

# **T H E S E**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I**

Discipline : Biochimie

Ecole Doctorale des Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé CBS-2

Présentée le 23 mai 2012 et soutenue publiquement par :

**Aline RIFFLET**

**Etude toxinologique du venin de fourmis exotiques ;  
Identification et caractérisation d'un peptide antimicrobien.**

Laurence Vian, Professeur, UFR de Pharmacie, Montpellier  
François Couderc, Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse  
Mohamed Amiche, CR CRNS, Université Paris Est Créteil  
Jean-Michel Camadro, Directeur de recherche, CNRS, Université de Paris 7  
Michel Treilhou, Professeur, CUFR JFC d'Albi  
Angélique Vétillard, Mcf, CUFR JFC d'Albi

**JURY**



Cette thèse de doctorat de la Faculté de Pharmacie de l'Université Montpellier I a été réalisée au laboratoire Venin et Activités Biologiques « VacBio » au CUFR Jean-François Champollion d'Albi, sous la direction de Michel Treilhou, Professeur des Universités en Biochimie et sous la co-direction d'Angélique Vétillard, Maître de conférence en Biologie moléculaire. Ce travail a été financé par la Région Midi-Pyrénées, le CUFR Champollion ainsi que la Communauté d'agglomération de l'Albigeois.

Je souhaite remercier Michel Treilhou, directeur du laboratoire VacBio, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse et de m'avoir accordé sa confiance dans la logistique du laboratoire.

Je remercie également Mr Hervé Pingaud, Directeur du CUFR Jean-François Champollion, pour son soutien moral et financier qui m'ont permis de terminer cette thèse dans de bonnes conditions.

Je tiens à adresser mes très sincères remerciements à tous les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Je remercie Mr Jean-Michel Camadro de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Je remercie Mrs Mohamed Amiche et François Couderc pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse pour leur disponibilité, leur écoute et leur soutien dans les moments difficiles.

Je tiens également à remercier Jérôme Leprince et Laure Guilhaudis pour leur accueil chaleureux au sein de leurs laboratoires, pour leurs conseils avisés ainsi que leur aide précieuse lors de la rédaction de l'article analytique.

Mes remerciements s'adressent ensuite à tous les membres de VacBio et du département des sciences du CUFR Champollion qui ont participé, de près ou de loin, au bon déroulement de ce doctorat. Je remercie plus particulièrement Elsa Bonnafé, Jean-Luc Carayon, Gaël Charpentier, Sabine Gavalda, Nathan Tené, Wafa Lamine et Delphine Do Santos pour leur gentillesse et leur amitié.

Je remercie Eva Schreck, du fond du cœur, pour sa bonne humeur et son soutien indéfectible durant ces 3 ans à Albi.

Je remercie mes proches pour m'avoir toujours soutenue et encouragée. Je dédie tout particulièrement cette thèse à mes parents et à ma grand-mère Alexandra. Je la dédie également à Romain, qui a su me supporter et me remotiver dans les moments difficiles.



## Sommaire

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>3</b>
<b>CHAPITRE 1 : LES VENINS</b>	<b>4</b>
1 APERÇU DES VENINS DU REGNE ANIMAL	4
1.1 Les animaux venimeux	4
1.2 Les animaux vénéneux	6
2 LE VENIN DES ARTHROPODES	9
2.1 Neurotoxines	9
2.2 Les amines biogènes	22
2.3 Les enzymes	22
<b>CHAPITRE 2 : LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS</b>	<b>25</b>
1 HISTORIQUE	25
2 LES PAMS DES INVERTEBRES	25
2.1 Structure	26
3 MODE D'ACTION DES PAMS	28
3.1 Interactions PAMs/Enveloppe bactérienne	29
3.2 Action sur la membrane cytoplasmique.	31
3.3 Perturbation du fonctionnement cellulaire : cibles intracellulaires.	35
4 MECANISMES DE RESISTANCE AUX PAMS	38
4.1 Modification de la charge nette	38
4.2 Modification de la fluidité membranaire	39
4.3 Modification des protéines membranaires	39
4.4 Production d'enzymes protéolytiques	39
<b>CHAPITRE 3 : GENERALITES SUR LE VENIN DE FOURMIS</b>	<b>40</b>
1 ROLE DU VENIN	40
1.1 L'attaque	40
1.2 La Défense	40
1.3 La communication chimique	42
2 BIOCHIMIE DES VENINS	42
2.1 L'acide formique des <i>Formicinae</i>	43
2.2 Les alcaloïdes des venins de fourmis	43
2.3 Autres phéromones et petites molécules dans le venin	47

2.4	Les polysaccharides des venins	50
2.5	Les protéines et peptides	51
<b>CHAPITRE 4 : LES FOURMIS DE L'ETUDE</b>		<b>59</b>
1	<i>TETRAMORIUM BICARINATUM</i>	59
1.1	Taxonomie	59
1.2	Historique et répartition géographique	59
1.3	Morphologie de l'espèce	60
1.4	Biologie de l'animal	61
1.5	Système vulnérant des <i>Tetramorium</i>	62
1.6	Investigations sur le venin de <i>Tetramorium</i>	63
2	<i>CREMATOGASTER STRIATULA</i>	64
2.1	Taxonomie	64
2.2	Historique et répartition géographique	65
2.3	Morphologie de l'espèce	65
2.4	Biologie de l'animal	67
2.5	Investigation sur le contenu de la glande de Dufour	67
<b>MATERIEL ET METHODES</b>		<b>71</b>
<b>CHAPITRE 1 : ELEVAGE DES FOURMIS</b>		<b>74</b>
1	CONSTRUCTION DES NIDS ET AIRES DE CHASSE	74
1.1	<i>Tetramorium bicarinatum</i>	74
1.2	<i>Crematogaster striatula</i>	75
2	CONDITIONS D'ELEVAGE	76
<b>CHAPITRE 2 : EXTRACTION DES VENINS</b>		<b>77</b>
1	GLANDE A VENIN DE <i>TETRAMORIUM BICARINATUM</i> .	77
2	GLANDE DE DUFOUR DE <i>CREMATOGASTER STRIATULA</i>	78
<b>CHAPITRE 3 : DETERMINATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES DES SUBSTANCES VENIMEUSES</b>		<b>79</b>
1	ETUDE COMPORTEMENTALE DES <i>CREMATOGASTER STRIATULA</i>	79
1.1	La prédation	79
1.2	Contrôle d'une source de nourriture	80
2	ACTIVITE INSECTICIDE ( <i>CREMATOGASTER STRIATULA</i> )	80
2.1	Test <i>in vivo</i> sur termites	80
2.2	Statistiques	81
3	ACTIVITE HEMOLYTIQUE DU LIQUIDE DE LA GLANDE DE DUFOUR	81
3.1	Statistiques	83
4	TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE ( <i>TETRAMORIUM BICARINATUM</i> )	84

