Inverting	-	-	-	Chitinase
GH23	-	-	-	-	Glutamate	Chitinase
GH48	GH-M	Inverting	(α/α) ₆ -barrel	-	Glutamate	Chitinase

2.1.3.1. Famille des glycosides hydrolases 18

GH18 est une famille appartenant au clan GH-K (Henrissat & Davies, 1997; Lombard *et al.*, 2014), possédant une domaine catalytique de structure 3D (tridimensionnelle) (β/α)₈ (CAZy, <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>).

Ces enzymes effectuent un mécanisme catalytique qui conserve la même configuration anomérique de son substrat. Ceci est défini comme le mécanisme de rétention (Cohen-Kupiec & Chet, 1998; Poria *et al.*, 2021).

Cette famille partage une homologie structurelle avec les classes III et V et regroupe les chitinases d'insectes, de champignons, de bactéries et de plantes (Oyeleye & Normi, 2018).

2.1.3.2. Famille des glycosides hydrolases 19

Les informations relatives aux donneurs de protons catalytiques et aux nucléophiles de GH19 ne sont pas encore connues (Poria *et al.*, 2021). Il est documenté que son mécanisme de clivage implique une inversion de la configuration anomérique du substrat (Ohnuma *et al.*, 2014). Ses membres sont largement dominés par un contenu α -hélicoïdal élevé et une feuille β à trois brins dans la structure secondaire (H. Li & Greene, 2010; Robertus & Monzingo, 1999). Cette famille comprend des enzymes des classes I, II et IV (Poria *et al.*, 2021), et était identifié à l'origine dans les plantes, pour s'étendre afin d'englober des sources bactériennes, virales et, plus récemment, fongiques (Oyeleye & Normi, 2018).

2.1.3.3. Famille des glycosides hydrolases 23

Les chitinases sont également connues pour appartenir à la famille GH23 composée de membres tels que les lysozymes en raison de la similitude de leurs substrats. Ils présentent une activité de catalyse contre la chitine et ses dérivés avec le glutamate comme donneur de proton connu (Arimori *et al.*, 2013; Poria *et al.*, 2021).

2.1.3.4. Famille des glycosides hydrolases 48

Les membres GH48 appartiennent au clan GH-M qui possède un domaine catalytique caractéristique $(\alpha/\alpha)_6$ et un donneur de proton glutamate. Bien que son activité catalytique sur les substrats chitineux soit assez faible, on pense qu'il a un rôle critique dans l'hydrolyse de la paroi cellulaire des plantes (Chu *et al.*, 2019).

2.2. Sources de chitinases

Les chitinases se manifestent dans d'innombrables organismes, qu'elles soient constituées de chitine comme les champignons et les arthropodes ou qu'elles en soient dépourvues comme les plantes, les bactéries et les vertèbres (Oyeleye & Normi, 2018).

2.2.1. Organismes contenant de la chitine

2.2.1.1. Chitinases fongiques

Les chitinases fongiques appartiennent presque exclusivement à la famille GH18, (Rathore & Gupta, 2015), avec des poids moléculaires allant de 35 à 50 kDa (Poria *et al.*, 2021) et une activité optimale à des températures allant de 40°C à 50°C et un pH de 4 ou 5 (Hamid *et al.*, 2013; Karthik *et al.*, 2014).

Les espèces fongiques sont connues pour produire différentes chitinases (de 10 à 25 en moyenne) pour diverses raisons physiologiques. Ceux-ci comprennent le remodelage de la paroi cellulaire pendant la croissance des hyphes (autolyse) et l'hydrolyse exogène de la

chitine pour la subsistance, la défense ou le parasitisme (Oyeleye & Normi, 2018; Seidl, 2008), telles que *Trichoderma* (Gruber & Seidl-Seiboth, 2012), *Verticillium lecanii* (Yu *et al.*, 2015), et *Clonostachys rosea* (Yang *et al.*, 2010).

2.2.1.2. Chitinases des arthropodes et autres

Des chitinases ont été isolées chez des insectes (*Locusta migratoria* (D. Li *et al.*, 2015)), des crustacés (*Litopenaeus vannamei* (Niu *et al.*, 2018)) des nématodes, des mollusques et des protozoaires (Poria *et al.*, 2021).

Les chitinases GH18 sont les seules chitinases que possèdent les insectes, avec des poids moléculaires atteignant jusqu'à 85 kDa (Rathore & Gupta, 2015; J. Zhang *et al.*, 2011). Ils sont présents dans le liquide de mue qui dégrade l'ancienne cuticule de l'insecte (Merzendorfer & Zimoch, 2003). Ils ont également été découverts dans les glandes salivaires et à venin de certains insectes comme moyen de digérer les cuticules de l'hôte (Rathore & Gupta, 2015). Les crustacés, comme les crabes, les crevettes et les homards, sont également connus pour s'appuyer sur les chitinases pour la digestion, la défense contre les agents pathogènes et la mue des téguments (Beygmoradi *et al.*, 2018; Okada *et al.*, 2013; Salma *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2018).

2.2.2. Organismes ne contenant pas de la chitine

2.2.2.1. Chitinases des vertébrés

La chitine étant un constituant du régime alimentaire de nombreux vertébrés comme les porcelets. Leurs chitinases jouent un rôle important non seulement dans la digestion mais aussi dans l'immunité innée (Kawasaki *et al.*, 2021; Rathore & Gupta, 2015).

2.2.2.2. Chitinases des plantes

Les chitinases végétales ont un poids moléculaire moindre contrairement aux chitinases d'insectes (Rathore & Gupta, 2015) et sont divisées en sept groupes, tous sauf les groupes III et V affiliés à la famille GH19 (Ohnuma *et al.*, 2011, 2012). Tout au long des stades de développement de la croissance des plantes, les chitinases sont produites sous forme de protéines PR (Pathogenesis-Related) en réponse à des stress biotiques (les agents pathogènes) et abiotiques (conditions environnementales ; la sécheresse et le froid) (Poria *et al.*, 2021) (**Tableau 4**).

Tableau 4: Exemples de production de chitinase induite par le stress chez des espèces végétales.

Espece	Le gène de la chitinase exprimé	Facteurs biotiques	Facteurs abiotiques	Reference
<i>Nicotiana tabaccum</i>	NtChiV	Infection virale par le virus de la mosaïque du tabac	Irradiation ultraviolette – blessure	(Umemoto <i>et al.</i> , 2015)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtChiC	Champignons pathogènes	Sel	

2.2.2.3. Chitinases bactériennes

À ce jour, les principaux environnements où les bactéries dégradant la chitine ont été recherchées seraient la rhizosphère, les plantes, l'eau et les intestins des animaux (Dhole *et al.*, 2021) (**Figure 8**).

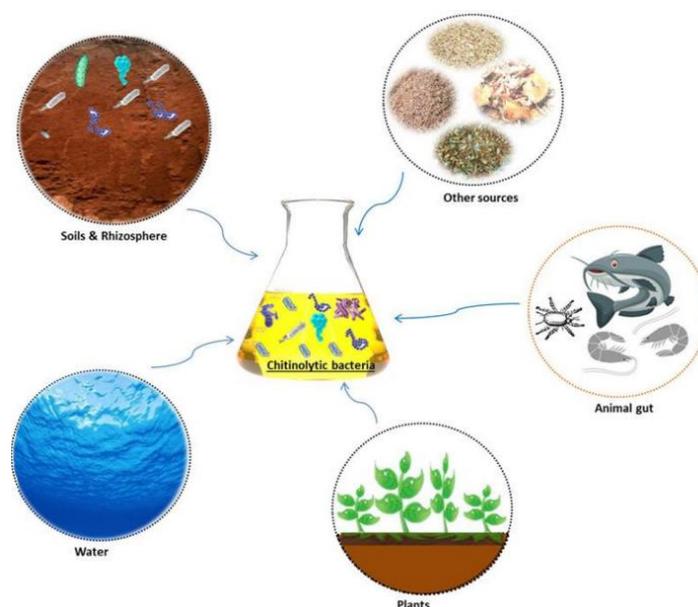


Figure 8: Principales sources d'enzymes bactériennes dégradant la chitine (Dhole *et al.*, 2021).

La plupart des chitinases bactériennes sont caractérisées comme des chitinases de la famille GH18 comme le montre le **tableau 5**. En général, elles peuvent dégrader la chitine dans des conditions anaérobies ou aérobies (Poria *et al.*, 2021) et contribuer ainsi au cycle biogéochimique (Beier & Bertilsson, 2013; H. Li & Greene, 2010). Il est utilisé par les bactéries comme source d'énergie (carbone et azote), comme celles de milieu aquatiques (*Vibrio*, *Aeromonas* et *Micrococcus*) qui repose sur l'hydrolyse des déchets chitineux, ou la pathogénèse contre les hôtes contenant de la chitine (Beygmoradi *et al.*, 2018; Oyeleye & Normi, 2018; Rathore & Gupta, 2015) comme c'est le cas de *Serratia marescens*, inhibiteur des spores fongiques de *Botrytis cinerea* (Someya *et al.*, 2001).

Les actinomycètes, connus pour leurs activités antagonistes contre les pathogènes (Dhole *et al.*, 2021) et des producteurs prolifiques de chitinases comprenant des genres

mésophiles, tels que *Streptomyces*, *Saccharothrix* et *Microbispora*, et des genres *thermophiles*, comme *Thermobifida* et *Streptosporangium* (Mathew *et al.*, 2020).

Les espèces de *Pseudomonas* ont également montré des caractéristiques favorisant la croissance des plantes (Bakli & Zenasni, 2019; Veliz *et al.*, 2017). De plus, il a été rapporté que la nodulation du pois chiche était améliorée grâce à l'activité chitinolytique de *Pseudomonas* ainsi qu'à une augmentation de la toxicité insecticide de nucléopolyédrovirus de *Spodoptera litura* contre ses larves (Sindhu & Dadarwal, 2001; Zhong *et al.*, 2015).

Tableau 5: Sources de chitinases bactériennes et leurs familles GH correspondantes.

Classement supérieur	Espèce	Famille d'enzyme	Référence
Actinomycètes	<i>Streptomyces albolongus</i> ATCC 27414	GH18	(Gao <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Streptomyces alfalfae</i>	GH19	(Lv <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bacillota</i> (synonyme : <i>Firmicutes</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> WB600	GH18	(Pan <i>et al.</i> , 2019)
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	GH18	(Juárez-Hernández <i>et al.</i> , 2019)
<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Ralstonia sp.</i> A-471	GH23	(Arimori <i>et al.</i> , 2013)
<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Serratia marescens</i>	GH18	(Rathore & Gupta, 2015)
	<i>Vibrio harveyi</i>	GH18	(Suginta <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	GH18	(Protein Data Bank, https://www.rcsb.org/)

2.3. Propriétés enzymatiques des chitinases bactériennes

Les propriétés chimiques des chitinases sont complexes et polyvalentes (Hoell *et al.*, 2006) et se diversifient par des différences de spécificité de substrat et de mécanisme catalytique (R. V. Singh *et al.*, 2021). Des études approfondies du système chitinolytique ont montré que les chitinases non processives se séparent complètement du substrat après hydrolyse (Horn *et al.*, 2006).

Sur la base de leur poids moléculaire, les chitinases bactériennes sont plus petites que les chitinases d'insectes, couvrant de poids aussi faible que 20 kDa à 60 kDa. Selon la source à partir de laquelle ils ont été isolés, ils peuvent être actifs à différents pH, températures et points isoélectriques (pI ~4,5–8,5) (Bhattacharya *et al.*, 2007). Le **tableau 6** présente quelques-unes des conditions enzymatiques dans lesquelles l'activité catalytique des chitinases est optimale.

Tableau 6: Le poids moléculaire, pH et température optimales des chitinases provenant de différentes sources bactériennes (modifiée) (Poria *et al.*, 2021).

Bactérie	Poids moléculaire (kDa)	pH optimal	Température optimale (°C)	Référence
<i>Bacillus subtilis</i> WB600	62	5	60	(Pan <i>et al.</i> , 2019)
<i>Microbispora</i> sp. V2	35	3	60	(Kumar <i>et al.</i> , 2018)
<i>Paenibacillus timonensis</i> LK-DZ15	70	4,5	80	(Yahiaoui <i>et al.</i> , 2019)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. DC14	65	9	40	(Makhdoumi <i>et al.</i> , 2015)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. DL-6	113,5	8	20	(X. Wang <i>et al.</i> , 2014)
<i>Pseudomonas</i>	-	4,5	35	(Liu <i>et al.</i> , 2019)
<i>Serratia marescens</i>	55,6	6	55	(J. Li <i>et al.</i> , 2020)
<i>Streptomyces albolongus</i> ATCC 27414	47	5	55	(Gao <i>et al.</i> , 2018)

2.4. Applications des chitinases bactériennes

La nature omniprésente des bactéries, confère à leurs chitinases de nombreuses utilisations, en particulier dans les secteurs de l'agriculture et de la santé ainsi que dans l'industrie des produits de la mer (**Figure 9**).

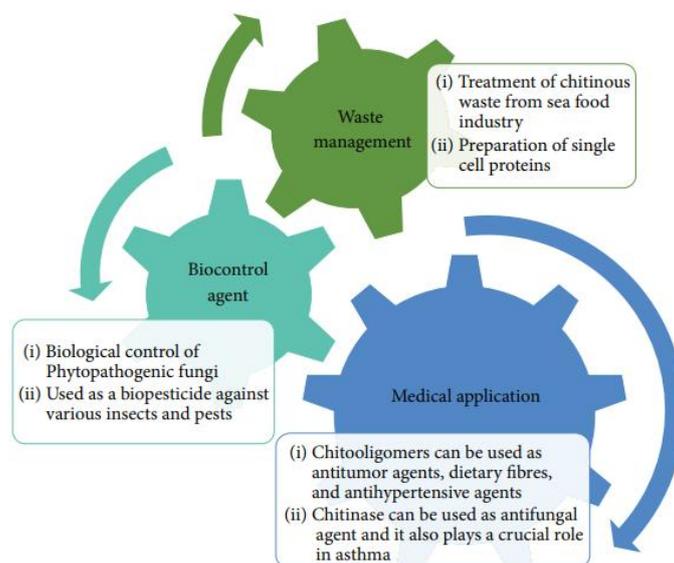


Figure 9: Les grands domaines d'application des chitinases bactériennes et leurs produits générés (Rathore & Gupta, 2015).

Il est d'un grand intérêt l'utilisation des chitinases, principalement de *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Streptomyces*, comme agents de lutte biologique (seuls ou en synergie) pour contrôler et/ou prévenir les phytopathogènes (champignons, insectes et nématodes) pour une production agricole durable et la promotion de la croissance des plantes (Kumar *et al.*, 2022;

Subbanna *et al.*, 2018, 2019). Le **tableau 7** détaille certains effets des applications de chitinase à partir de différentes études menées.

Tableau 7: Les effets des chitinases produites par les bactéries chitinolytiques sur la croissance des plantes et le contrôle des pathogènes.

Souche	Effet(s)	Référence
<i>Pseudomonas putida</i> P3(4)	Inhibition de la germination des spores d' <i>Alternaria solani</i> et de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> .	(N. A. Singh & Shanmugam, 2012)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UB11 et <i>Bacillus cereus</i> UB12	Lutte contre l'anthracnose causée par <i>Colletotrichum capsici</i> au poivre de cayenne.	(Karina <i>et al.</i> , 2020)
<i>Pseudomonas</i> spp. NS-1 et <i>Bacillus</i> spp. NS-22.	Amélioration de la germination et du rendement et réduction des maladies chez <i>Cajanus cajan</i> en dirigeant l'attaque vers les hyphes fongiques.	(Dukare <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bacillus pumilus</i> RST25	Traitement des semences de blé contre les infections fongiques pour une germination optimale.	(Gurav <i>et al.</i> , 2017)
<i>Lysobacter capsica</i> YS1215 et <i>Pseudomonas fluorescens</i> HN1205	Destruction des œufs de nématodes <i>Meloidogyne</i> spp. responsables du nœud racinaire, et entraînant une augmentation de la longueur des pousses.	(Jung <i>et al.</i> , 2014; Lee <i>et al.</i> , 2015; Lee & Kim, 2015)

En ce qui concerne le domaine médical, les chitinases se sont avérées efficaces pour améliorer la puissance des traitements topiques antifongiques et des études suggèrent même leur potentiel en tant qu'additifs (Hamid *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2022). Il a également été suggéré comme stratégie de lutte contre les maladies infectieuses causées par des agents pathogènes véhiculés par certains insectes comme les moustiques (Kumar *et al.*, 2022).

Les chitinases jouent également un rôle vital dans la gestion des déchets de chitine, comme alternative écologique aux procédés chimiques, en réduisant la pollution de l'eau causée par les industries de l'aquaculture et de la pêche et en valorisant les COS obtenu pour les industries biotechnologiques (Kumar *et al.*, 2022; Rathore & Gupta, 2015) comme mentionné précédemment (voir « 1.6. Applications de la chitine et de ses dérivés »).

3. *Pseudomonas guariconensis*

3.1. Historique d'isolement et échantillonnage

Le genre *Pseudomonas*, décrit pour la première fois en 1894 (Migula, 1894), fait partie des genres bactériens les plus divergents et les plus omniprésents sur terre. En fait, ce genre répartis dans des environnements distincts comprenant des éléments vivants (humains, animaux, plantes, algues et champignons) et des éléments non vivants (eau et sol) (Peix *et al.*, 2018).

Le sol rhizosphérique de *Vigna unguiculata* (L.) Walp dans l'écosystème de la savane vénézuélienne dans l'état de Guarico est l'endroit où la bactérie *Pseudomonas guariconensis* LMG 27394 (PCAVU11) a été isolée pour la première fois avec d'autres pseudomonades qui sont connues pour pousser dans des sols acides d'une telle saisonnalité et d'une faible fertilité et possèdent une capacité de solubilisation du phosphate nécessaire à l'atténuation de la teneur naturellement faible en phosphore (Toro *et al.*, 2013).

3.1.1. Procédure d'isolement

La procédure d'isolement telle que décrite et réalisée par Toro *et al.*, (2013) consistait d'abord à créer une suspension bactérienne contenant 10 grammes (g) du sol rhizosphérique entourant la culture *Vigna unguiculata* et 90 millilitres (ml) d'eau stérile, et à agiter pendant 30 minutes, suivi d'une inoculation sur milieu YED-P (Yeast-Extract Dextrose Agar Plates) et incubation pendant une période de 7 jours à une température constante de 28°C.

3.1.2. Caractéristiques phénotypiques

3.1.2.1. Morphologie

La coloration de Gram réalisée selon la méthode de Doetsch (1981) a révélé que les cellules de *P. guariconensis* étaient Gram-négatives (de couleur rose), non-sporulante et en forme de bâtonnet avec une longueur moyenne de 2,5 µm (micromètre) et une largeur de 0,85 µm. Une microscopie à contraste de phase après incubation pendant 48 heures à 22°C en gélose nutritive ainsi qu'une microscopie électronique après incubation dans les mêmes conditions en milieu TSA (Trypticase Soy Agar) ont été réalisées pour vérifier respectivement la motilité et la flagellation. Les résultats ont révélé que *P. guariconensis* possède deux flagelles polaires lui conférant la motilité. Le halo pellucide apparaissant autour des colonies rondes, convexe et translucides de couleur beige indique leur activité de solubilisation de phosphate (Toro *et al.*, 2013).