4.1	Souches bactériennes et conditions de culture	84
4.2	Contrôle des souches de terrain	86
4.3	Application du test MTT comme test d'inhibition de croissance bactérienne	86
	<b>CHAPITRE 4 : TECHNIQUES ANALYTIQUES DE BIOCHIMIE ET DE CHIMIE</b>	<b>88</b>
1	ETUDE DU CONTENU DE LA GLANDE DE DUFOUR DE <i>CREMATOGASTER STRIATULA</i>	88
1.1	Analyse GC-MS	88
1.2	Analyse par LC-ESI-MS	90
2	ETUDE DU VENIN DE <i>TETRAMORIUM BICARINATUM</i>	91
2.1	Recherche de protéines par électrophorèse SDS-PAGE	91
2.2	Fractionnement du venin	92
2.3	Séquençage <i>de novo</i> des peptides isolés	95
	<b>CHAPITRE 5 : SYNTHÈSE DES PEPTIDES EN PHASE SOLIDE</b>	<b>97</b>
1	PRINCIPE DE LA SYNTHÈSE PEPTIDIQUE SUR SUPPORT SOLIDE	97
2	PROTOCOLE EXPERIMENTAL	98
2.1	Etape de clivage	100
2.2	Purification	100
2.3	Analyses	101
	<b>CHAPITRE 6 : ETUDES DE DICHROÏSME CIRCULAIRE</b>	<b>103</b>
1	PROTOCOLE EXPERIMENTAL	103
	<b>CHAPITRE 7 : TEST COLORIMÉTRIQUE VÉSICULES LIPIDES/PDA</b>	<b>105</b>
1	PRINCIPE	105
2	CONSTRUCTION DES VÉSICULES LIPIDES/PDA	106
2.1	Solutions mères de phospholipides et de PDA	106
2.2	Préparation des vésicules	107
	<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>109</b>
	<b>CHAPITRE 1 : <i>CREMATOGASTER STRIATULA</i></b>	<b>110</b>
1	INTRODUCTION	110
2	ETUDE COMPORTEMENTALE	111
2.1	La prédation	111
2.2	Comportement face à des espèces concurrentes	113
3	PROPRIÉTÉ INSECTICIDE DU CONTENU DE LA GLANDE DE DUFOUR	113
4	DISCUSSION DE L'ETUDE COMPORTEMENTALE ET DE L'ACTIVITÉ INSECTICIDE DU CONTENU DE LA GLANDE DE DUFOUR DES <i>C. STRIATULA</i>	115
5	ANALYSE DU CONTENU DE LA GLANDE DE DUFOUR	116
5.1	Analyse par GC-MS	116

5.2	Analyse par ESI-MS	119
6	DISCUSSION DE L'ANALYSE CHIMIQUE	121
7	PROPRIETE HEMOLYTIQUE DU LIQUIDE DE LA GLANDE DE DUFOUR	123
8	DISCUSSION DE L'ACTIVITE HEMOLYTIQUE	125
	<b>CHAPITRE 2 : TETRAMORIUM BICARINATUM</b>	<b>127</b>
1	EVALUATION DU POUVOIR ANTIMICROBIEN DU VENIN BRUT	127
1.1	Contrôle des souches de terrain	127
1.2	Application du test MTT sur bactéries	129
2	IDENTIFICATION DES MOLECULES D'INTERET	134
2.1	Analyse du venin de <i>T. bicarinatum</i> par LC-MS	134
2.2	Recherche de protéines dans le venin	137
2.3	Fractionnement du venin par filtres AMICON	139
2.4	Sous-fractionnement par HPLC	145
2.5	Analyse de la sous-fraction C <sub>11</sub>	146
2.6	Séquençage <i>de novo</i> des deux peptides	147
3	SYNTHESE DES PEPTIDES	160
4	RESULTATS OBTENUS PAR DICHROISME CIRCULAIRE	162
4.1	Dichroïsme circulaire du peptide 1	162
4.2	Cas du peptide 2	165
5	VALIDATION DES RESULTATS MICROBIOLOGIQUES AVEC LES PEPTIDES SYNTHETISES	168
5.1	Les solutions peptidiques testées	168
5.2	Résultats microbiologiques	168
6	DISCUSSION	179
6.1	Structure primaire des peptides	179
6.2	Structure secondaire des peptides	183
6.3	Pouvoir antibactérien de la bicarinaline	183
6.4	Relation structure-activité	184
7	TEST COLORIMETRIQUE A PARTIR DE VESICULES LIPIDES/PDA	184
7.1	Amélioration du protocole de synthèse	185
7.2	Test avec la mellitine	185
	<b>PERSPECTIVES DE L'ETUDE</b>	<b>189</b>
	<b>CHAPITRE 1 : CREMATOGASTER STRIATULA</b>	<b>190</b>
1	L'IDENTIFICATION DES MOLECULES D'INTERET	190
2	MODE D'ACTION DES MOLECULES AUX PROPRIETES INSECTICIDES	190
	<b>CHAPITRE 2 : TETRAMORIUM BICARINATUM</b>	<b>192</b>