3.1.2.2. Analyse des pigments fluorescents

Toro *et al.*, (2013) ont suivi la méthode détaillée par Hildebrand *et al.* (1994) pour l'analyse des pigments fluorescents qui implique l'inoculation et l'incubation des cellules dans la gélose King B pour tester la production de pigments et, en cas de résultat positif, l'étude de leurs caractéristiques spectrales à l'aide de la spectrophotométrie. Leurs résultats ont confirmé la production d'un pigment diffusible avec un pic d'absorption de fluorescence de 408 nm (nanomètre) similaire à beaucoup de son genre comme *P. flavescens* (Hildebrand *et al.*, 1994) et *P. argentinensis* (Peix *et al.*, 2005).

3.1.2.3. Caractérisation biochimique

La caractérisation biochimique a été réalisée par Toro *et al.*, (2013) conformément à celle de Peix *et al.*, (2005). Ils ont également effectué des tests sur les microplaques Biolog GN2, API (indice de profil analytique) 20NE, API 32 GN et API 50CH. Des résultats chimio-taxonomiques complets et précis sont détaillés par Toro *et al.*, (2013), mais en général il a été établi que *P. guariconensis* est une bactérie positive à la catalase et à l'oxydase incapable de fermenter les sucres dans les milieux peptonés mais négatif sur la réduction des nitrate et la synthèse de bêta-galactosidase.

3.1.2.4. Milieu et conditions de culture

La souche était capable de croître dans des conditions aérobies à des températures allant de 5°C à 44°C et des limites de pH allant de 5 à 10, ce qui lui a valu le titre de neutrophile aérobie et psychrotolérant (Jin & Kirk, 2018; Männistö & Puhakka, 2002; Toro *et al.*, 2013). Toro *et al.*, (2013) ont également mis en évidence que PCAVU11 était capable de se développer dans un bouillon nutritif additionné de 0 à 6 % de NaCl.

3.1.3. Caractéristiques génotypiques

3.1.3.1. Séquençage de gènes et analyse comparative

Le séquençage de l'ARNr 16S et du gènes domestiques, précédé d'une extraction et d'une amplification, a été réalisé par Toro *et al.*, (2013) dans le but d'analyser de manière comparative la souche alors nouvelle avec d'autres espèces bactériennes. L'ARNr 16S (1524 nt (nucléotide)) de PCAVU11 présentait une similitude de plus de 99 % avec d'autres de son genre tels que *P. taiwanensis*, *P. entomophila*, *P. plecoglossicida* et *P. monteilii*. Le séquençage et la comparaison des gènes domestiques ont prouvé que les gènes domestiques *rpoD* (686 nt), *rpoB* (1049 nt) et *gyrB* (626 nt) responsables du maintien des fonctions de base de la cellule dans le genre *Pseudomonas* (d'où leur conservation élevée et leur évolution lente) (Joshi *et al.*, 2022), coïncidaient avec l'analyse phylogénétique de l'ARNr 16S révélant que PCAVU11 est une souche occupant sa propre branche et regroupée avec les espèces mentionnées ci-dessus.

3.1.3.2. Analyse de la composition en bases azotées et hybridation ADN-ADN

En utilisant la méthode de dénaturation thermique, les résultats de l'analyse de la composition de bases azotées de Toro *et al.* (2013) ont montré que le GC % de l'ADN était égal à 61,5 %, semblable au GC % d'autres espèces habitant du sol du genre *Pseudomonas* comme présenté dans le **tableau 8**.

Tableau 8: Composition en bases d'ADN G + C d'espèces *Pseudomonas* étroitement apparentées (modifiée) (L. T. Wang *et al.*, 2010).

Espèce	Contenu G+C (mol %)
<i>P. taiwanensis</i>	62,7
<i>P. mosselii</i>	63
<i>P. plecoglossicida</i>	62,8
<i>P. monteilii</i>	60

L'hybridation ADN-ADN de la souche PCAVU11 avec celles qui ont montré plus de 99 % de similitude de séquence lors de l'analyse comparative de l'ARNr 16S a révélé que les valeurs moyennes d'hybridation étaient inférieures à 56 %, ce qui est inférieur au seuil recommandé de 70 % (Wayne *et al.*, 1987), menant Toro *et al.*, (2013) pour renforcer leur conclusion selon laquelle PCAVU11 est une espèce à part entière.

3.1.4. Classification

Ces résultats ont permis Toro *et al.*, (2013) d'identifier la souche isolée PCAVU11 comme *Pseudomonas guariconensis*, classée selon le **tableau 9** présenté ci-dessous en fonction de ses caractéristiques phénotypiques et génotypiques.

Tableau 9: Classification systématique de *P. guariconensis*.

Rang taxonomique	Nom taxonomique
Domaine	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Pseudomonadota</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Pseudomonas guariconensis</i>

La classe des Gammaprotéobactéries est connue pour regrouper de nombreux genres de PGPR dont ceux d'*Azotobacter* pour sa capacité à fixer l'azote et *Pseudomonas* avec ses nombreux mécanismes d'action tels que la production d'antibiotique, de chitinase, de β -glucanase, d'ACC désaminase et de sidérophores (Vejan *et al.*, 2016).

3.2. Applications de *Pseudomonas guariconensis*

Depuis son identification, *P. guariconensis* fait l'objet de recherches afin de découvrir ses applications utiles pour l'environnement et le domaine agro-alimentaire. Elle a montré un potentiel en tant qu'agent de bioremédiation contre différents polluants aromatiques et émergents tels que le colorant "Reactive Red 120", grâce à ses capacités de biodégradation et de biosorption en faisant ainsi un candidat pour la production industrielle et la fabrication de lipase (Alhefeiti *et al.*, 2021; Reddy & Osborne, 2020).

De nouvelles souches de *P. guariconensis* sont continuellement isolées et les scientifiques découvrent le large éventail de biomolécules actives que cette bactérie est capable de produire. La souche *Pseudomonas guariconensis* VDA8 possède un amalgame d'activités de lutte biologique (contre les espèces de *Fusarium*) et de nombreux traits favorisant la croissance des plantes tels que la solubilisation du phosphate, et la production de l'ammoniac, l'acide indole acétique et de sidérophores. Elle peut également sécréter un phénol antimicrobien appelé 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), qui à son tour peut agir comme insecticide post-récolte (Kankariya *et al.*, 2022). La souche « mungfali » isolée de la plante d'arachide *Arachis hypogaea* L était capable de se contrarier *Aspergillus niger*, contrôlant ainsi la maladie de la pourriture du collet dans la culture susmentionnée. Elle induit également la production de phytohormones et la solubilisation de minéraux dont le zinc et le potassium (Patel *et al.*, 2015) (**Figure 10**). *Pseudomonas guariconensis* LE3 est également considérée comme un agent de lutte biologique en raison de sa capacité à produire des chitinases et des biosurfactants capables d'éliminer la pourriture charbonneuse causée par *Macrophomina phaseolina*. Ses activités étaient similaires aux souches précédentes (Khare & Arora, 2021).

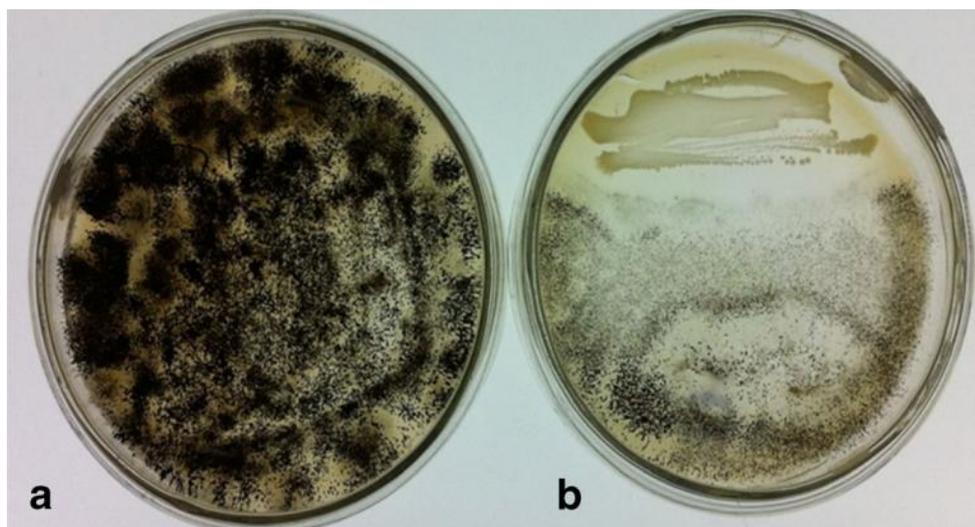


Figure 10: Activité antifongique de *P. guariconensis* (RA1) contre *A. niger*. (a) Plaque témoin (b) Culture de RA1 co-inoculée avec *A. niger* (Patel *et al.*, 2015).

Posséder des propriétés favorisant la croissance des plantes n'est pas nécessairement suffisant dans des conditions stressantes. Mishra *et al.*, (2017) ont révélé que les souches de *P. guariconensis* peuvent être isolées d'environnements extrêmes, comme ce fut le cas de NBRISH4, découvert près des volcans de boue de l'île de Baratang en Inde. Lorsqu'elle est appliquée à la culture de maïs sous stress abiotique (salinité et sécheresse), la solubilisation du phosphate est restée constante.

Compte tenu de l'efficacité potentielle des chitinases (si présentes) produites par la bactérie de la rhizosphère *P. guariconensis*, une caractérisation bioinformatique a été effectuée comme détaillé dans les sections suivantes.

Matériel

et

Méthodes

1. Récupération et caractérisation des séquences protéiques requêtes

La base de données « Protein » du portail NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a été utilisée pour extraire le format FASTA des séquences protéiques primaires de chitinase provenant de l'espèce *Pseudomonas guariconensis* après avoir fondé la recherche sur les mots-clés « *Pseudomonas guariconensis* chitinase ». Deux des neuf résultats ont été choisis (numéros d'accèsion GenBank: SDC64960.1 et SDD76341.1), caractérisées et utilisés comme séquences de requête pour toutes les analyses bioinformatiques (les six autres ayant déjà été caractérisés).

2. Analyse des propriétés physico-chimiques

Les divers paramètres physicochimiques de chaque séquence requête de l'enzyme chitinase ont été déterminés grâce à l'outil d'analyse ExPASy-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>). Les paramètres calculés sont les suivants : le poids moléculaire (MW), la composition en atome, le point isoélectrique théorique (pI), le nombre de résidus chargés positivement et négativement (R+/-), le coefficient d'extinction (EC), la demi-vie, l'indice d'instabilité (II), l'indice aliphatique (AI), et la grande moyenne d'hydrophobie (GRAVY) (Gasteiger *et al.*, 2005).

Le profil d'hydrophobicité a été analysé à l'aide de l'ExPASy ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) (échelle d'hydrophobie), qui évalue l'hydrophobicité et l'hydrophilicité des chaînes latérales d'acide aminés, basé sur l'échelle hydrophobe de Kyte et Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982).

3. Prédiction du signal peptide

En saisissant les séquences d'acides aminés des chitinases récupérées, SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) permet de prédire la présence (ou l'absence) de peptides signal, leur sites de clivage et un aperçu de la localisation de la protéine (Almagro Armenteros *et al.*, 2019).

4. Localisation subcellulaire

Le serveur LocTree3 (<https://roslab.org/services/loctree3/>) est un outil qui a été utilisé pour prédire la localisation subcellulaire de nos enzymes. La sortie comprend un score basé sur la justesse des résultats ainsi que sa précision attendue, l'ontologie des gènes et une homologie proche PSI-BLAST (si disponible) (Goldberg *et al.*, 2014).

5. Prédiction de la solubilité protéique

SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>), un outil en ligne, a été utilisé pour déterminer si les séquences saisies sont caractérisées comme des protéines solubles ou

membranaires en s'appuyant sur des méthodes basées sur les paramètres physicochimiques des séquences protéiques, notamment la longueur de la séquence, les indices d'hydropathie et d'amphiphilie et les charges d'acides aminés. Elle continue à prédire ses hélices transmembranaires (dans ce cas la protéine est membranaire) (Hirokawa *et al.*, 1998).

6. Analyse de la structure secondaire

Pour analyser la structure secondaire de chaque séquence requête, deux outils de prédiction bioinformatiques ont été utilisés.

La première, SOPMA (Self-Optimized Prediction Method with Alignment) (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) prédit les structures secondaires (y compris la description des quatre états conformationnels : hélice α , brin β , coude et boucle), en recherchant dans sa base de données composée de chaînes protéiques non-homologues, et produisent un résultat avec des caractéristiques et une évolution similaires. Toutes les séquences ont été testées avec les paramètres par défaut comme indiqué dans le **tableau 10** (Geourjon & Deléage, 1995).

Tableau 10: Paramètres par défaut de SOPMA.

Number of conformational states	Similarity threshold	Window width
4	8	17

Number of conformational states: Nombre d'états conformationnels, Similarity threshold: Seuil de similarité, Window width: Largeur du fenêtre.

Le serveur PSIPRED (PSI-BLAST-based secondary structure PREDiction) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) prédit également les structures des protéines. La méthode de prédiction de structure secondaire PSIPRED 4.0 (pour les états conformationnels) a été utilisée pour analyser les données de séquence obtenues à partir de PSI-BLAST (Buchan *et al.*, 2013).

7. Analyse de la structure tertiaire

7.1. Prédiction de la structure tertiaire

Afin de créer et d'analyser une structure 3D à partir du format FASTA des séquences requêtes, Phyre² (Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0), (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) était le logiciel de prédiction en ligne utilisé pour modéliser nos séquences protéiques par rapport à des structures présentes dans la base de données Protein Data Bank (PDB), ainsi qu'AlphaFold Protein Structure Database en s'appuyant sur des méthodes de modélisation par homologie (Kelley *et al.*, 2015).

Les modèles structuraux mentionnés auxquels nos séquences sont comparées ont déjà été vérifiés expérimentalement par RMN (résonance magnétique nucléaire) ou par

cristallographie aux rayons X (Pellequer, 1999). Les modèles initiaux prédits ont été optimisés et visualisés à l'aide de l'interface interactive du logiciel graphique PyMOL version 2.3 (DeLano, 2019).

7.2. Raffinement de la structure tertiaire prédite

ModRefiner (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>) est un algorithme de raffinement de la structure des protéines qui garantit des positions précises des chaînes latérales et réseaux de liaisons hydrogène et moins de chevauchements atomiques. Il a été utilisé pour raffiner les modèles des deux chitinases putatives prédites générées par Phyre² afin d'obtenir une structure à haute résolution avec suffisamment de détails et une topologie globale (Xu & Zhang, 2011).

Le logiciel de visualisation PyMOL version 2.3, à nouveau, été utilisé pour optimiser et visualiser les modèles protéiques raffinés de structure 3D (DeLano, 2019).

7.3. Validation des structures tertiaires initiales et raffinées

L'outil PROCHECK, accessible via le serveur SAVES (Structural Analysis and Verification Server) v6.0 (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/>), a été utilisé pour la génération des diagrammes de Ramachandran pour les modèles 3D des chitinases prédits et raffinés par Phyre² et ModRefiner respectivement. L'outil vise à évaluer la qualité stéréochimique des structures protéiques entrées (initiales et raffinées) et à permettre la comparaison entre elles en termes de géométrie normale et/ou inhabituelle des résidus et d'autres propriétés stéréochimiques (Laskowski *et al.*, 2006).

8. Analyse fonctionnelle

8.1. Recherche de domaines conservés

L'identification des domaines conservés présents dans les deux chitinases a été réalisée grâce au service de recherche NCBI CDD (Conserved Domain Database) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) afin d'annoter les domaines fonctionnels dans nos séquences d'acides aminés (J. Wang *et al.*, 2023).

8.2. Recherche de motifs protéiques

Le logiciel MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) Suite version 5.5.1. (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) est un logiciel d'analyse basé sur des motifs pour la découverte de motifs récurrents et sans gaps qui codent des fonctions biologiques à partir de n'importe quelle collection de séquences de protéines non alignées. Le paramètre anr (Any Number of Repetitions) a été choisi pour la distribution des sites afin de confirmer la suspicion que les motifs se répètent (mais ne se chevauchent pas) tout au long d'une seule séquence avec une meilleure précision par rapport aux autres options (Bailey *et al.*, 2015).

8.3. Analyse de site actif

Une autre analyse fonctionnelle réalisée a été celle des sites actifs des enzymes en s'appuyant sur COFACTOR, un serveur web de prédiction de fonction basé sur la structure (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COFACTOR/>). Il détaille non seulement les sites de liaison aux ligands, mais déduit également l'ontologie des gènes et la commission enzymatique à partir de nombreux modèles documentés (homologues ou analogues) (C. Zhang *et al.*, 2017).

Après avoir saisi les structures 3D raffinées de nos enzymes chitinases putatives au format PDB, COFACTOR produira des résultats sur les dix structures PDB homologues les mieux classées, GO (Gene Ontology), EC (Enzyme Commission), site actif et de liaison au ligand de la protéine cible avec le ligand- structures complexes de protéines.

L'optimisation et la visualisation des modèles structuraux COFACTOR choisis ont été réalisées par le logiciel PyMOL mentionné précédemment.

Résultats

et

Discussion

1. Récupération et caractérisation des séquences protéiques requêtes

Après la récupération des séquences d'acides aminés de la chitinase de *Pseudomonas guariconensis* au format FASTA (numéros d'accèsion GenBank: SDC64960.1 et SDD76341.1), les caractéristiques des deux séquences requêtes ont été obtenues à partir des entrées « GenPept » telles que présentées dans le **tableau 11**.

Tableau 11: Caractérisation des séquences requêtes de chitinase provenant de *P. guariconensis*.

Nom	Numéro d'accèsion (GI)	Souche	Nombre d'AA	Structure de l'ADN	Protéine	Région	CDS
putative chitinase (SDC64960.1)	1086853717	LMG 27394	183	linéaire	1-183	1-182 (COG3179)	1-183
putative chitinase (SDD76341.1)	1086851230	LMG 27394	84	linéaire	1-84	-	1-84

Les séquences récupérées choisies ont la même source de souche (LMG 27394), mais des longueurs de séquence et des locus génomiques différents. Dans le cas de SDC64960.1, la région nommée COG3179 est prédite comme étant la partie fonctionnelle générale de la chitinase par opposition à son CDS ou séquence codante qui couvre la totalité de la protéine. On ne peut pas en dire autant de la 2ème séquence de requête codée SDD76341.1.

2. Analyse des propriétés physico-chimiques

Les résultats des caractéristiques physiques et chimiques calculées sont présentés dans le **tableau 12**.

Tableau 12: Propriétés physico-chimiques des chitinase *P. guariconensis*.

Numéro d'accèsion (GI)	MW (Da)	Nombre d'atome	pI	R-	R+	EC	Demi-vie	II	AI	GRAVY
1086853717	20218,05	2855	9,01	20	23	21430	10 heures	36.84	90,22	-0,351
1086851230	9657,94	1332	8,68	9	11	23615	10 heures	46.47	76,90	-0,507

MW : poids moléculaire, pI : point isoélectrique théorique, R+ : nombre de résidus chargés positivement, R- : nombre de résidus chargés négativement, EC : coefficient d'extinction, II: indice d'instabilité, AI : indice aliphatique, GRAVY : grande moyenne d'hydropathie.

Le poids moléculaire (MW) est déterminé en additionnant les masses isotopiques moyennes des acides aminés présents dans la protéine et la masse isotopique moyenne d'une molécule d'eau pour obtenir des valeurs en Daltons (Da) (Gasteiger *et al.*, 2005). Par conséquent, le poids moléculaire d'une séquence protéique est en corrélation avec le nombre total d'atomes et, plus spécifiquement, la composition atomique de la séquence.

Le point isoélectrique (pI) est aussi calculé à partir des séquences d'acides aminés (Bjellqvist *et al.*, 1993). Pour les chitinases putatives, gi|1086853717 et gi|1086851230, les résultats ont montré un pI de 9,01 et 8,68 respectivement, ce qui est supérieur à l'intervalle habituel de 4,5 - 8,5 abordé par Bhattacharya *et al.*, (2007) chez les chitinases bactériennes. A ces valeurs, les enzymes n'ont pas de charge nette (électriquement neutre) car les charges positives et négatives sont égales (Godara *et al.*, 2022). La charge nette d'une séquence d'acides aminés est largement affectée par le nombre de résidus chargés positivement (R+) et négativement (R-) (« Arg + Lys » et « Asp + Glu » respectivement). Sur cette base, on peut en déduire que les deux séquences protéiques primaires sont de nature modérément alcaline.

La valeur de pI donne également un aperçu de la charge nette, qu'elle soit positive ou négative, de chaque séquence dans des conditions physiologiques spécifiques. Cela indique à son tour (dans une certaine mesure) la solubilité de la protéine à un pH désigné (Mohamad Sobri *et al.*, 2020). Selon Nolsøe & Undeland (2009) , une protéine est à sa plus faible solubilité si elle est placée dans un pH de la valeur pI, en raison de l'induction de l'agrégation des protéines et des interactions hydrophobes causées par la rareté de la répulsion électrostatique résultant d'une charge nette nulle (Nolsøe & Undeland, 2009). Au contraire, une répulsion électrostatique forte et mutuelle entrave la précipitation et augmente la solubilité ou les interactions hydrophiles (Lone *et al.*, 2015).

Le coefficient d'extinction (EC) indique la quantité de lumière qu'une protéine absorbe à 280 nm, ce qui peut être utile lors de dosage spectrophotométrique. Mais parce que la cystéine (Cys) n'absorbe pas bien à des longueurs d'onde supérieures à 260 nm, contrairement aux tyrosine et tryptophane (Gasteiger *et al.*, 2005), nos résultats étaient basés sur l'hypothèse que toutes les paires de Cys apparaissaient sous forme de cystines.

La prédiction du temps nécessaire pour que la moitié des protéines d'une cellule disparaissent après leur synthèse dans la cellule est appelée la demi-vie (Gasteiger *et al.*, 2005). Cela dépend de l'identité du résidu N-terminal (Bachmair *et al.*, 1986), qui est la méthionine pour les séquences primaires. C'est pourquoi on a extrapolé le résultat d'*E. coli* (*in vivo*) avec une demi-vie estimée à 10 heures.

L'indice d'instabilité (II) donne une estimation de la stabilité de la protéine dans un tube expérimental. Les protéines soient stables lorsque leur indice d'instabilité est inférieur à 40. Mais lorsque la valeur de l'indice d'instabilité est supérieure à 40, la protéine est considérée comme instable (Gasteiger *et al.*, 2005). La raison en est l'apparition de certains dipeptides perturbant la stabilité (Guruprasad *et al.*, 1990). La valeur de l'indice d'instabilité pour l'enzyme gi|1086853717 était de 36,84, donc < 40, ce qui indique que la protéine est

stable. En revanche, la valeur de l'indice d'instabilité pour gi|1086851230 était de 46,74, ce qui est supérieur à 40, indiquant que la protéine est instable.

L'indice aliphatique (AI) d'une protéine est le volume relatif occupé par ces chaînes latérales aliphatiques, portées par les acides aminés : alanine, valine, isoleucine et leucine (Ikai, 1980). Plus les valeurs sont élevées, plus la protéine est thermiquement stable et hydrophobe (Farhan *et al.*, 1948; Panda & Chandra, 2012). Les valeurs élevées de l'indice aliphatique (90,22 et 76,90) indiquent que les protéines sont thermostables.

En comparant ces résultats à d'autres études réalisées sur différentes espèces bactériennes (dont *Pseudomonas*), les chitinases produites par *P. guariconensis* LMG 27394 sont actives et stables à très hautes températures comme le montre le **tableau 13** ci-dessous.

Tableau 13: Valeurs de thermostabilité des chitinases bactériennes par rapport aux chitinases de *P. guariconensis* LMG 27394.

Espèce	Thermostabilité (°C)	Référence
<i>P. guariconensis</i> LMG 27394	90,22	-
	76,90	
<i>Pseudomonas</i> sp. TKU008	≈ 50	(S.-L. Wang <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> DSM 14401	40	(Ren <i>et al.</i> , 2022)

P. guariconensis LMG 27394 (étant une bactérie mésophile) possédant une chitinase thermostable sans intervention biotechnologique est également favorable à une application industrielle (Mathew *et al.*, 2021).

GRAVY (Grande Moyenne de l'Hydrophatie) est calculée en tenant compte des propriétés hydrophobes et hydrophiles (hydrophatie) des acides aminés. C'est la somme d'hydrophatie de tous les acides aminés divisée par le nombre de résidus dans la séquence (Kyte & Doolittle, 1982). En termes simples, un score positif signifie l'hydrophobicité et vice versa (Chang & Yang, 2013). D'après nos résultats, les chitinases sont hydrophiles. L'outil ProtScale permet de prédire la position hydrophobe minimale et maximale ainsi que leur score pour chaque séquence de chitinase (Kyte & Doolittle, 1982) (**Tableau 14**).

Tableau 14: Score hydrophobe et position des protéines chitinase de *P. guariconensis* à l'aide de l'outil ProtScale.

Numéro d'accension (GI)	Position		Score	
	Min	Max	Min	Max
1086853717	91,92	45	-2.489	1.689
1086851230	8	36,37	-1.922	0.511

3. Prédiction du signal peptide

Pour les deux séquences protéiques, gi|1086853717 et gi|1086851230 de *P. guariconensis*, le serveur SignalP n'a suggéré aucun des types de peptides signal procaryotes dans l'extrémité amino-terminale.

4. Localisation subcellulaire

Le serveur de localisation subcellulaire LocTree3 a révélé que les deux chitinases putatives étaient sécrétées dans des régions extracellulaires, comme détaillé dans le **tableau 15**.

Tableau 15: Résultats de l'analyse de la localisation subcellulaire des séquences gi|1086853717 et gi|1086851230 de *P. guariconensis*.

ID de la protéine	Score de fiabilité	Précision attendue	Classe de localisation	GO
gi 1086853717	46	91%	Sécrétée	extracellular region GO:0005576
gi 1086851230	69	94%	Sécrétée	extracellular region GO:0005576

Des informations sur la précision attendue et leur fiabilité (score) des deux séquences sont également mentionnées. Des schémas de la localisation prédite dans la cellule ainsi que des visualisations des résultats de la prédiction des voies enzymatiques proposées et leurs scores sont illustrés dans la **figure 11**.

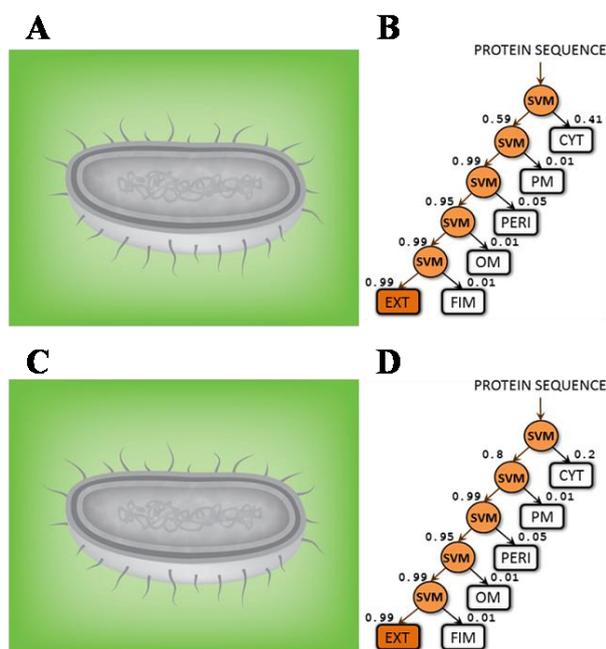


Figure 11: Résultats de prédiction de la localisation subcellulaire pour les chitinases putatives. (A) Schéma de la localisation prédite colorées en vert pour la séquence gi|1086853717. **(B)** Visualisation de la voie enzymatique prédite avec leur score pour la séquence gi|1086853717. **(C)** Schéma de la localisation prédite colorées en vert pour la séquence gi|1086851230. **(D)** Visualisation de la voie enzymatique prédite avec leur score pour la séquence gi|1086851230.

Les protéines sécrétées sont souvent porteuses de peptides signal, mais l'analyse précédente des peptides signal a montré le contraire. Cela peut être appelé la méthode de sécrétion non classique qui a été observée dans plusieurs protéines bactériennes sécrétées sans peptide signal apparent (Bendtsen *et al.*, 2005).

5. Prédiction de la solubilité protéique

Le serveur SOSUI calcule l'hydrophobicité moyenne et la densité de la charge nette afin de faire la distinction entre les protéines solubles et transmembranaires avec une précision de 99%. Les résultats des diagrammes d'hydropathie et de charge pour les deux séquences requêtes de *P. guariconensis*, gi|1086853717 et gi|1086851230 (**Figure 12**), ont montré qu'ils sont des protéines solubles non transmembranaires, renforçant encore l'hypothèse prédisant que les chitinases putatives requêtes sont probablement extracellulaire. La raison en est l'absence d'hélice transmembranaire primaire, souvent hydrophobe, dans sa région terminale et caractéristique des protéines transmembranaires (Hirokawa *et al.*, 1998).

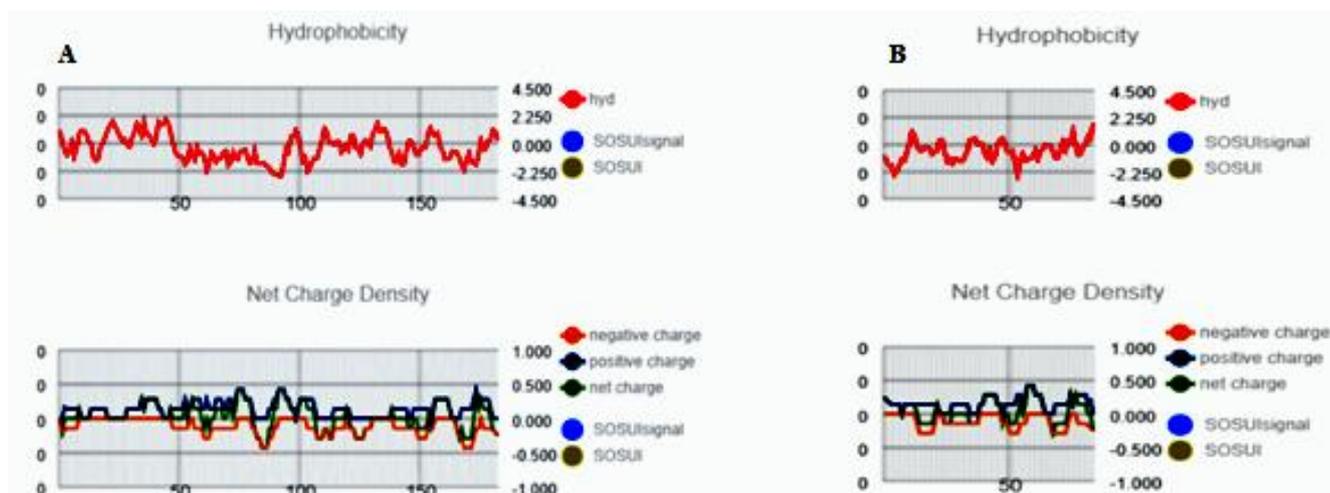


Figure 12: Diagrammes d'hydropathie et de charge nette pour la prédiction de la solubilité protéique des chitinases putative de *P. guariconensis* générée par le serveur SOSUI. (A) Résultats de prédiction de la solubilité protéique de la séquence gi|1086853717. (B) Résultats de prédiction de la solubilité protéique de la séquence gi|1086851230.

On peut également remarquer que ces résultats sont fortement corrélés avec ceux de l'analyse physico-chimique (nombre de R^{+/-} ; score et position hydrophobes de ProtScale) à l'exception de la séquence gi|1086851230 en termes de son hydrophobicité.

6. Analyse de la structure secondaire

La structure secondaire a été prédite à l'aide de deux outils. Le premier, SOPMA, a démontré la domination des hélices α (α -hélices), suivie par des boucles (random coils), puis des brins β (extended strands) et des coudes (β -turns) avec des valeurs égales pour la protéine gi|1086853717. Cependant, la protéine gi|1086851230 était dominée par des hélices α , puis

des boucles, suivies de coudes et enfin de brins β prenant la dernière place. Les pourcentages de chaque état conformationnel dans chaque séquence GI sont indiqués dans le **tableau 16**.

Tableau 16: Prédiction de la structure secondaire des chitinases de *P. guariconensis* par SOPMA.

Numéro d'accèsion (GI)	α -helix	Extended strand	β -turn	Random coil
1086853717	57,38%	4,92%	4,92%	32,79%
1086851230	57,14%	3,57%	5,95%	33,33%

Les mêmes séquences ont été analysées par PSIPRED pour obtenir la structure secondaire prédite (**Figure 13 et 14**). Cet outil a généré à la fois des schémas d'annotation des séquences et des représentations graphiques. Ils confirment qu'il n'y a pas de peptides signal ou d'hélices transmembranaires. Les résultats de la représentation graphique PSIPRED ont montré une grande confiance dans la prédiction.

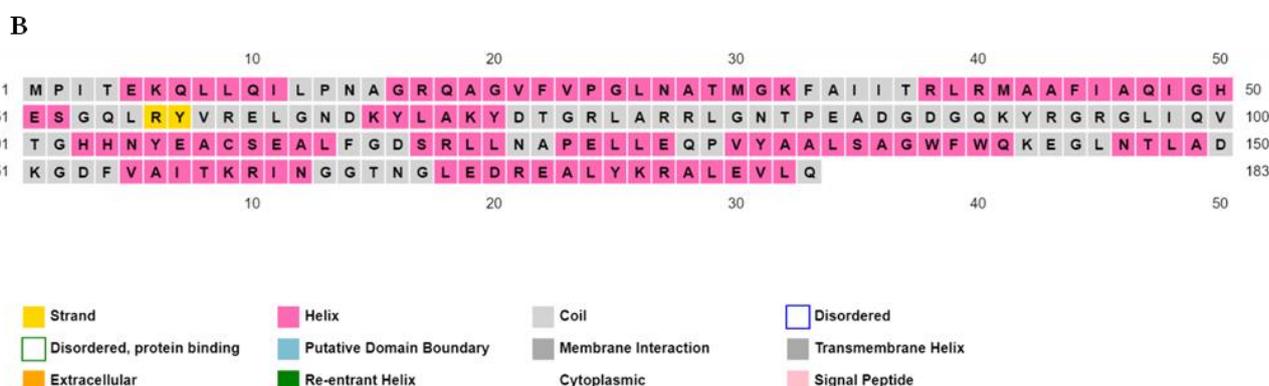
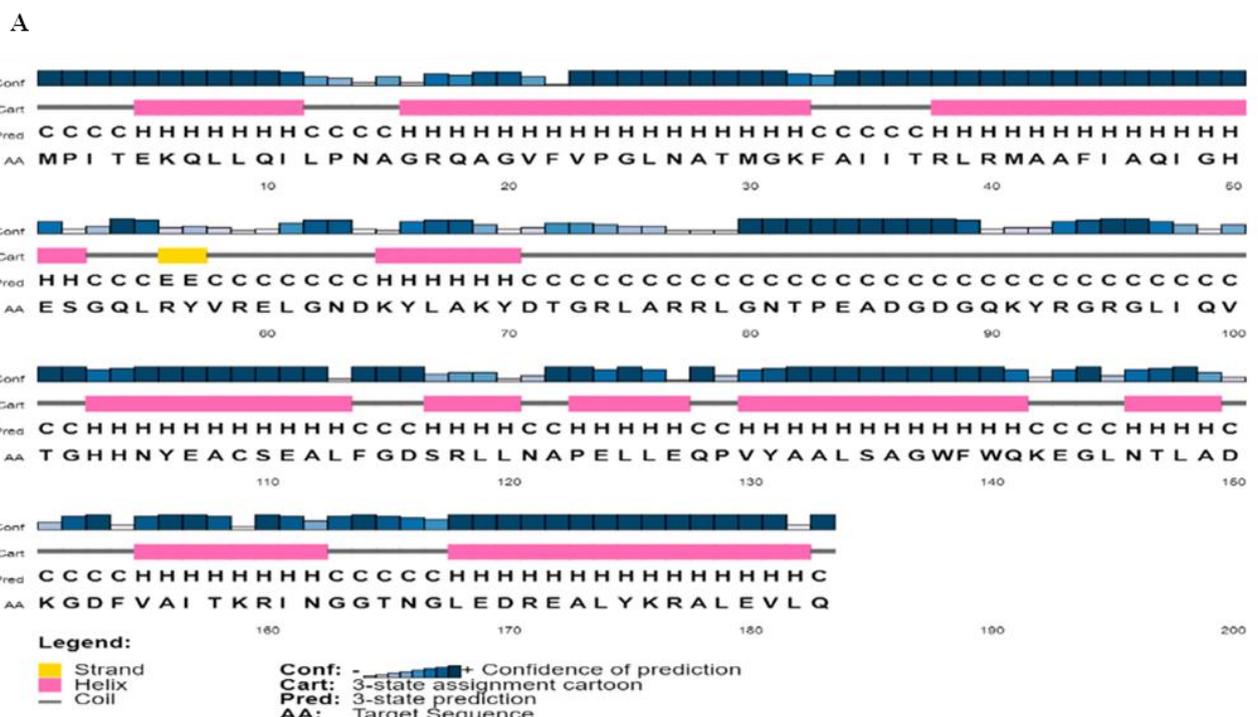
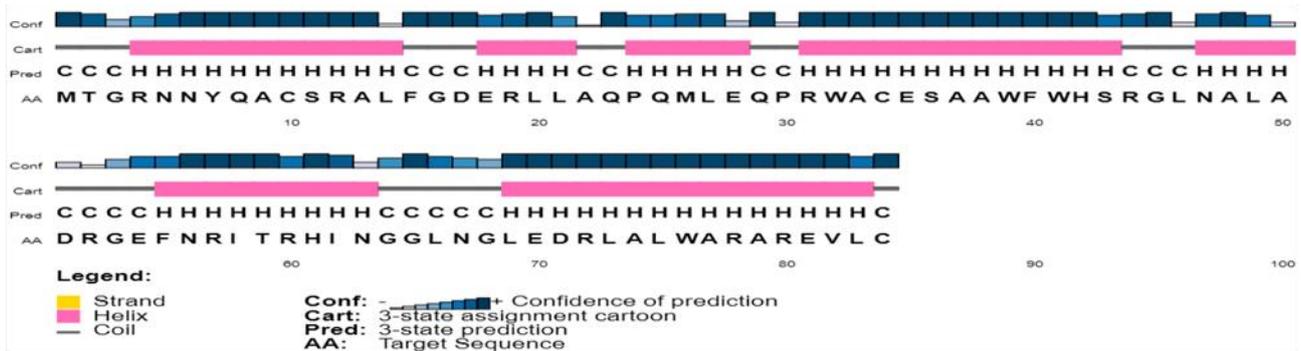


Figure 13: Prédiction de la structure secondaire de la chitinase de *P. guariconensis* (gi|1086853717) par le serveur PSIPRED. (A) Représentation graphique. (B) Diagramme d'annotation de séquence. La légende des

couleurs montre les différentes conformations de la structure secondaire (jaune représentant les brins β , rose pour les hélices α et gris pour les boucles).