1	DETERMINATION DU MODE D'ACTION DE LA BICARINALINE	193
1.1	Test colorimétrique vésicules Lipides/PDA	193
1.2	Relargage de la calcéine	193
1.3	Test avec le SYTOX green	194
1.4	Interaction Peptide/Membrane	194
2	VALORISATION DE LA BICARINALINE EN TANT QUE PEPTIDE ANTIMICROBIEN	196
3	EVALUATION DU POUVOIR ANTIFONGIQUE DE LA BICARINALINE	197
4	TESTS DE CYTOTOXICITE	198
4.1	Sur des cellules	198
4.2	Sur des tissus	200
<b>CONCLUSION GENERALE</b>		<b>201</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>		<b>203</b>
<b>ANNEXES</b>		<b>220</b>
<b>NOTION EN SPECTROMETRIE DE MASSE</b>		<b>221</b>
1.1	Modes d'ionisation	221
1.2	Les analyseurs de l'étude	226
1.3	Spectrométrie de masse en tandem	232

## Table des illustrations

Figure 1 : Les différents appareils d'inoculation chez les animaux venimeux.	5
Figure 2: Exemple d'organe de sécrétion chez les animaux vénéreux.	6
Figure 3 : Classification des différentes espèces d'arthropodes traitées dans ce chapitre.	9
Figure 4 : Structure des différents canaux ioniques voltage dépendant (d'après Catterall et al. 2000)	10
Figure 5 : Localisation des sites récepteurs aux neurotoxines sur la sous-unité $\alpha$ du canal sodium (Cestèle et Catterall, 2000).	14
Figure 6 : Principaux peptides antimicrobiens cationiques produits par le corps gras et sécrétés dans l'hémolymphe par <i>Drosophila melanogaster</i> en réponse à une agression microbienne. D'après E. André, J.-L. Dimarcq / Médecine et maladies infectieuses 37 (2007) 194-199.	26
Figure 7 : L'enveloppe des bactéries Gram positives. Schéma tiré du livre MICROBIOLOGIE (Prescott, Harley et Klein, édition De Boeck Supérieur, 2003)	30
Figure 8 : L'enveloppe des bactéries Gram négatives. Schéma tiré du livre MICROBIOLOGIE (Prescott, Harley et Klein, édition De Boeck Supérieur, 2003)	30
Figure 9 : Modèle du pore en « tonneau » d'après Brogden 2005 Les régions hydrophiles des peptides sont représentées en rouge et les régions hydrophobes en bleu.	32
Figure 10 : Modèle du pore torique d'après Brogden 2005. Les régions hydrophiles des peptides sont représentées en rouge et les régions hydrophobes en bleu.	33
Figure 11 : Modèle du tapis d'après Brogden 2005. Les régions hydrophiles des peptides sont représentées en rouge et les régions hydrophobes en bleu.	34
Figure 12 : Mode d'action des peptides antimicrobiens à action intracellulaire d'après Brogden 2005. Dans ce schéma, le microorganisme cible est une bactérie de type <i>E. coli</i> .	35
Figure 13 : Structure de la vancomycine.	36
Figure 14: Acides aminés et modifications post-traductionnelles rencontrés chez les lantibiotiques. D'après Wiley et A Van Der Donk, 2007.	36
Figure 15 : Structure de la mersacidine.	37
Figure 16 : Le mécanisme d'action de l'apidaecine. D'après Li et al., 2006.	38
Figure 17 : Tetraponerines T4, T8 et T7.	47
Figure 18 : Cascade d'activation du complément par voie classique.	50
Figure 19 : Schéma représentant l'ordre des Hyménoptères, du sous-ordre des Aculéates ainsi que leurs superfamilles des Apoïdæ et Vespoïdæ et leurs familles (Apoïdæ, Formicoïdæ et Vespoïdæ) avec le nombre de protéines isolées de leurs venins référencées dans les banques de données Swissprot et TrEMBL.	51
Figure 20: Localisation de la région d'Itabuna (Brésil).	60
Figure 21: Taille d'une ouvrière de <i>T. bicarinatum</i> .	60
Figure 22: Anatomie d'une ouvrière de <i>T. bicarinatum</i> . Vue sous binoculaire	61
Figure 23: Les différents stades de développement d'une fourmi.	62
Figure 24 : Photo de l'appareil vulnérant de <i>T. bicarinatum</i> prise sous microscope à contraste de phase.	63