A



B

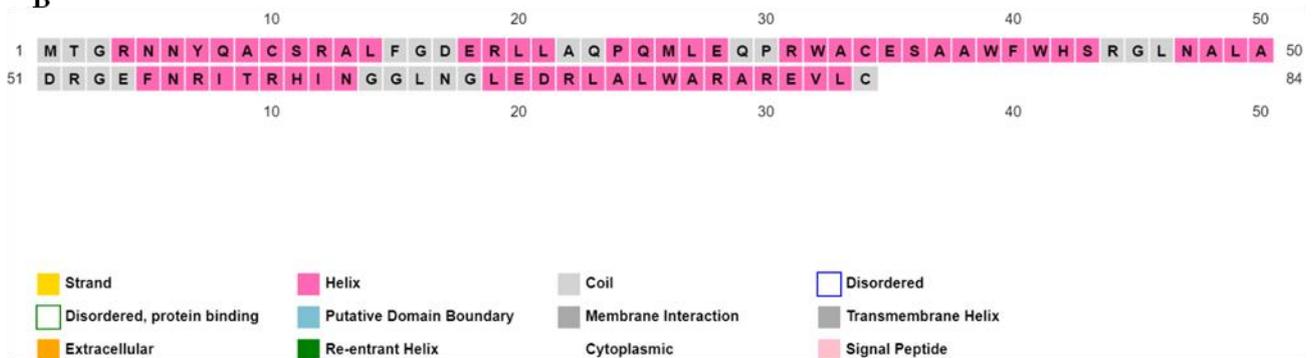


Figure 14: Prédiction de la structure secondaire de la chitinase de *P. guariconensis* (gi|1086851230) par le serveur PSIPRED. (A) Représentation graphique. (B) Diagramme d'annotation de séquence. La légende des couleurs montre les différentes conformations de la structure secondaire (jaune représentant les brins β , rose pour les hélices α et gris pour les boucles).

Lors de la comparaison des deux analyses, PSIPRED ne produit pas de coudes dans ses résultats affichés, tandis que SOPMA donne un aperçu de leur présence, de leur pourcentage et de leur position. Un autre point de différence détecté entre les résultats des deux serveurs est le fait que SOPMA a prédit la présence des brins β dans la chitinase putative gi|1086851230 alors que PSIPRED ne l'a pas fait. Et pourtant, les résultats de prédiction de la structure secondaire de PSIPRED pour les deux séquences requêtes semblent être en accord avec ceux de SOPMA, en termes de dominance de certains éléments structuraux secondaires démontrant la haute fiabilité de cette prédiction, mais pas tellement en ce qui concerne les pourcentages exacts de lesdites structures secondaires.

Cette analyse de structure secondaire nous permet de proposer l'hypothèse que les deux chitinases putatives appartiennent à la famille GH19, car selon H. Li et Greene (2010), ses membres chitinase sont connus pour posséder un pourcentage élevé d'hélices α (H. Li & Greene, 2010). Une caractérisation plus poussée *in silico* prouvera ou réfutera spéculation susmentionnée.

7. Analyse de la structure tertiaire

7.1. Prédiction de la structure tertiaire

Afin de prédire les structures 3D à l'aide d'une approche de modélisation basée sur l'homologie, le logiciel Phyre² a été utilisé. Ses résultats analytiques pour les chitinases de *P. guariconensis* gi|1086853717 et gi|1086851230 ont proposé le modèle PDB c4ok7A (la chaîne A de la structure de l'endolysine du bactériophage spn1s de *Salmonella typhimurium*) comme le modèle le plus homologue (**Figure 15**).

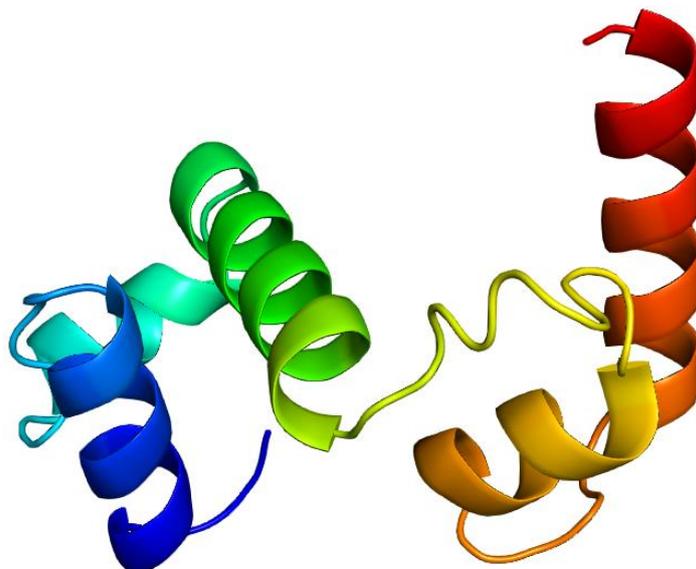


Figure 15: La structure 3D du modèle le plus homologue, c4ok7A, suggéré par Phyre² comme prédiction de la structure tertiaire des séquences gi|1086853717 et gi|1086851230 et visualisée à l'aide de PyMOL.

Le **tableau 17** indique que nos structures secondaires sont des hydrolases qui ont été modélisées avec une confiance de 100 %, un modèle à score élevé et une couverture suffisante.

Tableau 17: Résultats de prédiction de la structure tertiaire des chitinases putatives de *P. guariconensis* par Phyre².

Numéro d'accèsion (GI)	Modèle	Confiance (%)	Couverture (%)	Identité (%)
1086853717	c4ok7A	100 %	96 %	40 %
1086851230	c4ok7A	100 %	94 %	48 %

7.2. Raffinement de la structure tertiaire prédite

Le raffinement structural a été exécuté par le serveur en ligne ModRefiner pour améliorer la qualité des modèles tridimensionnels prédits par Phyre² à partir de chitinases de *P. guariconensis*. PyMOL a été utilisé pour visualiser de manière interactive les modèles raffinés et produire des images optimisées et de haute qualité pour chacun, comme présenté dans les **figures 16**.

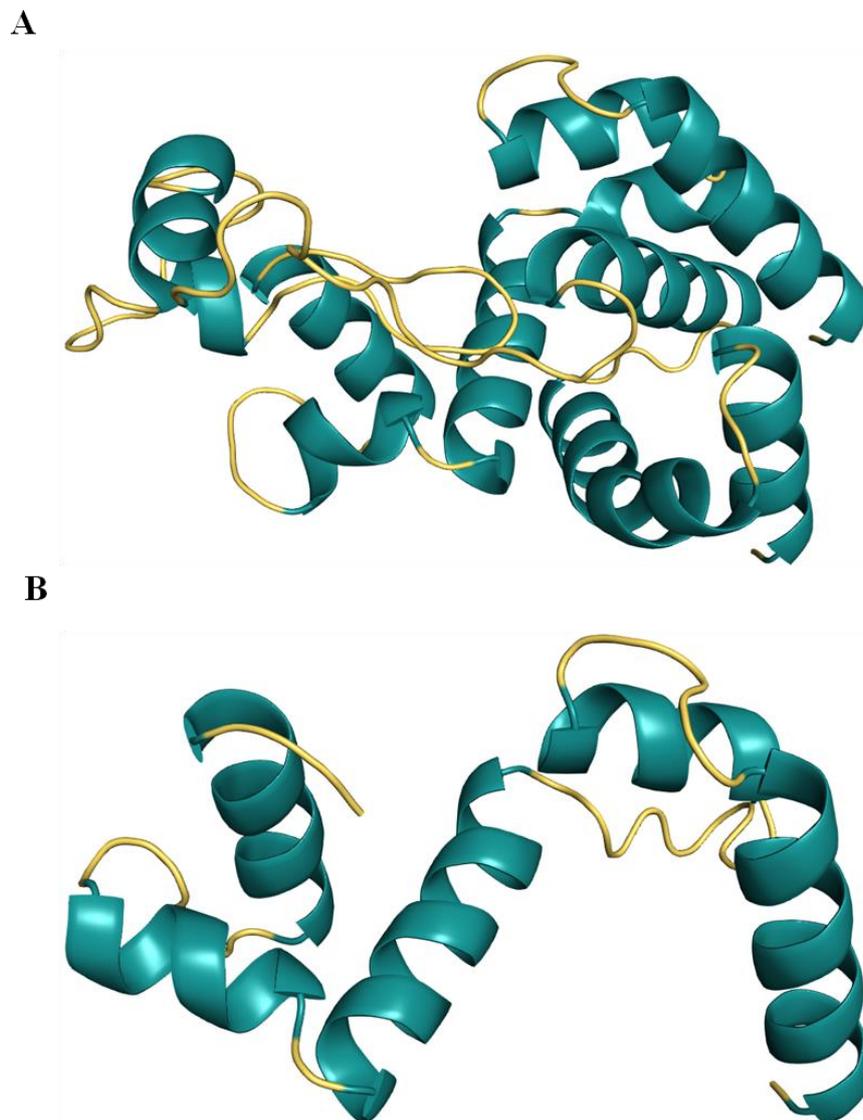


Figure 16: Structures 3D raffinées des chitinases de *P. guariconensis* raffinées par ModRefiner et visualisées par le logiciel PyMOL. (A) Modèle raffiné de la chitinase gi|1086853717. (B) Modèle raffiné de la chitinase gi|1086851230. Les composants de la structure secondaire sont colorés bleu canard pour les hélices α et jaune-orange pour les boucles.

7.3. Validation des structures tertiaires initiales et raffinées

Afin de valider nos structures raffinées de chitinases putatives générées par ModRefiner et d'observer s'il y avait une amélioration dans la qualité stéréochimique par rapport aux modèles initiaux créés par Phyre², le programme PROCHECK du serveur d'analyse et de vérification structurelle SAVES v6.0 a été utilisé pour construire des diagrammes de Ramachandran pour les deux modèles de gi|1086853717 (**Figure 17**) et gi|1086851230 (**Figure 18**).

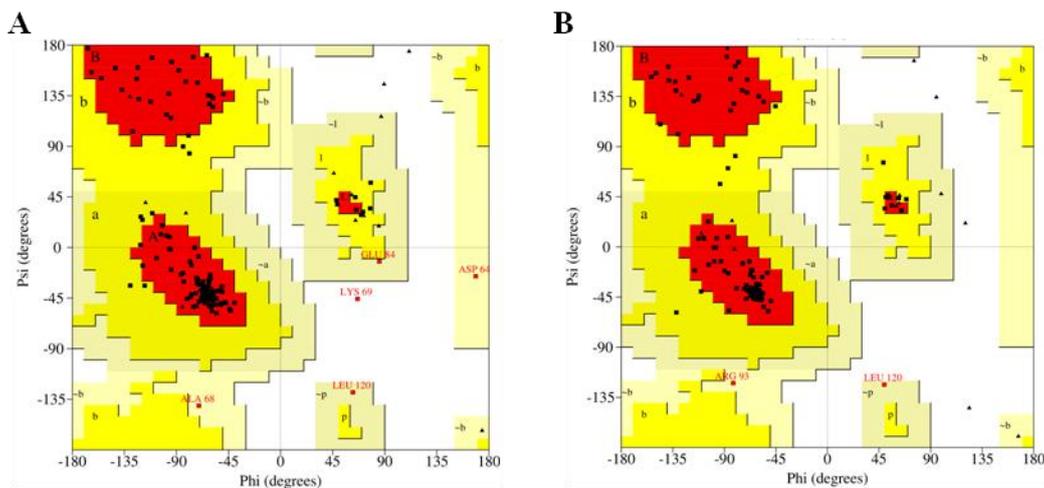


Figure 17: Résultats de la validation des structures de chitinase de *P. guariconensis*, gi|1086853717, par le diagramme de Ramachandran généré par PROCHECK (serveur SAVES). (A) Modèle initial. (B) Modèle raffiné. Les régions les plus favorisées sont désignées par A, B et L (en rouge), tout en étant les régions autorisées supplémentaires sont désignées par a, b, l et p (en jaune), les régions généralement autorisées sont désignées par ~a, ~b, ~l et ~p (en jaune clair), et les régions non autorisées sont colorées en blanc. Les résidus non glyciniques et non proliniques sont représentés par des carrés remplis de noir, et les glycines non-terminales sont représentées par des triangles remplis de noir.

Comme nos modèles structuraux sont en grande partie composés d'hélices α , la validation vérifie que les acides aminés tels que la glycine, dont le groupe R est trop petit, la proline, en raison de sa géométrie irrégulière, et la tyrosine et le tryptophane, dont les groupes R sont trop grands, ne incitent à l'encombrement stérique et affectent donc l'intégrité structurale de ces hélices (Bajaj *et al.*, 2007; Krieger *et al.*, 2005; Wlodawer, 2018).

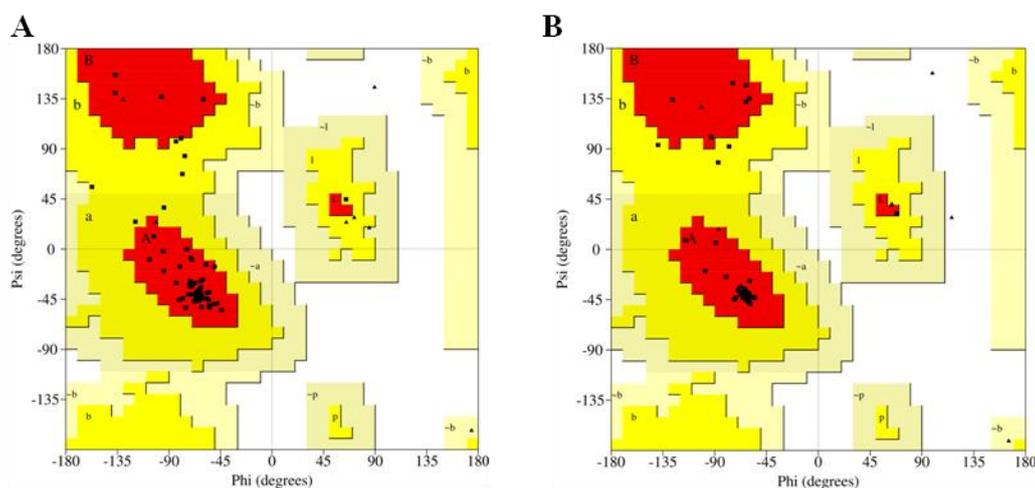


Figure 18: Résultats de la validation des structures de chitinase de *P. guariconensis*, gi|1086851230, par le diagramme de Ramachandran généré par PROCHECK (serveur SAVES). (A) Modèle initial. (B) Modèle raffiné. Les régions les plus favorisées sont désignées par A, B et L (en rouge), tout en étant les régions autorisées supplémentaires sont désignées par a, b, l et p (en jaune), les régions généralement autorisées sont désignées par ~a, ~b, ~l et ~p (en jaune clair), et les régions non autorisées sont colorées en blanc. Les résidus non glyciniques et non proliniques sont représentés par des carrés remplis de noir, et les glycines non-terminales sont représentées par des triangles remplis de noir.

Les pourcentages des résidus détectés dans les diverses régions des diagrammes de Ramachandran ont été présentés dans le **tableau 18**. On remarque qu'il y a une amélioration

significative de la qualité stéréochimique globale des structures raffinées. Le pourcentage de résidus dans les régions favorables a augmenté pour dépasser le seuil de 90% attendu des modèles de bonne qualité. Une diminution des pourcentages de résidus trouvés dans les régions supplémentaires autorisées, généreusement autorisées et interdites peut également être discernée.

Tableau 18: Statistiques de la validation des structures tertiaires initiales et raffinées des chitinases de *P. guariconensis* par les diagrammes de Ramachandran.

ID de la protéine (Nombre de résidus totaux)	Type de modèle	Régions favorables (%)	Régions autorisées supplémentaires (%)	Régions généreusement autorisées (%)	Régions non autorisées (%)
gi 1086853717 (182)	Initial	86,3%	10,5%	2,6%	0,7%
	Raffiné	92,8%	5,9%	1,3%	0%
gi 1086851230 (83)	Initial	88,9%	11,1%	0%	0%
	Raffiné	95,8%	4,2%	0%	0%

Dans le modèle initiale de la protéine gi|1086853717, un seul résidu (LYS 69) a été trouvé dans la région non autorisée et a ensuite été corrigé après raffinement. Les résidus de glycine sont autorisés dans les régions blanches non autorisées car ils ne possèdent pas de chaînes latérales et ne favorisent donc pas l'encombrement stérique entre le groupe C β méthylène de la chaîne latérale et les atomes de la chaîne principale (Imamoto *et al.*, 2008).

8. Analyse fonctionnelle

8.1. Recherche de domaines conservés

Les domaines protéiques sont des unités évolutives récurrentes et conservées de séquences polypeptidiques responsables de leur structure et donc de leur fonction (Fong & Marchler-Bauer, 2008). La plupart des protéines possèdent plusieurs domaines (Vogel *et al.*, 2004) comme le montre la **figure 19.A**, mais il existe des cas dans les petites protéines où elles possèdent un seul domaine (Schmidt & Davies, 2007) comme on l'observe dans la **figure 19.B** où aucun hit spécifique n'a été détecté.

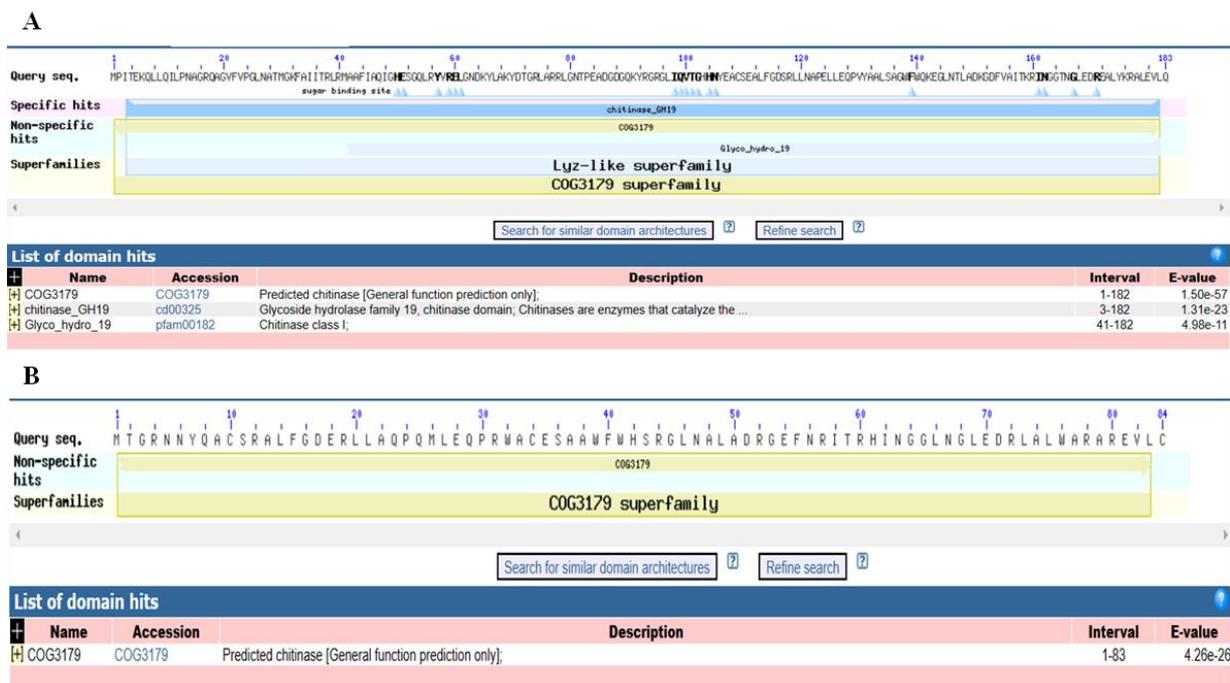


Figure 19: Résultats complets de l'analyse de domaines protéiques de deux chitinases de *P. guariconensis* par le programme CDD. (A) Les hits et superfamilles générés pour la séquence gi|1086853717. (B) Le hit et superfamille générés pour la séquence gi|1086851230.

Nos deux chitinases appartiennent à la superfamille COG3179 (qui est le seul membre du cluster : cl43803) car elles possèdent ce domaine décrivant la fonction prédite générale des chitinases. Mais leurs E-values diffèrent significativement (gi|1086853717 : $1,50e - 57$; gi|1086851230 : $4,26e - 25$), avec celle de gi|1086853717 étant plus faible et donc plus préférable.

Les résultats pour gi|1086853717 montrent plus de hits de domaine et de superfamilles. Le hit chitinase_GH19 (accession : cd00325), appartient au cluster de superfamille cl00222 (superfamille de type Lyz) qui hydrolyse les liaisons β -(1→4) dans les polysaccharides et comprend non seulement des chitinases mais aussi des lysozymes et des endolysines (qui était la base de notre modèle 3D prédit généré par Phyre²) entre autres. On note que le domaine cd00325 a un site de liaison aux sucres qui peut être discerné à partir de la séquence de requête (**Query seq.**) sur la **figure 19.A** qui peut en faire un CBD.

Glyco_hydro_19 (accession : pfam00182) est un domaine conservé importé de la base de données Pfam (Protein families) et appartient également à la superfamille cl00222. Il est attribué comme une chitinase de classe I que l'on trouve principalement dans les plantes (Patil *et al.*, 2000) en tant que mécanisme de défense contre les agents pathogènes fongiques (Oyeleye & Normi, 2018). Des domaines peuvent cependant être acquis (Basu *et al.*, 2009), c'est pourquoi des bactéries rhizosphériques comme *P. guariconensis* ont évolué pour acquérir cette fonction par transfert latéral de gènes (**Figure 20**) (Udaya Prakash *et al.*, 2010).

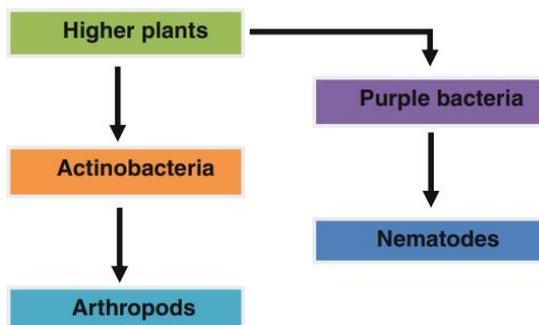


Figure 20: Proposition de voie évolutive pour le transfert et l'acquisition de gènes de chitinase de la famille GH19 provenant de plantes (Udaya Prakash *et al.*, 2010).

On peut maintenant en déduire que la chitinase putative gi|1086853717 est une chitinase de classe Ia de nature alcaline qui est étayée par une analyse physico-chimique préalable (notamment R+).

La chitinase putative gi|1086851230 reste toujours non classée en termes de sa famille GH même après avoir recherché sa présence dans les bases de données CAZy. Et pourtant, après avoir effectué un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) contre nr (non-redondant) en utilisant l'algorithme BLASTp (protein-protein BLAST), 100 séquences ont produit des alignements significatifs, la plupart appartenant à la famille GH19 (**Tableau 19**).

Tableau 19: Résultats des séquences alignées appartenant à la même espèce avec un pourcentage d'identité supérieur à 98% générés par BLASTp contre nr.

Description	Nom scientifique	Scores maximal et total	Recouvrement (%)	E-value	Pourcentage d'identité (%)	Longueur de la séquence	Accession
Glycoside hydrolase family 19 protein	<i>P. guariconensis</i>	174	100%	3e-53	98,81%	182	WP_196167558.1
Glycoside hydrolase family 19 protein	<i>P. guariconensis</i>	174	100%	3e-53	98,81%	182	WP_197853456.1

8.2. Recherche de motifs protéiques

Après avoir entré les deux séquences FASTA de nos enzymes pour rechercher les motifs dans leur alignement, 10 motifs ainsi que leur consensus et leurs emplacements ont été obtenus (**Figure 21**).

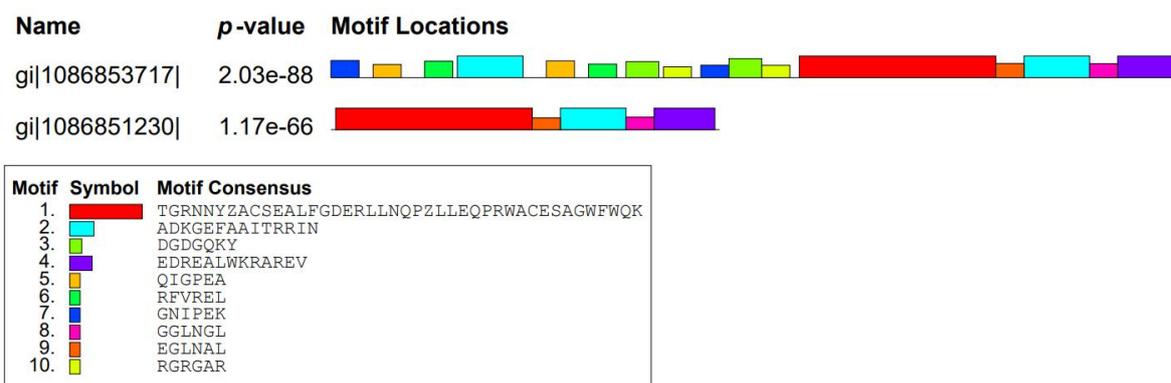


Figure 21: Emplacements des motifs de MEME dans les deux chitinases putatives et la valeur-p pour chacune des séquences gi|1086853717 et gi|1086851230

Lorsque l'on compare les valeurs- ρ individuelles des séquences, celle de gi|1086851230 a une valeur beaucoup plus faible, ce qui signifie que la probabilité des différences observées est moins probable que celle de la séquence gi|1086853717 (Pitak-Arnnp *et al.*, 2010). Néanmoins, sur les 10 motifs produits, gi|1086851230 en soutient 5, qui sont également partagés avec gi|1086853717 et ceux-ci seraient les motifs 1, 2, 4, 8 et 9. Il semble également que l'emplacement et l'ordre des motifs conservés soient les mêmes.

Les deux chitinases putatives proviennent de la même souche (LMG 27394) mais avec des loci différents, ce qui suggère que cette souche de *P. guariconensis* peut posséder plusieurs chitinases également causées par un transfert horizontal de gènes. Les causes sous-jacentes varient selon qu'elles ont été acquises pour remplir des objectifs antagonistes ou nutritionnels ou pour hydrolyser plus efficacement la chitine grâce à un fonctionnement synergique ou possèdent des affinités distinctes pour différentes formes de substrat (Beier & Bertilsson, 2013; Oyeleye & Normi, 2018). L'analyse du site active peut révéler la raison.

8.3. Analyse du site actif

Les résultats de COFACTOR ont dévoilé de nombreuses obscurités concernant les fonctions de nos chitinases putatives sélectionnées. Tout d'abord, il a confirmé que nos structures saisies étaient structurellement analogues à celle du modèle PDB c4ok7A avec un TM-score de 0,94 et 0,93 pour gi|1086853717 et gi|1086851230 respectivement, qui sont des valeurs relativement élevées pour la similarité structurelle basée sur l'alignement résidus à résidus (le score parfait étant de 1) (Y. Zhang & Skolnick, 2005).

La prédiction de GO pour la fonction moléculaire suggérée que gi|1086853717 possédait à la fois une activité de liaison à la chitine et une activité catalytique de la chitinase avec une confiance de Cscore^{GO} comme présenté dans la **figure 22.A**. Les chitinases de classe I avec un site de liaison à la chitine sont connues pour augmenter d'environ 5 fois l'inhibition des pathogènes fongiques comme ce fut dans le cas de *Trichoderma reesei*, qui a été plus

efficacement éliminé par une chitinase de nature alcaline (classe Ia) avec un site de liaison à la chitine (Oyeleye & Normi, 2018).

D'autre part, gi|1086851230 ne possédait pas de fonction moléculaire de liaison à la chitine spécifiquement, mais a montré une activité de chitinase malgré le fait que le score n'était pas aussi sûr que gi|1086853717 (Figure 22.B).

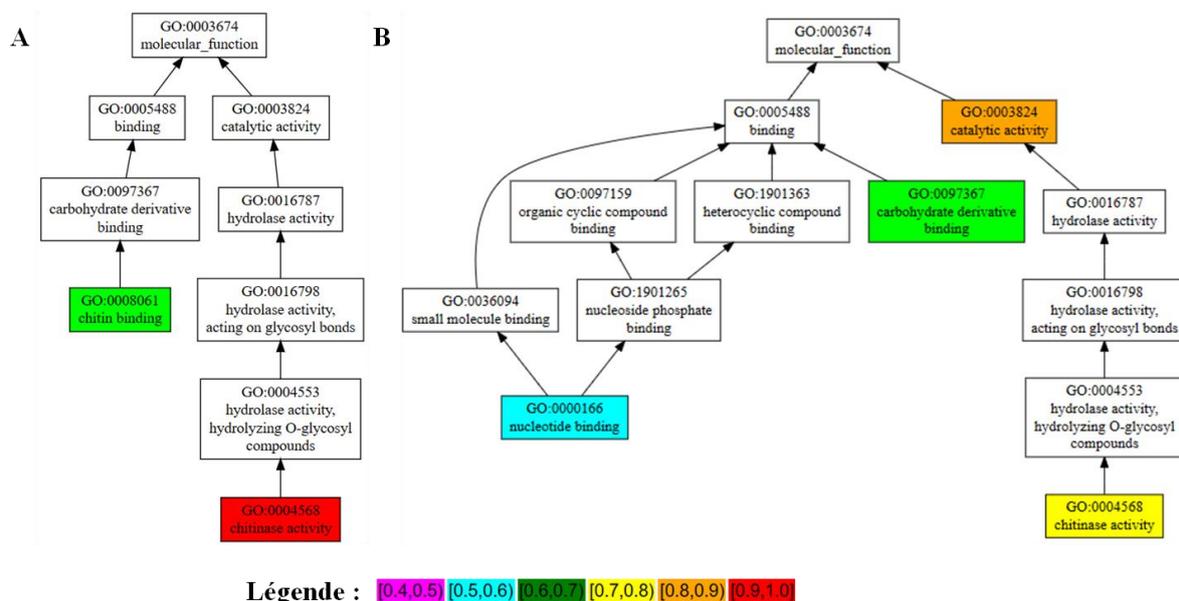


Figure 22: Prédiction de GO pour la fonction moléculaire proposée par COFACTOR et codés par couleur selon leur score de confiance (CscoreGO), les scores les plus élevés signifiant une meilleure confiance. (A) Hiérarchie d'ontologie génétique pour la fonction moléculaire de gi|1086853717. (B) Hiérarchie d'ontologie génétique pour la fonction moléculaire de gi|1086851230.

Les deux enzymes ont montré une aptitude au métabolisme des substances organiques en tant que processus biologique. Notre chitinase gi|1086853717, a montré une homologie enzymatique avec les hits PDB ayant tous un numéro EC (Enzyme Commission) d'EC 3.2.1.14. Il en va différemment pour gi|1086851230, car les cinq principales enzymes PDB homologues appartenaient à différentes classes d'enzymes, mais le hit PDB le plus élevé (en termes de recouvrement et TM-score) était 1dxjA (chitinase de *Canavalia ensiformis* également connue sous le nom de plante "jack bean").

En ce qui concerne la prédiction du site de liaison du ligand de COFACTOR, la protéine matrice prédite avec le score de confiance le plus élevé (Cscore^{LB}) pour la similarité du site de liaison de gi|1086853717 était une chitinase de la famille GH19 de l'espèce végétale *Carica papaya* (PDB ID : 3cqlA). La mesure de la similarité locale entre le site de liaison de la matrice et le site de liaison prédit dans notre structure requête gi|1086853717 ou BS-score, était également relativement élevée (0,92). Par conséquent, nous pouvons affirmer que les résidus du site actif de notre chitinase gi|1086853717 de *P. guariconensis* sont : histidine (His) 50, acide glutamique (Glu) 51, tyrosine (Tyr) 57, arginine (Arg) 59, acide glutamique 60,

glutamine (Gln) 99, glycine (Gly) 167 et arginine 171 pour le ligand NDG (N-acetyl-alpha-D-glucosamine) qui est exposé au solvant en raison de la topologie en fente ouverte du site actif (Figure 23).

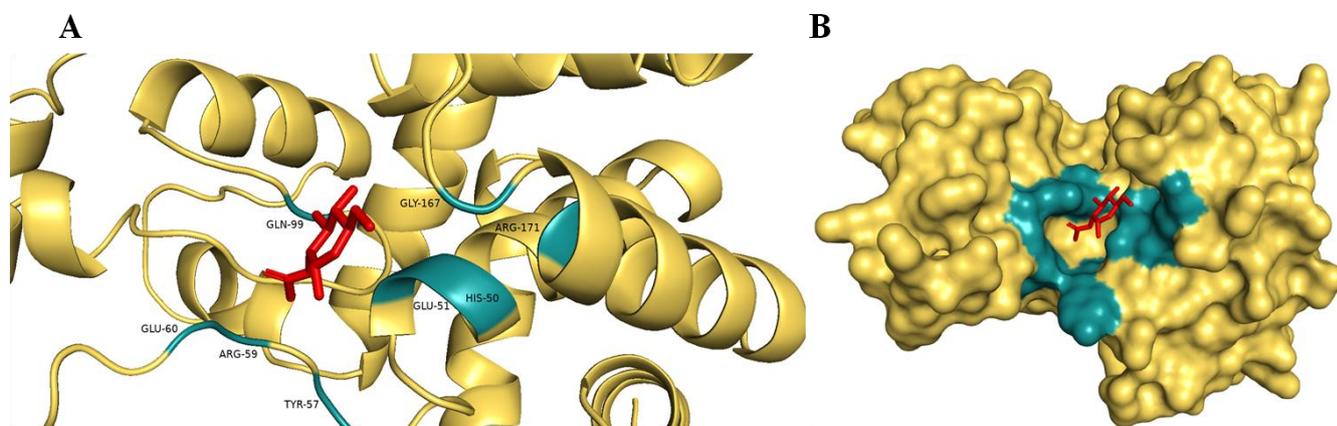


Figure 23: Site de liaison de ligand de la chitinase gi|1086853717 de *P. guariconensis* prédit par COFACTOR et visualisé par le logiciel PyMOL. (A) Vue rapprochée du site de liaison formé par les acides aminés : His 50, Glu 51, Tyr 57, Arg 59, Glu 60, Gln 99, Gly 167, Arg 171. (B) Vue de surface de l'enzyme avec le ligand et son site actif prédit. Le ligand (NDG) est coloré en rouge, les sites de liaison en bleu canard et la structure enzymatique restante en jaune orange.

Notre chitinase putative est approchante à celle de SgChiC (PDB ID : 1WVU) (Figure 24) en termes de topologie de site actif car elles sont toutes deux dominées par des hélices alpha et des boucles formant des fentes plutôt larges et ouvertes caractéristiques d'une majorité de chitinases GH19 (Oyeleye & Normi, 2018).

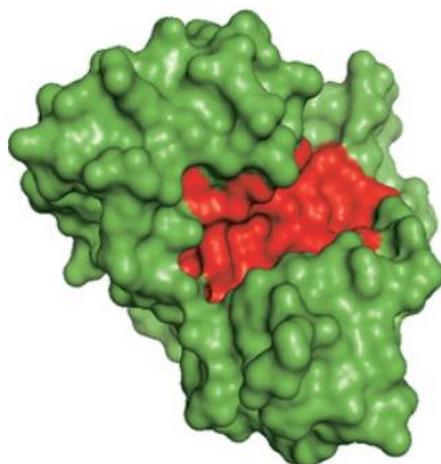


Figure 24: Modèle de surface de 1WVU (structure cristalline de la chitinase C de *Streptomyces griseus* HUT6037) illustrant la fente large et ouverte de son site actif (coloré en rouge) (modifiée) (Oyeleye & Normi, 2018).

Ces résultats peuvent être regroupés avec les motifs conservés découverts à l'aide de MEME. Sur les 10 motifs générés, trois portaient des acides aminés du site actif (Arg 59 et Glu 60 ; Gly 167 et Arg 171) quoique pas exactement au même endroit (à l'exception des résidus Arg 59 et Glu 60 trouvés dans le motif 6), mais ils ont toujours un potentiel car ils

sont répétés tout au long des séquences, comme on peut le vérifier dans les logos illustrés à la **figure 25**.



Figure 25: Logos des motifs conservés trouvés par MEME et qui partagent une similitude avec le site actif et/ou sont récurrents tout au long de la séquence de la chitinase gi|1086853717. (A) Motif 4. (B) Motif 6. (C) Motif 10.

Ceci s'applique également au site de liaison au sucre du domaine chitinase_GH19 découvert à l'aide de CDD, Glu 51 étant le résidu catalytique qui interagit avec le ligand pour réduire l'énergie d'activation et ainsi accélérer la réaction. Ce Glu ainsi que Glu 60, agissant comme nucléophile et donneur de protons, sont conservés dans toutes les chitinases de la famille GH19 avec des distances variables dans la séquence, mais ont tendance à être beaucoup plus proches dans les chitinases bactériennes (Hoell *et al.*, 2006; Oyeleye & Normi, 2018).