Figure 25: Localisation du site de prélèvement des <i>C. striatula</i> .	65
Figure 26: Taille d'une ouvrière <i>C. striatula</i> .	66
Figure 27: Anatomie d'une ouvrière <i>C. striatula</i> . Vue sous binoculaire.	66
Figure 28 : Formation de cembrene.	68
Figure 29: Schéma synthétique de la démarche expérimentale adoptée pour l'étude des venins des deux fourmis.	73
Figure 30 : Nid de <i>T. bicarinatum</i> avec son aire de chasse.	75
Figure 31: Vue d'ensemble de l'élevage de fourmis.	76
Figure 32 : Schéma d'un aspirateur à insectes.	77
Figure 33 : Application locale des 0,5 $\mu$ L de solution de contenu de la glande de Dufour sur l'abdomen d'un termite.	81
Figure 34: Protocole de préparation des érythrocytes pour le test hémolytique.	82
Figure 35: Condition 1 du test hémolytique.	82
Figure 36: GC/MS du laboratoire Venin et Activités Biologiques (VacBio).	88
Figure 37: Système LC-ESI-MS du laboratoire Venin et Activités Biologiques (VacBio).	90
Figure 38: Obtention des trois fractions peptidiques.	93
Figure 39 : Chaîne HPLC SpectraSYSTEM (ThermoFinnigan).	94
Figure 40 : Schéma général de synthèse de peptides (stratégie Fmoc). Schéma issu et traduit du site de Sigma-Aldrich.	98
Figure 41 : Vue du synthétiseur automatique à micro-ondes Liberty.	99
Figure 42 : Appareil modulaire HPLC Gilson	100
Figure 43 : Spectromètre MALDI-TOF Voyager DE-PRO (Applied Biosystems™).	101
Figure 44 : (A) Dichrographe CD6 Jobin-Yvon et sa cellule en quartz. (B) vue de face et profil (C).	103
Figure 45 : Exemple de vésicule Lipides/PDA.	105
Figure 46 : Différentes transitions de couleur obtenues après association entre des PAMs et la membrane des vésicules.	106
Figure 47 : Capture d'un ouvrier termite par des <i>C. striatula</i> .	112
Figure 48 : Concurrence interspécifique entre une ouvrière <i>C. striatula</i> et des ouvrières <i>C. brutus</i> pour l'accès à une goutte de miel.	113
Figure 49 : Effet dose/temps d'une solution équivalente à 3 glandes/termite sur des termites.	115
Figure 50 : Chromatogrammes de l'extrait hexanique du liquide de la glande de Dufour en GC-MS.	117
Figure 51 : Spectre MS obtenu par LC-ESI-MS du liquide de la glande de Dufour.	119
Figure 52 : Spectre d'infusion ESI-MS et spectres MS/MS des ions $m/z$ 803,63 (a) et $m/z$ 1584,43 (b).	120
Figure 53 : Spectre MS/MS de l'ion $m/z$ 803,70.	121
Figure 54 : Pourcentage de lyse d'érythrocytes humains exposés à différentes concentrations d'extrait de la glande de Dufour de <i>C. striatula</i> .	123
Figure 55 : Effets du chlorure de potassium (KCl 10 mM), de l'EDTA (10 mM) et du GSH (3 mM) sur l'activité hémolytique du liquide de la glande de Dufour (« venom ») de <i>C. striatula</i> .	124
Figure 56 : Etalement de <i>S. aureus</i> sauvage (LDA) sur agar Baird-Parker RPF.	128

Figure 57 : Plaques 96-puits après le test MTT sur les souches de terrains. _____	130
Figure 58 : Courbes "dose-effet" du venin brut et du venin en présence de protéinase K sur des souches sauvages. _____	131
Figure 59 : Courbe « dose-effet » du venin brut et de la carbenicilline sur <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ . _____	132
Figure 60 : Courbes "dose-effet" du venin brut et de la ciproflaxine sur <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. _____	133
Figure 61 : Chromatogrammes réalisés en LC-MS des 3 prélèvements de venin brut de <i>Tetramorium bicarinatum</i> . _____	135
Figure 62 : Gel SDS-PAGE 16% du venin brut (1), du venin brut traité à la protéinase K (2), de la protéinase K (3), du culot protéique du venin (4) et du marqueur de taille (MP). _____	137
Figure 63 : Gel SDS-PAGE 16% du culot protéique du venin brut. _____	138
Figure 64 : Gel SDS-PAGE 16% du venin brut et des trois fractions A, B et C obtenues après fractionnement à l'aide du système AMICON®. _____	140
Figure 65 : TIC des différentes fractions A, B et C en LC-MS. _____	141
Figure 66 : Evaluation de l'activité antibactérienne des Fraction A, B et C sur les staphylocoques sauvages. _____	142
Figure 67 : Chromatogramme de masse (LC-ESI-MS) TIC du venin brut (A) et de la fraction C (B) de <i>T. bicarinatum</i> . _____	144
Figure 68 : Sous-fractionnement de la fraction C par HPLC-DAD. _____	146
Figure 69 : A- Spectre de masse de la sous fraction C <sub>11</sub> obtenu par infusion sur la trappe ionique 3D. B - zoom scan de l'ion dichargé m/z 1107,73. _____	147
Figure 70 : Spectre MS/MS de l'ion monochargé m/z 1572,89. _____	148
Figure 71 : Enchaînement des sept premiers acides aminés de l'extrémité C-terminale. _____	149
Figure 72 : Spectre MS/MS de l'ion dichargé m/z 787,00 et le zoom de la zone de masses (250-750 m/z). _____	151
Figure 73 : Les 10 acides aminés qui composent l'extrémité C-terminale du peptide 2. _____	153
Figure 74 : Agrandissement de la zone 1000 à 1600 m/z du spectre MS/MS de la figure 63. _____	154
Figure 75 : Hypothèse de séquence primaire du peptide 2. _____	155
Figure 76: Profil isotopique de l'ion monochargé m/z 1572,02555 en haute résolution. _____	156
Figure 77 : Spectre MS/MS de l'espèce trichargée m/z 738,7. _____	157
Figure 78 : Spectre déconvolué final obtenu à partir des spectres MS/MS de l'ion dichargé m/z 738,7. _____	158
Figure 79 : Evaluation de la pureté des produits de synthèse par HPLC. _____	161
Figure 80 : Spectres dichroïques du peptide 1 carboxylé en C-terminal dissous dans différentes concentrations en TFE et SDS. _____	162
Figure 81 : Spectres dichroïques du peptide 1 et peptide 1-COOH obtenus dans 25 et 50% de TFE et dans du SDS à 8 mM. _____	165
Figure 82 : Spectres dichroïques du peptide 2 carboxylé en C-terminal dissous dans différentes concentrations en TFE et SDS. _____	166
Figure 83 : Spectres dichroïques du peptide 2 et peptide 2-COOH obtenus dans 50% de TFE dans l'eau et dans du SDS à 8 mM. _____	167
Figure 84 : Photos des plaques MTT de <i>S. aureus</i> CIP 53156. _____	169



<i>Figure 85 : Evaluation de l'activité antibactérienne des peptides synthétisés et de la mellitine sur S. aureus CIP 53156.</i>	170
<i>Figure 86 : Courbes « dose-effet » du peptide 1 et de son homologue carboxylé ainsi que de la mellitine pour la détermination des CI<sub>50</sub> sur S. aureus CIP 53156.</i>	171
<i>Figure 87 : Résultat du test MTT sur S. aureus CIP 53156 avec le peptide 1 sous forme carboxylée et amidée.</i>	172
<i>Figure 88 : Evaluation de l'activité antibactérienne des peptides synthétisés et de la mellitine sur S. xylosus ATCC 35033.</i>	173
<i>Figure 89 : Courbes « dose-effet » de la bicarinaline et de son homologue carboxylé ainsi que de la mellitine pour la détermination des CI<sub>50</sub> sur S. xylosus ATCC 35033.</i>	174
<i>Figure 90 : Résultat du test MTT sur S. xylosus ATCC 35033 avec la bicarinaline.</i>	175
<i>Figure 91 : Photos des plaques 96 puits suite au test MTT appliqué sur la souche L. monocytogenes ATCC 13932.</i>	176
<i>Figure 92 : Courbes « dose-effet » de la bicarinaline et de son homologue carboxylé ainsi que de la mellitine pour la détermination des CI<sub>50</sub> sur L. monocytogenes ATCC 13932.</i>	177
<i>Figure 93 : Courbes « dose-effet » de la bicarinaline et de son homologue carboxylé ainsi que de la mellitine et de l'éthambutol pour la détermination des CI<sub>50</sub> sur M. smegmatis mc<sup>2</sup> 155.</i>	178
<i>Figure 94 : Vésicules + mellitine après différents temps d'incubation (0, 40 min et 3 h).</i>	186
<i>Figure 95 : %RC des vésicules ayant subi l'action de la mellitine après 35 et 60 min d'incubation.</i>	187
<i>Figure 96 : Disparités des valeurs du %RC d'un même type de complexe vésiculaire au cours de trois expériences consécutives (A9-A12-A13).</i>	188
<i>Figure 97: Schéma d'un spectromètre de masse.</i>	221
<i>Figure 98 : schéma de la source ESI orthogonale de la trappe ionique LCQ Advantage Max.</i>	223
<i>Figure 99 : Emission des ions en phase gazeuse en ESI.</i>	224
<i>Figure 100: illustration d'une Ion trap 3D.</i>	226
<i>Figure 101 : Diagramme de stabilité de Mathieu (<math>a_z = f(q_z)</math>) dans une trappe ionique.</i>	228
<i>Figure 102 : Schéma du LTQ-Orbitrap Velos de Thermo Fisher.</i>	229
<i>Figure 103 : Principe de fonctionnement du MALDI-TOF en mode linéaire.</i>	231
<i>Figure 104 : Principe du fonctionnement du MALDI-TOF muni d'un réflecteur électrostatique.</i>	232
<i>Figure 105 : Principales voies de fragmentation des peptides par MS/MS CID.</i>	235
<i>Figure 106 : Mécanismes de formation des ions immoniums.</i>	236
<i>Figure 107 : Ions fragments résultant d'un double clivage de la chaîne peptidique</i>	237
<i>Figure 108 : Spectre théorique de l'Orpotrine (HGGYKPTDK).</i>	237
<i>Figure 109 : Résumé des règles de base du séquençage de novo.</i>	239
<i>Figure 110 : Spectre MS/MS de l'ion doublement chargé m/z 963.1.</i>	240

## Tableaux

Tableau 1: Récapitulatif des animaux venimeux et vénéreux.....	8
Tableau 2 : Propriétés des différents types de CCDVs.....	12
Tableau 3 : Structure de l'omega-agatoxine 4a, neurotoxine de l'araignée du genre <i>Agelenopsis</i> ciblant les CCDVs.....	17
Tableau 4 : Structure de la delta-hexatoxine, neurotoxine de la mygale du genre <i>Hadronyche</i> ciblant les CSVDs.....	18
Tableau 5 : Principales caractéristiques des PAMs à hélice $\alpha$ des invertébrés. Les activités des molécules sont notées : B, antibactérien; F, antifongique; H, hémolytique; I, insecticide; T, activité trypanolytique et Y, lyse sur les levures. *, amidation de l'extrémité C-terminale. Tableau extrait de la revue de Bulet et al., 2004 sur les peptides antimicrobiens.....	27
Tableau 6 : Caractéristiques des PAMs présentant plusieurs ponts disulfure chez les invertébrés. Tableau extrait de la revue de Bulet, et al., 2004 sur les peptides antimicrobiens.....	27
Tableau 7 : PAMs-RP d'insectes.....	28
Tableau 8 : Nomenclature des alcaloïdes isolés du venin des fourmis de feu.....	44
Tableau 9 : Exemples d'alcaloïdes employés comme phéromones.....	46
Tableau 10 : Exemples de terpènes présents dans le venin de fourmis (Piek).....	49
Tableau 11 : Enzymes présentes dans le venin de fourmi (Piek, 1986).....	52
Tableau 12 : Séquence des 5 sous-unités qui composent les myrmexines.....	54
Tableau 13 : Liste des peptides identifiés dans les venins de fourmis.....	56
Tableau 14 : Acides aminés libres du venin de <i>T. caespitum</i> .....	64
Tableau 15 : Evaluation de la taille et du poids des <i>C. striatula</i> et termites.....	79
Tableau 16: Tableau récapitulatif des différents paramètres du test hémolytique.....	83
Tableau 17 : Liste des souches bactériennes fournies par le LDA d'Albi.....	84
Tableau 18 : Liste des souches bactériennes fournies par le laboratoire de microbiologie de l'ENFA.....	84
Tableau 19 : Compositions du gel de séparation et du gel de concentration.....	92
Tableau 20: Molécules entrant dans la composition du calibrant MALDI-TOF.....	102
Tableau 21 : Concentrations des solutions mères des phospholipides et du PDA.....	107
Tableau 22 : Nombres d'individus de <i>C. striatula</i> recrutés pour la capture de termites.....	112
Tableau 23 : Comparaison des effets doses/temps d'exposition du contenu de la glande de Dufour appliqué localement sur l'abdomen de termites.....	114
Tableau 24 : Proposition de formules brutes pour les pics de la figure 67 basée sur leur masse et les travaux de Daloz et Detrain.....	118
Tableau 25 : Caractérisation de la souche sauvage de <i>S. aureus</i> provenant du Laboratoire Départemental d'Analyses.....	128
Tableau 26 : Activités enzymatiques des souches référencée et sauvage de <i>S. aureus</i> .....	129
Tableau 27 : $CI_{50}$ du venin brut calculées pour chaque souche sauvage.....	132