Le score BS pour la matrice choisie de gi|1086851230 (1d9ub : lysozyme de bactériophage lambda complexé avec un chitohexasaccharide) est significativement inférieur (0,52) à celui de gi|1086853717, mais toujours mieux que les autres modèles. Les résidus d'acides aminés qui interagissent avec le ligand long composé non seulement de NDG mais aussi de NAG (N-acétyl-D-glucosamine ; essentiellement le stéréoisomère du NDG) sont : méthionine (Met) 1, thréonine (Thr) 2, asparagine (Asn) 6, alanine (Ala) 9, cystéine 10, phénylalanine (Phe) 40, sérine (Ser) 43, histidine 61, isoleucine (Ile) 62 et asparagine 63 formant ensemble une rainure très large et ouverte qui expose le ligand au solvant environnant (**Figure 26**). Cela montre que les chitinases ont de nombreuses affinités avec divers substrats

chitineux (Oyeleye & Normi, 2018). La profondeur et la longueur des sites actifs semblent également corrélées à la spécificité du substrat (Horn *et al.*, 2009; Ohnuma *et al.*, 2012).

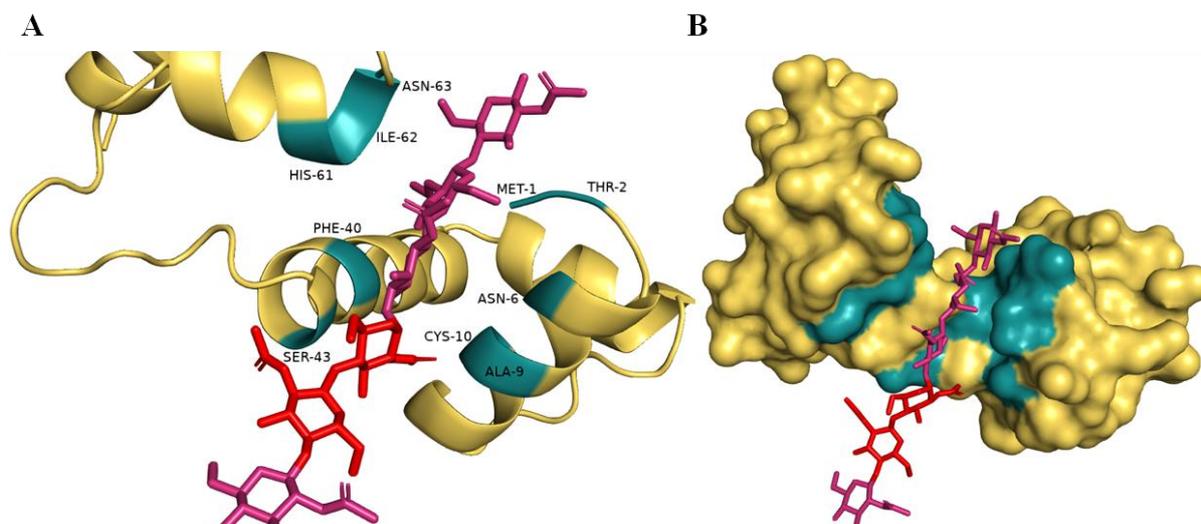


Figure 26: Site de liaison de ligand de la chitinase gi|1086851230 de *P. guariconensis* prédit par COFACTOR et visualisé par le logiciel PyMOL. (A) Vue rapprochée du site de liaison formé par les acides aminés : Met 1, Thr 2, Asn 6, Ala 9, Cys 10, Phe 40, Ser 43, His 61, Ile 62 et Asn 63. (B) Vue de surface de l'enzyme avec le ligand et son site actif prédit. Le ligand formé de NAG (rose chaud) et NDG (rouge), les sites de liaison en bleu canard et la structure enzymatique restante en jaune orange.

Les résidus Thr 2, Asn 6, Ala 9 et Cys 10 du site actif occupent des positions exactes dans le motif 1 ainsi que Ile 62 et Asn 63 dans le motif 2 (Figure 27). Les résultats de comparaison pour gi|1086851230 étaient plus précis et partageaient une meilleure similitude entre eux, ce qui signifie un site actif plus conservé que gi|1086853717.

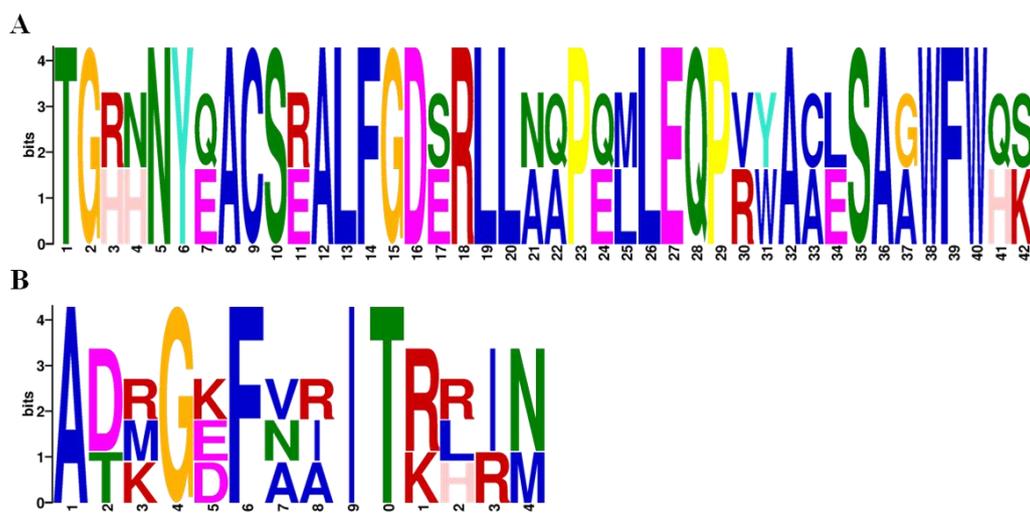


Figure 27: Logos des motifs conservés trouvés par MEME et qui partagent une similitude avec le site actif de la chitinase gi|1086851230. (A) Motif 1. (B) Motif 2.

Les séquences conservées trouvées dans les motifs élicités et les sites actifs de nos chitinases putatives de *P. guariconensis* sont comparables à celles découvertes par (Dutta *et*

al., 2021) à partir des soixante-deux séquences collectées (de la base de données PDB) non seulement de bactéries mais aussi d'archées, de champignons et de plantes aussi.

La chitinase putative gi|1086851230 reste toujours non classée à ce jour, bien que nos résultats suggèrent la probabilité d'être une chitinase bactérienne appartenant à la famille GH19. Cela nous amène à mentionner que des recherches supplémentaires sont encore nécessaires afin de déterminer le mécanisme catalytique précis des chitinases de la famille GH19, car elles présentent un potentiel dans la lutte contre les phytopathogènes. Selon Oyeleye & Normi (2018), de nombreuses études ont été réalisées pour découvrir les propriétés mécanistes et structurelles des chitinases GH19 végétales, mais pas grand-chose sur ses membres bactériens à l'exception de 3EBV et 1WVU de *Streptomyces coelicolor* et *Streptomyces griseus* respectivement, et elles-mêmes n'ont pas été caractérisées avant des décennies plus tard. Ce vaste intervalle de temps au cours duquel de nouveaux membres des chitinases GH19 sont découverts suggère probablement la présence d'une diversité substantielle de sources ainsi que leur capacité à évoluer pour produire de nouveaux membres (Oyeleye & Normi, 2018).

En abordant les limites de notre recherche, il a été constaté qu'une plus grande attention doit être accordée aux interactions enzyme-ligand par l'analyse d'amarrage moléculaire (docking moléculaire) afin de tester les affinités de nos enzymes envers divers substrats chitineux.

Voir comment nos ligands prédits possèdent des résidus α -glycosidiques suggère qu'ils ont déjà subi une hydrolyse par d'autres enzymes chitinolytiques capables d'inverser la configuration anomérique naturelle des polymères et dérivés de chitine. Les outils bioinformatiques nécessaires pour étudier les interactions protéine-protéine peuvent être utilisés pour déterminer comment nos chitinases s'associent en synergie avec d'autres enzymes pour assurer l'hydrolyse efficace de la chitine à des fins de développement ou de défense.

Conclusion

et

Perspectives

L'étude bioinformatique actuelle a mis en lumière les caractéristiques des chitinases de *Pseudomonas guariconensis*. Il a été révélé que les chitinases sélectionnées étaient de nature modérément alcaline et moins susceptibles d'être solubilisées dans des valeurs de pH respectives à leurs valeurs pI théoriques. Il a également été dévoilé que les deux chitinases étaient hydrophiles et thermostables et sécrétées de manière extracellulaire, ce qui leur donnait un potentiel de production industrielle de masse. En raison de son instabilité, la chitinase gi|1086851230 pourrait ne pas se comporter aussi favorablement que la chitinase gi|1086853717 dans des conditions expérimentales.

L'analyse structurelle et fonctionnelle a révélé la domination des hélices α dans la conformation 3D, ainsi que la présence de domaines d'hydrolyse de la chitine dans les deux chitinases requêtes, qui conduisent à déduire qu'elles appartenaient à la famille GH19, avec l'une des deux étant caractérisée comme une chitinase de classe Ia avec une activité de liaison à la chitine, ayant vraisemblablement évolué à partir de plantes, ce qui en fait un candidat potentiel comme puissant agent de lutte biologique contre les attaques phytopathogènes.

En analysant et en comparant les motifs et les sites actifs, il a été découvert que l'existence des deux séquences de chitinase dans différents loci de la même souche était corrélée à leurs différentes affinités de substrat. L'acquisition plausible de ces séquences par transfert latéral de gènes confirme leur probabilité de fonctionner en synergie à des fins antagonistes ou nutritionnelles.

La production de multiples chitinases par un même organisme (notamment d'origine bactérienne) donne un aperçu de sa capacité à évoluer rapidement et à acquérir de séquences conservées et son aptitude à être manipulé génétiquement, ce qui est sollicitée par diverses industries biotechnologiques.

Avec l'amélioration constante des outils et des méthodes de calcul bioinformatiques, les chitinases industrielles très efficaces à base bactérienne pourraient bien remplacer non seulement les pratiques agricoles et de pêche nuisibles à l'environnement, mais aussi les sources fongiques habituellement exploitées.

Références

Bibliographiques

Abidin, N. A. Z., Kormin, F., Abidin, N. A. Z., Anuar, N. A. F. M., & Bakar, M. F. A. (2020). The potential of insects as alternative sources of chitin : An overview on the chemical method of extraction from various sources. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1-25. <https://doi.org/10.3390/ijms21144978>

Alhefeiti, M. A., Athamneh, K., Vijayan, R., & Ashraf, S. S. (2021). Bioremediation of various aromatic and emerging pollutants by *Bacillus cereus* sp. Isolated from petroleum sludge. *Water Science and Technology*, 83(7), 1535-1547. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.065>

Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37(4), 420-423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>

Al-Rooqi, M. M., Hassan, M. M., Moussa, Z., Obaid, R. J., Suman, N. H., Wagner, M. H., Natto, S. S. A., & Ahmed, S. A. (2022). Advancement of chitin and chitosan as promising biomaterials. *Journal of Saudi Chemical Society*, 26(6), 101561. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2022.101561>

Arbia, W., Arbia, L., Adour, L., & Amrane, A. (2013). Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods – A Review. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 12-25.

Arimori, T., Kawamoto, N., Shinya, S., Okazaki, N., Nakazawa, M., Miyatake, K., Fukamizo, T., Ueda, M., & Tamada, T. (2013). Crystal structures of the catalytic domain of a novel glycohydrolase family 23 chitinase from *Ralstonia* sp. A-471 reveals a unique arrangement of the catalytic residues for inverting chitin hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(26), 18696-18706. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.462135>

Azuma, K., Ifuku, S., Osaki, T., Okamoto, Y., & Minami, S. (2014). Preparation and biomedical applications of chitin and chitosan nanofibers. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(10), 2891-2920. <https://doi.org/10.1166/JBN.2014.1882>

Bachmair, A., Finley, D., & Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, 234(4773), 179-186. <https://doi.org/10.1126/science.3018930>

Bailey, T. L., Johnson, J., Grant, C. E., & Noble, W. S. (2015). The MEME Suite. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W39-W49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>

Bajaj, K., Madhusudhan, M. S., Adkar, B. V., Chakrabarti, P., Ramakrishnan, C., Sali, A., & Varadarajan, R. (2007). Stereochemical criteria for prediction of the effects of proline

mutations on protein stability. *PLoS Computational Biology*, 3(12), 2465-2475. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030241>

Bakli, M., Karim, L., Mokhtari-Soulimane, N., Merzouk, H., & Vincent, F. (2020). Biochemical characterization of a glycosyltransferase Gtf3 from *Mycobacterium smegmatis* : A case study of improved protein solubilization. *3 Biotech*, 10(10), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02431-x>

Bakli, M., & Zenasni, A. (2019). Isolation of fluorescent *Pseudomonas* spp. strains from rhizosphere agricultural soils and assessment of their role in plant growth and phytopathogen biocontrol. *Research Journal of Agricultural Science*, 51(1), 20-29.

Basu, M. K., Poliakov, E., & Rogozin, I. B. (2009). Domain mobility in proteins : Functional and evolutionary implications. *Briefings in Bioinformatics*, 10(3), 205-216. <https://doi.org/10.1093/bib/bbn057>

Beier, S., & Bertilsson, S. (2013). Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. *Frontiers in Microbiology*, 4, 149. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00149>

Bendtsen, J. D., Kiemer, L., Fausbøll, A., & Brunak, S. (2005). Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiology*, 5(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-58>

Berezina, N. (2016). Production and application of chitin. *Physical Sciences Reviews*, 1(9). <https://doi.org/10.1515/psr-2016-0048>

Beygmoradi, A., Homaei, A., Hemmati, R., Santos-Moriano, P., Hormigo, D., & Fernández-Lucas, J. (2018). Marine chitinolytic enzymes, a biotechnological treasure hidden in the ocean? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(23), 9937-9948. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9385-7>

Bhattacharya, D., Nagpure, A., & Gupta, R. K. (2007). Bacterial chitinases : Properties and potential. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(1), 21-28. <https://doi.org/10.1080/07388550601168223>

Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J. -C, Frutiger, S., & Hochstrasser, D. (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*, 14(1), 1023-1031. <https://doi.org/10.1002/ELPS.11501401163>

Braconnot, H. (1811). Sur la nature des champignons. *Annales de chimie ou recueil de mémoires concernant la chimie et les arts qui en dépendent et spécialement la pharmacie*, 79, 265-304.

- Buchan, D. W. A., Minneci, F., Nugent, T. C. O., Bryson, K., & Jones, D. T. (2013). Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W349-W357. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt381>
- Bussers, J. (1976). *Structure et composition du kyste de resistance de 4 protozoaires cilles*.
- Campana-Filho, S. P., De Britto, D., Curti, E., Abreu, F. R., Cardoso, M. B., Battisti, M. V., Sim, P. C., Goy, R. C., Signini, R., & Lavall, R. L. (2007). Extraction, structures and properties of alpha- and beta-chitin. *Química Nova*, 30(3), 644-650. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300026>
- Carbohydrate Active EnZyme (CAZy). (2023). Glycoside Hydrolase family classification. <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>.
- Chang, K. Y., & Yang, J. R. (2013). Analysis and Prediction of Highly Effective Antiviral Peptides Based on Random Forests. *PLoS ONE*, 8(8), 70166. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0070166>
- Choi, Y., Agarwal, S., & Deane, C. M. (2013). How long is a piece of loop? *PeerJ*, 2013(1), 1-15. <https://doi.org/10.7717/peerj.1>
- Chu, Y., Hao, Z., Wang, K., Tu, T., Huang, H., Wang, Y., Bai, Y. G., Wang, Y., Luo, H., Yao, B., & Su, X. (2019). The GH10 and GH48 dual-functional catalytic domains from a multimodular glycoside hydrolase synergize in hydrolyzing both cellulose and xylan. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1617-2>
- Cohen-Kupiec, R., & Chet, I. (1998). The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(3), 270-277. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80058-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80058-X)
- Cui, D., Yang, J., Lu, B., & Shen, H. (2021). Efficient Preparation of Chitooligosaccharide With a Potential Chitosanase Csn-SH and Its Application for Fungi Disease Protection. *Frontiers in Microbiology*, 12, 682829. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682829>
- Cumberlidge, N., & Daniels, S. R. (2008). A conservation assessment of the freshwater crabs of southern Africa (*Brachyura : Potamonautidae*). *African Journal of Ecology*, 46(1), 74-79. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2028.2007.00815.X>
- Das, S. N., Madhuprakash, J., Sarma, P. V. S. R. N., Purushotham, P., Suma, K., Manjeet, K., Rambabu, S., Gueddari, N. E. E., Moerschbacher, B. M., & Podile, A. R. (2015). Biotechnological approaches for field applications of chitooligosaccharides (COS) to induce

innate immunity in plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(1), 29-43. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.798255>

DeLano, W. (2019). *The PyMOL Molecular Graphics System, version 2.3. 1*. Schrodinger LLC.

Dhole, N. P., Dar, M. A., & Pandit, R. S. (2021). Recent advances in the bioprospection and applications of chitinolytic bacteria for valorization of waste chitin. *Archives of Microbiology*, 203(5), 1953-1969. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02234-5>

Doetsch, R. (1981). Determinative methods of light microscopy. *Manual of methods for general bacteriology*, 21-33.

Dukare, A., Paul, S., & Arambam, A. (2020). Isolation and efficacy of native chitinolytic rhizobacteria for biocontrol activities against *Fusarium* wilt and plant growth promotion in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00256-7>

Dutta, B., Deska, J., Bandopadhyay, R., & Shamekh, S. (2021). *In silico* characterization of bacterial chitinase: Illuminating its relationship with archaeal and eukaryotic cousins. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00121-6>

Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90(1), 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042>

Fanelli, E., Di Vito, M., Jones, J. T., & De Giorgi, C. (2005). Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi. *Gene*, 349, 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.11.045>

Mohamad Sobri, M. F., Abd-aziz, S., Abu Bakar, F. D., & Ramli, N. (2020). *In-Silico* Characterization of Glycosyl Hydrolase Family 1 β -Glucosidase from *Trichoderma asperellum* UPM1. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4035.