Tableau 28 : $CI_{50}$ du venin brut calculées pour les souches bactériennes référencées.....	133
Tableau 29 : masses $m/z$ et masses moléculaires des composés présents dans les divers lots de venin brut de <i>T. bicarinatum</i> .....	136
Tableau 30 : Masses $m/z$ et masses moléculaires des composés du venin brut et de la fraction C.....	145
Tableau 31 : Calculs de différence de masse entre les ions consécutifs de la série b et identification des acides aminés correspondants.....	149
Tableau 32 : Détermination des « fragments y » à partir des $m/z$ des « fragments b ».....	150
Tableau 33 : Détermination des acides aminés par analyse des fragments « y ».....	152
Tableau 34 : Détermination d'acides aminés à l'aide de la série des fragments « y-NH <sub>3</sub> ».....	153
Tableau 35 : Détermination des acides aminés de l'extrémité N-terminale.....	155
Tableau 36 : Fragments « b » et « y » mono et multichargés détectés par le logiciel Peaks (5.2) pour le peptide 1.....	158
Tableau 37 : Bilan de la synthèse des peptides.....	160
Tableau 38 : Pourcentage d'hélicité et nombre d'acides aminés inclus dans l'hélice du peptide 1- $COOH$ , calculés en fonction des différentes conditions testées.....	164
Tableau 39 : Comparaison du pourcentage d'hélicité du peptide 1 et peptide 1- $COOH$ dissous dans le TFE et le SDS.....	165
Tableau 40 : Pourcentage d'hélicité et nombre d'acides aminés inclus dans l'hélice du peptide 2- $COOH$ , calculés en fonction des différentes conditions testées.....	166
Tableau 41 : Comparaison du pourcentage d'hélicité du peptide 2 et peptide 2- $COOH$ dissous dans le TFE et le SDS.....	167
Tableau 42 : Récapitulatif des conditions expérimentales du test MTT sur les staphylocoques.....	168
Tableau 43 : Concentrations en peptides testées sur <i>S. aureus</i> .....	169
Tableau 44 : Concentrations exactes en peptides testées sur <i>S. aureus</i> .....	170
Tableau 45 : Récapitulatif des $CI_{50}$ des différents peptides, calculées pour les <i>S. aureus</i> .....	171
Tableau 46 : Récapitulatif des $CI_{50}$ des différents peptides, calculées pour les <i>S. xylosus</i> .....	174
Tableau 47 : Concentrations exactes en peptides testées sur <i>S. xylosus</i> .....	175
Tableau 48 : Concentrations exactes en peptides testées sur <i>L. monocytogenes</i> .....	176
Tableau 49 : Récapitulatif des $CI_{50}$ des différents peptides, calculées pour les <i>L. monocytogenes</i> .....	177
Tableau 50 : Récapitulatif de la $CI_{50}$ des différents peptides, calculées pour <i>M. smegmatis mc<sup>2</sup> 155</i> .....	178
Tableau 51 : Séquences de toxines issues du venin d'arthropodes.....	180
Tableau 52 : Alignements de séquences peptidiques entre la bicarinaline et des PAMs d'amphiens.....	182
Tableau 53 : Concentration en mellitine testées sur les vésicules DPPC/PDA (4/6).....	185
Tableau 54 : Calcul des %RC en fonction des concentrations de mellitine et du temps d'incubation.....	187
Tableau 55 : Exemple de souches de champignons susceptibles d'être sélectionnés pour les prochains tests.....	198
Tableau 56 : Fonctions des 5 gènes étudiés dans l'étude de sensibilisation de cellules dendritiques aux allergènes.....	200
Tableau 57 : Les différentes matrices utilisées en MALDI.....	225
Tableau 58 : Incréments des masses des différents acides aminés.....	236

<i>Tableau 59 : Masses d'ions immoniums correspondant.....</i>	<i>237</i>
<i>Tableau 60 : Nature des modifications post-traductionnelles courantes et leur masse associée.....</i>	<i>242</i>

## Abréviations

A600	Absorbance à 600 nm
ACN	acétonitrile
ALKP	alcaline phosphatase
AP	acide phosphatase
BDC	brut de clivage
CaCl <sub>2</sub>	chlorure de calcium
CI <sub>50</sub>	concentration qui inhibe 50% des organismes
IC50	concentration minimale inhibitrice
CNS	Coagulase negative staphylococcus
CPS	Coagulase positive staphylococcus
Ct	extrémité Carboxy-terminale
DC	Dichroïsme circulaire
DCM	Dichloromethane
DIEA	N,N Diisopropylethylamine
DLS	Dynamic light scattering
DMF	Diméthylformamide
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DMPE	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
DMPG	1,2- dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)]
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
ENFA	Ecole nationale de formation agronomique
Fmoc	9-Fluorenylméthoxy-carbonyl
GC	gaz chromatography
GSH	Glutathion
HMP	4-hydroxyméthylphénoxy-méthyl-copolystyrène-1% divinylbenzène
HPLC	high performance liquid chromatography
IC	ionisation chimique
IE	impact électronique
IPBS	Institut de pharmacologie et biologie structurale
KCl	chlorure de potassium
LC	liquide chromatography
LDA	Laboratoire départemental d'analyses du Tarn
LTQ	Linear trap quadrupole
MALDI	matrix assisted laser desorption Ionisation
MS	mass spectrometry
MTT	bromure de 3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium
NMP	N-méthyl-2-pyrrolidone
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAMs	Peptides antimicrobiens
PBS	phosphate buffer sodium
PDA	polydiacétylène
PLA	phospholipase A
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction

SDS	sodium dodécyl sulfate
TBME	Tert-butylmethylether
TBTU	Tetrafluoroborate de 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium
TEMED	N,N,N,N,-tétra méthyle éthylène diamine
TFA	Acide Trifluoroacétique
TFE	Trifluoroéthanol
TIS	Triisopropylsilane
TOF	time of flight

## Introduction générale

Les animaux venimeux ont toujours suscité à la fois crainte et fascination chez l'Homme. Les premières études sur les venins datent de la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle et avaient pour unique objectif le développement d'antivenins. Si la création de nouveaux antivenins est toujours d'actualité pour protéger au maximum les populations « cohabitant » avec les espèces les plus dangereuses, depuis plusieurs années la communauté scientifique s'intéresse à la capacité des venins à fournir de nouvelles molécules bioactives susceptibles d'intéresser le domaine médical, pharmacologique et agronomique. Dans un premier temps, la recherche de molécules actives s'est naturellement portée sur les venins de serpents connus pour leur action foudroyante et les dommages corporels engendrés à la suite d'une morsure. Ces animaux présentent également l'avantage d'être une source abondante en venin. Depuis une trentaine d'années, de nombreux travaux sont menés sur les venins d'insectes. Cet engouement peut s'expliquer par les raisons suivantes :

- les insectes constituent un groupe majeur du règne animal.
- l'étude du venin d'insecte est devenue plus accessible grâce aux avancées technologiques.

En effet, le développement de techniques de séparation et d'analyse plus rapides et plus sensibles comme la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse permet aujourd'hui d'étudier de très petites quantités de venin et de caractériser des molécules présentes à l'état de trace.

Si les abeilles, guêpes, araignées et scorpions sont des modèles récurrents dans la littérature, les fourmis sont encore peu étudiées.

D'après les statistiques du site AntWeb, plus de 14 000 espèces de fourmis sont recensées dans le monde et les myrmécologues estiment qu'il en existe deux fois plus. Les fourmis sont présentes sur tous les territoires et leur succès écologique réside dans l'organisation de la colonie ainsi que dans leurs sécrétions chimiques.

Les investigations menées sur le venin de fourmis ont révélé la complexité de ce mélange et la diversité chimique des molécules. Si certains venins sont composés essentiellement de peptides, d'autres renferment des alcaloïdes, des alcools et d'autres composés volatils.

Ce travail de thèse a pour objectif de déterminer les activités biologiques des sécrétions venimeuses de deux fourmis exotiques : *Crematogaster striatula* et *Tetramorium bicarinatum* et de caractériser les composés responsables de ces activités.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la glande de Dufour de *C. striatula* et à la glande à venin de *T. bicarinatum*. Plusieurs axes de recherche ont été explorés.

Le premier concerne l'évaluation des activités biologiques du liquide de la glande de Dufour sur le termite et les hématies.

Le deuxième axe est consacré à l'étude des du venin de *Tetramorium bicarinatum* et à la caractérisation d'un peptide antimicrobien. Cette caractérisation a été réalisée par séquençage *de novo*. Une fois le peptide synthétisé, sa capacité à inhiber la croissance bactérienne a été validée sur un ensemble de souches sauvages et référencées.

Ces deux chapitres sont précédés d'une synthèse bibliographique évoquant l'intérêt des toxines animales dans diverses disciplines et les différentes techniques d'analyses permettant d'identifier ces toxines et leurs propriétés biologiques. Une partie expérimentale définira les différents protocoles et appareils utilisés lors de ces travaux.



## Etude bibliographique

Le premier chapitre fait état du venin des arthropodes et plus exactement du venin d'araignées, de scorpions ainsi que de celui de certains hyménoptères tels que les abeilles et guêpes.

Le second chapitre est consacré aux peptides antimicrobiens.

Le troisième chapitre traite du venin de fourmis ainsi que de ses nombreux composants.

Le quatrième chapitre qui clôt l'étude bibliographique présente les deux espèces de fourmis étudiées durant cette thèse : *Crematogaster striatula* et *Tetramorium bicarinatum*.

## Chapitre 1 : Les venins

On appelle Toxinologie, la discipline scientifique ayant pour objet l'étude des venins, poisons et toxines d'origine animale, végétale et microbienne. La Toxinologie est souvent considérée comme une branche exotique de la Toxicologie. Cependant, l'étude des toxines ne permet pas seulement de découvrir de nouvelles molécules actives mais aussi de mieux appréhender les mécanismes de transduction du signal intracellulaire. Elle permet également d'utiliser la composition des venins comme critère taxonomique afin de décrypter l'évolution de certaines espèces et d'établir un lien phylogénétique entre elles.