Folders, J., Algra, J., Roelofs, M. S., van Loon, L. C., Tommassen, J., & Bitter, W. (2001). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Chitinase, a Gradually Secreted Protein. *Journal of Bacteriology*, 183(24), 7044-7052. <https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7044-7052.2001>

Fong, J. H., & Marchler-Bauer, A. (2008). Protein subfamily assignment using the Conserved Domain Database. *BMC Research Notes*, (1), 2-7. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-114>

- Fränkel, S., & Kelly, A. (1901). Beiträge zur Constitution des Chitins. *Monatshefte für Chemie*, 23(2), 123-132. <https://doi.org/10.1007/BF01525858/METRICS>
- Gao, L., Sun, J., Secundo, F., Gao, X., Xue, C., & Mao, X. (2018). Cloning, characterization and substrate degradation mode of a novel chitinase from *Streptomyces albolongus* ATCC 27414. *Food Chemistry*, 261(5), 329-336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.068>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server (pp. 571-607). *Humana press*. <https://doi.org/10.1385/1592598900>
- Geourjon, C., & Deléage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Bioinformatics*, 11(6), 681-684. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/11.6.681>
- Godara, P., Naik, B., Meghwal, R., Ojha, R., Srivastava, V., Prajapati, V. K., & Prusty, D. (2022). Rational designing of peptide-ligand conjugates-based immunotherapy for the treatment of complicated malaria. *Life Sciences*, 311, 121121. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2022.121121>
- Goldberg, T., Hecht, M., Hamp, T., Karl, T., Yachdav, G., Ahmed, N., Altermann, U., Angerer, P., Ansorge, S., Balasz, K., Bernhofer, M., Betz, A., Cizmadija, L., Do, K. T., Gerke, J., Greil, R., Joerdens, V., Hastreiter, M., Hembach, K., Herzog, M., Kalemanov, M., Kluge, M., Meier, A., Nasir, H., Neumaier, U., Prade, V., Reeb, J., Sorokoumov, A., Troshani, I., Vorberg, S., Waldraff, S., Zierer, J., Nielsen H., Rost, B. (2014). LocTree3 prediction of localization. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), 350-355. <https://doi.org/10.1093/nar/gku396>
- Gruber, S. G., & Seidl-Seiboth, V. (2012). Self versus non-self: Fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*, 158(1), 26-34. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052613-0>
- Gurav, R., Tang, J., & Jadhav, J. (2017). Novel chitinase producer *Bacillus pumilus* RST25 isolated from the shellfish processing industry revealed antifungal potential against phyto-pathogens. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 125, 228-234. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.09.015>
- Guruprasad, K., Reddy, B. V. B., & Pandit, M. W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition : A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection*, 4(2), 155-161. <https://doi.org/10.1093/PROTEIN/4.2.155>

Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J., & Javed, S. (2013). Chitinases : An update. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 5(1), 21. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.106559>

Henrissat, B., & Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7, 637-644.

Hildebrand, D. C., Palleroni, N. J., Toth, J., & JOHNSON, J. L. (1994). *Pseudomonas jluvescens* sp. Nov., Isolated from Walnut Blight Cankers. *Systematic Bacteriology*, 44(3), 410-415.

Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., & Mitaku, S. (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, 14(4), 378-379. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.4.378>

Hoell, I. A., Dalhus, B., Heggset, E. B., Aspmo, S. I., & Eijsink, V. G. H. (2006). Crystal structure and enzymatic properties of a bacterial family 19 chitinase reveal differences from plant enzymes. *FEBS Journal*, 273(21), 4889-4900. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05487.x>

Hoppe-Seyler, F. (1894). Ueber Chitin und Cellulose. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 27(3), 3329-3331. <https://doi.org/10.1002/CBER.189402703135>

Horn, S. J., Sørbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sørlie, M., Vårum, K. M., & Eijsink, V. G. H. (2006). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS Journal*, 273(3), 491-503. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05079.x>

Horn, S. J., Sørlie, M., Vaaje-Kolstad, G., Norberg, A. L., Synstad, B., Vårum, K. M., & Eijsink, V. G. H. (2009). Comparative studies of chitinases A, B and C from *Serratia marcescens*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 24(1-2), 39-53. <https://doi.org/10.1080/10242420500518482>

Iber, B. T., Kasan, N. A., Torsabo, D., & Omuwa, J. W. (2022). A review of various sources of chitin and chitosan in nature. *Journal of Renewable Materials*, 10(4), 1097-1123. <https://doi.org/10.32604/JRM.2022.018142>

Ikai, A. (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *Journal of Biochemistry*, 88(6), 1895-1898. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133168>

Imamoto, Y., Tatsumi, S., Harigai, M., Yamazaki, Y., Kamikubo, H., & Kataoka, M. (2008). Diverse roles of glycine residues conserved in photoactive yellow proteins. *Biophysical Journal*, 94(9), 3620-3628. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.123414>

Ioelovich, M. (2014). Crystallinity and Hydrophilicity of Chitin and Chitosan. *Research and Reviews: Journal of Chemistry*, 3(3), 7-14.

Jang, M. K., Kong, B. G., Jeong, Y. I., Lee, C. H., & Nah, J. W. (2004). Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(14), 3423-3432. <https://doi.org/10.1002/POLA.20176>

Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S. V., & Tamura, H. (2010). Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances*, 28(1), 142-150. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.11.001>

Jeyanthi, V., & Kanimozhi, S. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)-prospective and mechanisms : A review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(2), 733-749. <https://doi.org/10.22207/JPAM.12.2.34>

Jin, Q., & Kirk, M. F. (2018). PH as a primary control in environmental microbiology : 1. Thermodynamic perspective. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 21. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00021>

João, C. F. C., Silva, J. C., & Borges, J. P. (2015). Chitin-based nanocomposites : Biomedical applications. *Advanced Structured Materials*, 74, 439-457. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2473-0_14/COVER

Johnston, W. L., Krizus, A., & Dennis, J. W. (2010). Eggshell chitin and chitin-interacting proteins prevent polyspermy in *C. elegans*. *Current Biology*, 20(21), 1932-1937. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.059>

Joseph, S. M., Krishnamoorthy, S., Paranthaman, R., Moses, J. A., & Anandharamkrishnan, C. (2021). A review on source-specific chemistry, functionality, and applications of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100036. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100036>

Joshi, C. J., Ke, W., Drangowska-Way, A., O'Rourke, E. J., & Lewis, N. E. (2022). What are housekeeping genes? *PLoS Computational Biology*, 18(7), e1010295. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010295>

Juárez-Hernández, E. O., Casados-Vázquez, L. E., Briebe, L. G., Torres-Larios, A., Jimenez-Sandoval, P., & Barboza-Corona, J. E. (2019). The crystal structure of the chitinase ChiA74 of *Bacillus thuringiensis* has a multidomain assembly. *Scientific Reports*, 9(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39464-z>

- Jung, W. J., Kim, K. Y., Park, Y. S., Kim, S. B., Lee, Y. S., & Anees, M. (2014). Purification and properties of a *Meloidogyne*-antagonistic chitinase from *Lysobacter capsici* YS1215. *Nematology*, *16*(1), 63-72. <https://doi.org/10.1163/15685411-00002745>
- Kankariya, R. A., Chaudhari, A. B., & Dandi, N. D. (2022). Statistical production optimisation, *Fusarium* biocontrol and insecticidal activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by a newly discovered moderately haloalkalitolerant *Pseudomonas guariconensis* VDA8. *Zemdirbyste*, *109*(2), 139-148. <https://doi.org/10.13080/z-a.2022.109.018>
- Karina, N., Roekhan, A., Diah Ayu Fitriana, C., & Qurata Aini, L. (2020). The Potency of UB Forest Bacteria as Chitinolytic Bacteria to Inhibit Anthracnose Disease on Cayenne Pepper. *Research Journal of Life Science*, *7*(1), 41-51. <https://doi.org/10.21776/ub.rjls.2020.007.01.5>
- Karthik, N., Akanksha, K., Binod, P., & Pandey, A. (2014). Production, purification and properties of fungal chitinases—A review. *Indian Journal of Experimental Biology*, *52*(11), 1025-1035.
- Kawasaki, K., Osafune, T., Tamehira, S., & Yano, K. (2021). Piglets can secrete acidic mammalian chitinase from the pre weaning stage. *Scientific Reports*, *11*(1), 1297. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80368-0>
- Kaya, M., Mujtaba, M., Ehrlich, H., Salaberria, A. M., Baran, T., Amemiya, C. T., Galli, R., Akyuz, L., Sargin, I., & Labidi, J. (2017). On chemistry of γ -chitin. *Carbohydrate Polymers*, *176*, 177-186. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.076>
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The *Phyre2* web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, *10*(6), 845-858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Khare, E., & Arora, N. K. (2021). Biosurfactant based formulation of *Pseudomonas guariconensis* LE3 with multifarious plant growth promoting traits controls charcoal rot disease in *Helianthus annuus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *37*(4), 55. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03015-4>
- Khoushab, F., & Yamabhai, M. (2010). Chitin research revisited. *Marine Drugs*, *8*(7), 1988-2012. <https://doi.org/10.3390/md8071988>
- Krieger, F., Möglich, A., & Kiefhaber, T. (2005). Effect of proline and glycine residues on dynamics and barriers of loop formation in polypeptide chains. *Journal of the American Chemical Society*, *127*(10), 3346-3352. <https://doi.org/10.1021/JA042798I/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JA042798IN00001.GIF>

Kumar, M., Brar, A., Vivekanand, V., & Pareek, N. (2018). Process optimization, purification and characterization of a novel acidic, thermostable chitinase from *Humicola grisea*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 931-938. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.125>

Kumar, M., Chakdar, H., Pandiyan, K., Thapa, S., Shahid, M., Singh, A., Srivastava, A. K., & Saxena, A. K. (2022). Bacterial chitinases : Genetics, engineering and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(12), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03444-9>

Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105-132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., & Thornton, J. M. (2006). PROCHECK: validation of protein-structure coordinates. In M. G. Rossmann & E. Arnold (Éds.), *International Tables for Crystallography: Vol. F* (p. 722-725). International Union of Crystallography. <https://doi.org/10.1107/97809553602060000724>

Lavall, R. L., Assis, O. B. G., & Campana-Filho, S. P. (2007). β -Chitin from the pens of *Loligo* sp.: Extraction and characterization. *Bioresource Technology*, 98(13), 2465-2472. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.002>

Ledderhose, G. (1876). Ueber salzsaures Glycosamin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 9(2), 1200-1201. <https://doi.org/10.1002/CBER.18760090251>

Lee, Y. S., & Kim, K. Y. (2015). Statistical optimization of medium components for chitinase production by *Pseudomonas fluorescens* strain HN1205 : Role of chitinase on egg hatching inhibition of root-knot nematode. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(3), 470-478. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1010702>

Lee, Y. S., Nguyen, X. H., Naing, K. W., Park, Y. S., & Kim, K. Y. (2015). Role of Lytic Enzymes Secreted by *Lysobacter capsici* YS1215 in the Control of Root-Knot Nematode of Tomato Plants. *Indian Journal of Microbiology*, 55(1), 74-80. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0499-z>

Li, D., Zhang, J., Wang, Y., Liu, X., Ma, E., Sun, Y., Li, S., Zhu, K. Y., & Zhang, J. (2015). Two chitinase 5 genes from *Locusta migratoria* : Molecular characteristics and functional differentiation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 58, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.01.004>

- Li, H., & Greene, L. H. (2010). Sequence and Structural Analysis of the Chitinase Insertion Domain Reveals Two Conserved Motifs Involved in Chitin-Binding. *PLOS ONE*, 5(1), e8654. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0008654>
- Li, J., Zheng, J., Liang, Y., Yan, R., Xu, X., & Lin, J. (2020). Expression and characterization of a chitinase from *Serratia marcescens*. *Protein Expression and Purification*, 171, 105613. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2020.105613>
- Liu, K., Ding, H., Yu, Y., & Chen, B. (2019). A cold-adapted chitinase-producing bacterium from Antarctica and its potential in biocontrol of plant pathogenic fungi. *Marine Drugs*, 17(12), 695. <https://doi.org/10.3390/md17120695>
- Lodhi, G., Kim, Y.-S., Hwang, J.-W., Kim, S.-K., Jeon, Y.-J., Je, J.-Y., Ahn, C.-B., Moon, S.-H., Jeon, B.-T., & Park, P.-J. (2014). Chitooligosaccharide and Its Derivatives : Preparation and Biological Applications. *BioMed Research International*, 2014, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2014/654913>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 490-495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Lone, D. A., Wani, N. A., Wani, I. A., & Masoodi, F. A. (2015). Physico-chemical and functional properties of Rainbow trout fish protein isolate. *International Food Research Journal*, 22(3), 1112-1116.
- Lotmar, W., & Picken, L. E. R. (1950). A new crystallographic modification of chitin and its distribution. *Experientia*, 6(2), 58-59. <https://doi.org/10.1007/BF02174818/METRICS>
- Lv, C., Gu, T., Ma, R., Yao, W., Huang, Y., Gu, J., & Zhao, G. (2021). Biochemical characterization of a GH19 chitinase from *Streptomyces alfalfae* and its applications in crystalline chitin conversion and biocontrol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.178>
- Makhdoumi, A., Dehghani-Joybari, Z., Mashreghi, M., Jamialahmadi, K., & Asoodeh, A. (2015). A novel halo-alkali-tolerant and thermo-tolerant chitinase from *Pseudoalteromonas* sp. DC14 isolated from the Caspian Sea. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(12), 3895-3904. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0848-4>
- Männistö, M. K., & Puhakka, J. A. (2002). Psychrotolerant and microaerophilic bacteria in boreal groundwater. *FEMS Microbiology Ecology*, 41(1), 9-16. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00262-3](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00262-3)

Mathew, G. M., Madhavan, A., Arun, K. B., Sindhu, R., Binod, P., Singhanian, R. R., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2020). Thermophilic Chitinases : Structural, Functional and Engineering Attributes for Industrial Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(1), 142-164. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03416-5>

Mathew, G. M., Madhavan, A., Arun, K. B., Sindhu, R., Binod, P., Singhanian, R. R., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2021). Thermophilic Chitinases : Structural, Functional and Engineering Attributes for Industrial Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(1), 142-164. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03416-5>

Mendoza, L., Taylor, J. W., & Ajello, L. (2003). The Class *Mesomycetozoa* : A Heterogeneous Group of Microorganisms at the Animal-Fungal Boundary. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 315-344. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.56.012302.160950>

Merzendorfer, H., & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects : Structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 206(24), 4393-4412. <https://doi.org/10.1242/jeb.00709>

Migula, N. (1894). Arbeiten aus dem Bakteriologischen. *Inst. Technischen Hochschule Karlsruhe*, 1, 235-238.

Mishra, S. K., Khan, M. H., Misra, S., Dixit, V. K., Khare, P., Srivastava, S., & Chauhan, P. S. (2017). Characterisation of *Pseudomonas* spp. And *Ochrobactrum* sp. Isolated from volcanic soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(2), 253-270. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0796-0>

Mohammed, M. H., Williams, P. A., & Tverezovskaya, O. (2013). Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 166-171. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.021>

Moussian, B. (2019). *Chitin : Structure , Chemistry and Biology A Cuticle A Body shape A Evolution A Barrier*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-7318-3>

Muzzarelli, R. A. A. (2011). Chitin Nanostructures in Living Organisms. *Chitin: Formation and diagenesis*, 34, 1-34. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9684-5_1

National Center for Biotechnology Information. (2023). *PubChem Enzyme Summary for Enzyme 3.2.1.14, Chitinase (EC 3.2.1.14)*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EC:3.2.1.14>

Nguyen, S. T. C., Freund, H. L., Kasanjian, J., & Berlemont, R. (2018). Function, distribution, and annotation of characterized cellulases, xylanases, and chitinases from CAZy.

Applied Microbiology and Biotechnology, 102(4), 1629-1637. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8778-y>

Ni'mah, Y. L., Harmami, H., Ulfin, I., Suprpto, S., & Welny Saleh, C. (2019). Water-soluble chitosan preparation from marine sources. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 15(2), 159-163. <https://doi.org/10.11113/mjfas.v15n2.971>

Nishiyama, Y., Langan, P., & Chanzy, H. (2002). Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, 124(31), 9074-9082. https://doi.org/10.1021/JA0257319/SUPPL_FILE/JA0257319_S1.CIF

Niu, S., Yang, L., Zuo, H., Zheng, J., Weng, S., He, J., & Xu, X. (2018). A chitinase from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* involved in immune regulation. *Developmental and Comparative Immunology*, 85, 161-169.

Nolsøe, H., & Undeland, I. (2009). The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins : State of the art. *Food and Bioprocess Technology*, 2(1), 1-27. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0088-4>

Odier, A. (1823). Mémoires sur la composition chimique des parties cornées des insectes. *Mémoires de la Société d'Histoire Naturelle de Paris*, 1, 29-42.

Ohnuma, T., Numata, T., Osawa, T., Inanaga, H., Okazaki, Y., Shinya, S., Kondo, K., Fukuda, T., & Fukamizo, T. (2012). Crystal structure and chitin oligosaccharide-binding mode of a « loopful » family GH19 chitinase from rye, *Secale cereale*, seeds. *FEBS Journal*, 279(19), 3639-3651. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08723.x>

Ohnuma, T., Numata, T., Osawa, T., Mizuhara, M., Lampela, O., Juffer, A. H., Skriver, K., & Fukamizo, T. (2011). A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana* : Gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis. *Planta*, 234(1), 123-137. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1390-3>

Ohnuma, T., Umemoto, N., Nagata, T., Shinya, S., Numata, T., Taira, T., & Fukamizo, T. (2014). Crystal structure of a « loopless » GH19 chitinase in complex with chitin tetrasaccharide spanning the catalytic center. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1844(4), 793-802. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.02.013>

Okada, Y., Yamaura, K., Suzuki, T., Itoh, N., Osada, M., & Takahashi, K. G. (2013). Molecular characterization and expression analysis of chitinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 165(2), 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.03.008>

Ortega-Barria, E., Ward, H. D., Evans, J. E., & Pereira, M. E. A. (1990). N-Acetyl-d-glucosamine is present in cysts and trophozoites of *Giardia lamblia* and serves as receptor for wheatgerm agglutinin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 43(2), 151-165. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(90\)90141-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90141-8)

Oyeleye, A., & Normi, Y. M. (2018). Chitinase : Diversity, limitations, and trends in Engineering for suitable applications. *Bioscience Reports*, 38(4), 1-21. <https://doi.org/10.1042/BSR20180323>

Padder, S. A., Rather, R. A., Bhat, S. A., Shah, M. D., Baba, T. R., & Mubarak, N. M. (2022). Dynamics, phylogeny and phyto-stimulating potential of chitinase synthesizing bacterial root endosymbiosome of North Western Himalayan *Brassica rapa* L. *Scientific Reports*, 12(1) 6742. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11030-0>

Pakizeh, M., Moradi, A., & Ghassemi, T. (2021). Chemical extraction and modification of chitin and chitosan from shrimp shells. *European Polymer Journal*, 159, 110709. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110709>

Pan, M., Li, J., Lv, X., Du, G., & Liu, L. (2019). Molecular engineering of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101 for enzymatic production of chitooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 124, 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.01.012>

Panda, S., & Chandra, G. (2012). Physicochemical characterization and functional analysis of some snake venom toxin proteins and related non-toxin proteins of other chordates. *Bioinformation*, 8(18), 891. <https://doi.org/10.6026/97320630008891>

Park, B. K., & Kim, M. M. (2010). Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 5152-5164. <https://doi.org/10.3390/ijms11125152>

Patel, R. R., Thakkar, V. R., & Subramanian, B. R. (2015). A *Pseudomonas guariconensis* strain capable of promoting growth and controlling collar rot disease in *Arachis hypogaea* L. *Plant and Soil*, 390(1-2), 369-381. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2436-2>

Patil, R. S., Ghormade, V., & Deshpande, M. V. (2000). Chitinolytic enzymes : An exploration. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(7), 473-483. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00134-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00134-4)

Peix, A., Berge, O., Rivas, R., Abril, A., & Velázquez, E. (2005). *Pseudomonas argentinensis* sp. Nov., a novel yellow pigment-producing bacterial species, isolated from rhizospheric soil in Córdoba, Argentina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1107-1112. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63445-0>

- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution*, 57, 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.026>
- Pellequer, J.-L. (1999). *Modélisation moléculaire par homologie des protéines : Ses applications en Biologie et en Bioinformatique* [Faculté des sciences de Luminy]. <https://theses.hal.science/tel-01301813>
- Peters, W. (1972). Occurrence of chitin in mollusca. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 41(3)541-550. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(72\)90117-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(72)90117-4)
- Pitak-Arnop, P., Dhanuthai, K., Hemprich, A., & Pausch, N. C. (2010). Misleading p-value: do you recognise it? *European journal of dentistry*, 4(3), 356-358.
- Poria, V., Rana, A., Kumari, A., Grewal, J., Pranaw, K., & Singh, S. (2021). Current perspectives on chitinolytic enzymes and their agro-industrial applications. *Biology*, 10(12)1319. <https://doi.org/10.3390/biology10121319>
- Protein Data Bank (PDB). (2014). *The crystal structure of a class V chitinase from Pseudomonas fluorescens Pf-5*. <https://www.rcsb.org/>
- Rathore, A. S., & Gupta, R. D. (2015). Chitinases from Bacteria to Human : Properties, Applications, and Future Perspectives. *Enzyme Research*, 2015.
- Ravi Kumar, M. N. V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9)
- Reddy, S., & Osborne, J. W. (2020). Biodegradation and biosorption of Reactive Red 120 dye by immobilized *Pseudomonas guariconensis*: Kinetic and toxicity study. *Water Environment Research*, 92(8), 1230-1241. <https://doi.org/10.1002/wer.1319>
- Ren, X.-B., Dang, Y.-R., Liu, S.-S., Huang, K.-X., Qin, Q.-L., Chen, X.-L., Zhang, Y.-Z., Wang, Y.-J., & Li, P.-Y. (2022). Identification and Characterization of Three Chitinases with Potential in Direct Conversion of Crystalline Chitin into N,N'-diacetylchitobiose. *Marine Drugs*, 20(3), 165. <https://doi.org/10.3390/md20030165>
- Robertus, J. D., & Monzingo, A. F. (1999). The structure and action of chitinases. *EXS*, 87, 125-135. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8757-1_9
- Rudall, K. M. (1963). The Chitin/Protein Complexes of Insect Cuticles. *Advances in Insect Physiology*, 1(C), 257-313. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60177-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60177-0)
- Rudall, K. M., & Kenchington, W. (1973). The chitin system. *Biological Reviews*, 48(4), 597-633. <https://doi.org/10.1111/J.1469-185X.1973.TB01570.X>

Sachs, I. B. (1956). The Chemical Nature of the Cyst Membrane of *Pelomyxa illinoisensis*. *Transactions of the American Microscopical Society*, 75(3), 307-313. <https://doi.org/10.2307/3223959>

Sahai, A. S., & Manocha, M. S. (1993). Chitinases of fungi and plants: Their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiology Reviews*, 11(4), 317-338. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00004.x>

Salma, U., Uddowla, M. H., Kim, M., Kim, J. M., Kim, B. K., Baek, H. J., Park, H., Mykles, D. L., & Kim, H. W. (2012). Five hepatopancreatic and one epidermal chitinases from a pandalid shrimp (*Pandalopsis japonica*): Cloning and effects of eyestalk ablation on gene expression. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 161(3), 197-207. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.11.005>

Schmidt, E. E., & Davies, C. J. (2007). The origins of polypeptide domains. *BioEssays*, 29(3), 262-270. <https://doi.org/10.1002/bies.20546>

Schwelm, A., Fogelqvist, J., Knaust, A., Jülke, S., Lilja, T., Bonilla-Rosso, G., Karlsson, M., Shevchenko, A., Dhandapani, V., Choi, S. R., Kim, H. G., Park, J. Y., Lim, Y. P., Ludwig-Müller, J., & Dixelius, C. (2015). The *Plasmodiophora brassicae* genome reveals insights in its life cycle and ancestry of chitin synthases. *Scientific Reports*, 5(1), 11153. <https://doi.org/10.1038/srep11153>

Seidl, V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: A large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*, 22(1), 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2008.03.002>

Shaala, L. A., Asfour, H. Z., Youssef, D. T. A., óttowska-Aksamitowska, S. Z., Wysokowski, M., Tsurkan, M., Galli, R., Meissner, H., Petrenko, I., Tabachnick, K., Ivanenko, V. N., Bechmann, N., Muzychka, L. V., Smolii, O. B., Martinović, R., Joseph, Y., Jesionowski, T., & Ehrlich, H. (2019). New source of 3D chitin scaffolds: The red sea demosponge *pseudoceratina arabica* (*pseudoceratinidae*, *verongiida*). *Marine Drugs*, 17(2)92. <https://doi.org/10.3390/md17020092>

Shah, P., Jogani, V., Mishra, P., Mishra, A. K., Bagchi, T., & Misra, A. (2007). Modulation of Ganciclovir Intestinal Absorption in Presence of Absorption Enhancers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(10), 2710-2722. <https://doi.org/10.1002/JPS.20888>

Shamshina, J. L., Oldham (Konak), T., & Rogers, R. D. (2019). Applications of Chitin in Agriculture. In G. Crini & E. Lichtfouse (Éds.), *Sustainable Agriculture Reviews 36: Chitin and Chitosan: Applications in Food, Agriculture, Pharmacy, Medicine and*

Wastewater Treatment (p. 125-146). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16581-9_4

Sikorski, P., Hori, R., & Wada, M. (2009). Revisit of α -chitin crystal structure using high resolution X-ray diffraction data. *Biomacromolecules*, 10(5), 1100-1105. https://doi.org/10.1021/BM801251E/SUPPL_FILE/BM801251E_SI_001.ZIP

Sindhu, S. S., & Dadarwal, K. R. (2001). Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. Antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. *Cicer* in chickpea. *Microbiological Research*, 156(4), 353-358. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00120>

Singh, N. A., & Shanmugam, V. (2012). Cloning and characterization of a bifunctional glycosyl hydrolase from an antagonistic *Pseudomonas putida* strain P3(4). *Journal of Basic Microbiology*, 52(3), 340-349. <https://doi.org/10.1002/JOBM.201100232>

Singh, R. V., Sambyal, K., Negi, A., Sonwani, S., & Mahajan, R. (2021). Chitinases production: A robust enzyme and its industrial applications. *Biocatalysis and Biotransformation*, 39(3), 161-189. <https://doi.org/10.1080/10242422.2021.1883004>

Someya, N., Nakajima, M., Hiayae, K., Hibi, T., & Akutsu, K. (2001). Synergistic Antifungal Activity of Chitinolytic Enzymes and Prodigiosin Produced by Biocontrol Bacterium, *Serratia marcescens* Strain B2 against Gray Mold Pathogen, *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, 67(4), 312-317. <https://doi.org/10.1007/pl00013038>

Song, E. H., Shang, J., & Ratner, D. M. (2012). Polysaccharides. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, 9, 137-155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00246-6>

Städeler, G. (1859). Untersuchungen über das Fibroïn, Spongïn und Chitin, nebst Bemerkungen über den thierischen Schleim. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 111(1), 12-28. <https://doi.org/10.1002/JLAC.18591110103>

Steinfeld, L., Vafaei, A., Janin, R., & Merzendorfer, H. (2019). Chitin Prevalence and Function in Bacteria, Fungi and Protists. *Targeting chitin-containing organisms*, 19-59.

Subbanna, A. R. N. S., Chandrashekara, C., Stanley, J., Mishra, K. K., Mishra, P. K., & Pattanayak, A. (2019). Bio-efficacy of chitinolytic *Bacillus thuringiensis* isolates native to northwestern Indian Himalayas and their synergistic toxicity with selected insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 158, 166-174. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.05.005>

Subbanna, A. R. N. S., Rajasekhara, H., Stanley, J., Mishra, K. K., & Pattanayak, A. (2018). Pesticidal prospectives of chitinolytic bacteria in agricultural pest management. *Soil Biology and Biochemistry*, 116, 52-66.

Suginta, W., Sirimontree, P., Sritho, N., Ohnuma, T., & Fukamizo, T. (2016). The chitin-binding domain of a GH-18 chitinase from *Vibrio harveyi* is crucial for chitin-chitinase interactions. *International Journal of Biological Macromolecules*, *93*, 1111-1117. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.066>

Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., & Alagui, A. (2003). Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polymer*, *44*(26), 7939-7952. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2003.10.025>

Tombs, E., & Harding, A. (1998). *An introduction to polysaccharide biotechnology*. Taylor and Francis Publications.

Toro, M., Ramírez-Bahena, M.-H., Cuesta, M. J., Velázquez, E., & Peix, A. (2013). *Pseudomonas guariconensis* sp. Nov., isolated from rhizospheric soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *63*(Pt_12), 4413-4420. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.051193-0>

Udaya Prakash, N. A., Jayanthi, M., Sabarinathan, R., Kanguene, P., Mathew, L., & Sekar, K. (2010). Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases. *Journal of Molecular Evolution*, *70*(5), 466-478. <https://doi.org/10.1007/s00239-010-9345-z>

Umemoto, N., Kanda, Y., Ohnuma, T., Osawa, T., Numata, T., Sakuda, S., Taira, T., & Fukamizo, T. (2015). Crystal structures and inhibitor binding properties of plant class v chitinases: The cycad enzyme exhibits unique structural and functional features. *Plant Journal*, *82*(1), 54-66. <https://doi.org/10.1111/tpj.12785>

Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules*, *21*(5), 573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>

Veliz, E. A., Martínez-Hidalgo, P., & Hirsch, A. M. (2017). Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiology*, *3*(3), 689-705. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.689>

Vijayendra, S. V. N., & Shamala, T. R. (2014). Film forming microbial biopolymers for commercial applications—A review. *Critical reviews in biotechnology*, *34*(4), 338-357. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.798254>

Vogel, C., Bashton, M., Kerrison, N. D., Chothia, C., & Teichmann, S. A. (2004). Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, *14*(2), 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.03.011>

Wan, A. C. A., & Tai, B. C. U. (2013). CHITIN - A promising biomaterial for tissue engineering and stem cell technologies. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1776-1785. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.007>

Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Lu, S., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., & Marchler-Bauer, A. (2023). The conserved domain database in 2023. *Nucleic acids research*, 51(D1), D384-D388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1096>

Wang, L. T., Tai, C. J., Wu, Y. C., Chen, Y. B., Lee, F. L., & Wang, S. L. (2010). *Pseudomonas taiwanensis* sp. Nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(9), 2094-2098. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.014779-0>

Wang, S.-L., Bo-Shyun, L., Tzu-Wen, L., Chuan-Lu, W., Pei-Chen, W., & Je-Ruei, L. (2010). Purification and characterization of chitinase from a new species strain *Pseudomonas* sp. TKU008. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(6), 1001-1005. <https://doi.org/10.4014/jmb.0911.11017>

Wang, X., Zhao, Y., Tan, H., Chi, N., Zhang, Q., Du, Y., & Yin, H. (2014). Characterisation of a chitinase from *Pseudoalteromonas* sp. DL-6, a marine psychrophilic bacterium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 455-462. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.033>

Wayne, L. Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., Truper, H. G. (1987). International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37(4), 463-464.

Wlodawer, A., Dauter, Z., Porebski, P. J., Minor, W., Stanfield, R., Jaskolski, M., Pozharski, E., Weichenberger, C. X., Rupp, B. (2018). Detect, correct, retract: How to manage incorrect structural models. *The FEBS Journal*, 285, 444-456.

Xia, C., Li, D., Qi, M., Wang, Y., Zhang, Y., Yang, Y., Hu, Z., Du, X., Zhao, Y., Yu, K., Huang, Y., Li, Z., Ye, X., & Cui, Z. (2023). Preparation of chitooligosaccharides with a low degree of polymerization and anti-microbial properties using the novel chitosanase AqCsn1. *Protein Expression and Purification*, 203, 106199. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2022.106199>

Xu, D., & Zhang, Y. (2011). Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophysical Journal*, 101(10), 2525-2534. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.10.024>

- Yahiaoui, M., Laribi-Habchi, H., Bouacem, K., Asmani, K. L., Mechri, S., Harir, M., Bendif, H., Aïssani-El Fertas, R., & Jaouadi, B. (2019). Purification and biochemical characterization of a new organic solvent-tolerant chitinase from *Paenibacillus timonensis* strain LK-DZ15 isolated from the Djurdjura Mountains in Kabylia, Algeria. *Carbohydrate Research*, 483, 107747. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107747>
- Yang, J., Gan, Z., Lou, Z., Tao, N., Mi, Q., Liang, L., Sun, Y., Guo, Y., Huang, X., Zou, C., Rao, Z., Meng, Z., & Zhang, K. Q. (2010). Crystal structure and mutagenesis analysis of chitinase CrChi1 from the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* in complex with the inhibitor caffeine. *Microbiology*, 156(12), 3566-3574. <https://doi.org/10.1099/mic.0.043653-0>
- Yeo, D. C. J., Ng, P. K. L., Cumberlidge, N., Magalhães, C., Daniels, S. R., & Campos, M. R. (2008). Global diversity of crabs (*Crustacea : Decapoda : Brachyura*) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 275-286. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9023-3>
- Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13(3), 1133-1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>
- Yu, G., Xie, L. Q., Li, J. T., Sun, X. H., Zhang, H., Du, Q., Li, Q. Y., Zhang, S. H., & Pan, H. Y. (2015). Isolation, partial characterization, and cloning of an extracellular chitinase from the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 2275-2289. <https://doi.org/10.4238/2015.March.27.13>
- Zhang, C., Freddolino, P. L., & Zhang, Y. (2017). COFACTOR: Improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein-protein interaction information. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W291-W299. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx366>
- Zhang, J., Zhang, X., Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Ma, E., & Zhu, K. Y. (2011). Comparative genomic analysis of chitinase and chitinase-like genes in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *PLoS ONE*, 6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019899>
- Zhang, Y., Foster, J. M., Nelson, L. S., Ma, D., & Carlow, C. K. S. (2005). The chitin synthase genes *chs-1* and *chs-2* are essential for *C. elegans* development and responsible for chitin deposition in the eggshell and pharynx, respectively. *Developmental Biology*, 285(2), 330-339. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.06.037>
- Zhang, Y., & Skolnick, J. (2005). TM-align : A protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Research*, 33(7), 2302-2309. <https://doi.org/10.1093/nar/gki524>

Zhong, W., Ding, S., & Guo, H. (2015). The chitinase C gene PsChiC from *Pseudomonas* sp. And its synergistic effects on larvicidal activity. *Genetics and Molecular Biology*, 38(3), 366-372. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738320140320>

Zhou, F., Zhou, K., Huang, J., Yang, Q., Jiang, S., Qiu, L., Yang, L., & Jiang, S. (2018). Characterization and expression analysis of a chitinase gene (PmChi-5) from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under pathogens infection and ambient ammonia-N stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 72, 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.10.051>

Résumé: Les chitinases (EC 3.2.1.14) sont des enzymes capables d'hydrolyser la chitine, le deuxième biopolymère le plus abondant que l'on trouve principalement dans les exosquelettes des arthropodes et la paroi cellulaire des champignons. Les organismes contenant de la chitine et même ceux qui n'en contiennent pas (par exemple les bactéries et les plantes) peuvent produire ces enzymes. Peu de chitinases de la famille GH19 d'origine bactérienne ont été caractérisées, contrairement à leurs homologues végétaux, malgré leurs applications utiles dans la gestion des déchets et la lutte biologique, notamment lorsqu'elles sont associées à d'autres traits favorisant la croissance des plantes, tels que ceux de *Pseudomonas guariconensis*.

Cette étude visait à caractériser les chitinases produites par *P. guariconensis* en utilisant des outils bioinformatiques. À travers une analyse *in silico*, différentes propriétés telles que les caractéristiques physicochimiques, la présence de peptide signal, la localisation subcellulaire, la solubilité des protéines et la modélisation structurale ont été examinées. Une analyse fonctionnelle a également été réalisée pour comprendre les rôles potentiels et les applications de ces chitinases produites par les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes, les PGPR. Les résultats de la caractérisation ont révélé la nature alcaline, thermostable et hydrophile de la chitinase, ainsi que la localisation extracellulaire.

Mots clés: chitinase, chitine, *Pseudomonas guariconensis*, *in silico*, PGPR.

Abstract: Chitinases (EC 3.2.1.14) are enzymes capable of hydrolyzing chitin, the second most abundant biopolymer found primarily in the exoskeletons of arthropods and the cell wall of fungi. Chitin-containing organisms and non chitin-containing organisms (e.g. bacteria and plants) can produce these enzymes. Not many GH19 family chitinases of bacterial origin are characterized as opposed to their plant relatives despite their useful applications in waste management and biocontrol especially when coupled with other plant growth promoting traits such as that of *Pseudomonas guariconensis*.

This study aimed to characterize the chitinases produced by *P. guariconensis* using bioinformatic tools. Through *in silico* analysis, various properties such as physicochemical features signal peptide presence, subcellular localization, protein solubility, and structural modeling were examined. Functional analysis was also conducted to understand the potential roles and applications of these chitinases produced by plant growth promoting rhizobacteria, PGPR. Characterization results revealed the alkaline, thermostable and hydrophilic nature of the chitinase, as well as extracellular localization.

Keywords: chitinases, chitin, *Pseudomonas guariconensis*, *in silico*, PGPR.

ملخص: الكيتينازات (EC 3.2.1.14) هي إنزيمات قادرة على التحلل المائي للكيتين ، و هي ثاني أكثر البوليمرات الحيوية الموجودة بشكل رئيسي في الهياكل الخارجية للمفصليات وجدار خلية الفطريات. الكائنات الحية التي تحتوي على الكيتين وحتى تلك التي لا تحتوي (مثل البكتيريا والنباتات) يمكن لها أن تنتج هذه الإنزيمات. يتم تمييز عدد قليل من الكيتينازات من عائلة GH19 ذات الأصل البكتيري على عكس أقاربها النباتية على الرغم من تطبيقاتها المفيدة في إدارة النفايات والتحكم الحيوي، خاصةً عندما تقترن بسمات أخرى لتعزيز نمو النبات مثل تلك الموجودة في *Pseudomonas guariconensis*.

هدفت هذه الدراسة إلى توصيف الكيتينازات التي تنتجها *P. guariconensis* باستخدام أدوات البيومعلوماتية. من خلال التحليل الحاسوبي، تم فحص خصائص مختلفة مثل الخصائص الفيزيوكيميائية، ووجود الببتيدات الإشارية، وموقع الخلية الفرعية، وذوبانية البروتين، ونمذجة الهيكل الثانوي والثالثي. تم أيضًا إجراء تحليل وظيفي لفهم الأدوار والتطبيقات المحتملة لهذه الكيتينازات التي ينتجها البكتيريا المعززة لنمو النباتات في الجذور. كشفت نتائج التوصيف عن طبيعة الكيتيناز القاعدية، المقاومة للحرارة، المحبة للماء، بالإضافة إلى التوطن خارج الخلية.

الكلمات المفتاحية: الكيتيناز ، الكيتين ، *Pseudomonas guariconensis* ، التحليل الحاسوبي ، البكتيريا الجذرية التي تعزز نمو النبات.