### 1 Aperçu des venins du règne animal

Par définition, les venins sont des composés nuisibles à une certaine dose pour les organismes cibles de l'organisme producteur. Ils interfèrent avec les principales fonctions physiologiques des proies provoquant ainsi une envenimation ou un empoisonnement pouvant entraîner la mort. Les venins sont des mélanges complexes dont les composés peuvent avoir des propriétés toxiques et d'autres activités annexes. Il est important de distinguer les espèces venimeuses, qui possèdent des glandes à venin, des espèces vénéneuses toxiques de par leur chair. Les animaux venimeux comme les vénéneux occupent aussi bien le milieu terrestre que marin.

#### 1.1 Les animaux venimeux

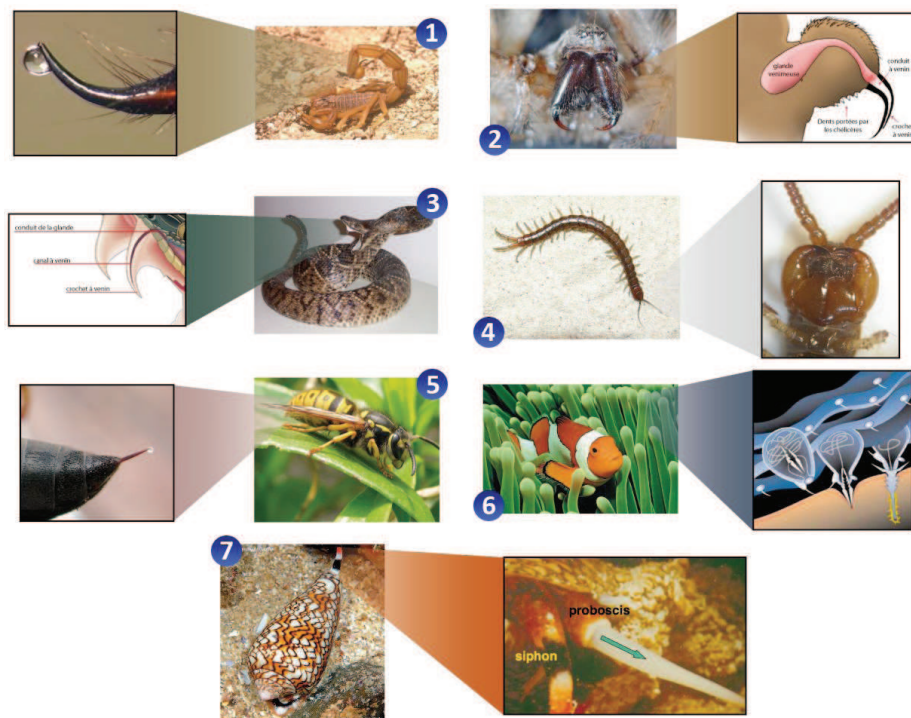
Les animaux venimeux produisent du venin élaboré par un groupe de cellules spécifiques de l'organe sécréteur. L'organe producteur est généralement une glande, la glande venimeuse, qui permet dans la plupart des cas, la synthèse et le stockage du venin. Ces animaux possèdent également un appareil inoculateur qui leur permet d'injecter le venin par morsure ou par piqûre. L'appareil vulnérant définit l'ensemble du tissu producteur et de l'appareil inoculateur. Les animaux venimeux utilisent leur venin pour la capture de proies, leur pré-digestion et pour se défendre des prédateurs.

En milieu aquatique, les animaux venimeux sont représentés par les mollusques, méduses, anémones de mer, poissons et serpents marins dont la toxicité est plus

élevée que celle des serpents terrestres. Sur terre, les vertébrés venimeux qui prédominent sont essentiellement les serpents, on retrouve également quelques espèces de mammifères et d'oiseaux. Les arachnides, myriapodes et insectes sont majoritaires chez les arthropodes venimeux. Chez les arachnides, toutes les familles de scorpions sont venimeuses mais seule une vingtaine d'espèces s'avèrent dangereuses pour l'Homme. Il en est de même pour les araignées à l'exception de la famille des uloboridés qui ne produisent pas de venin.

### ⇒ Les différents appareils vulnérants

Un aperçu des différents types d'appareil vulnérant est illustré dans la Figure 1. Les animaux venimeux sont munis de glandes sécrétrices de venin et par conséquent d'un appareil inoculateur, adapté à leurs besoins et à leurs techniques de chasse.



**Figure 1 : Les différents appareils d'inoculation chez les animaux venimeux.**

1-Aiguillon de scorpion ; 2-Chélicères d'araignée ; 3- Crochets de serpents ; 4- Forcipules de scolopendre ; 5- Dard de guêpe ; 6-Nématocystes d'anémone ; 7-Proboscis de cône marin.

Un aperçu de l'ensemble des animaux venimeux et de leurs appareils d'inoculation est décrit dans le Tableau 1.

## 1.2 Les animaux vénéreux

Les animaux vénéreux possèdent également des tissus ou glandes producteurs de composés toxiques. A la différence des animaux venimeux, ils peuvent récupérer ces composés dans leur environnement : par exemple chez les plantes ou micro-organismes. Ils captent ces poisons, souvent par le biais de la nourriture, et les accumulent dans leur organisme. Les animaux vénéreux ont un usage passif de leurs poisons puisque l'empoisonnement est possible seulement par leur ingestion.

La peau des amphibiens est recouverte d'un mucus qui les protège du dessèchement ainsi que des infections microbiennes. Ce mucus contient des toxines de type amines biogènes, alcaloïdes, composés stéroïdiens et peptides qui s'avèrent être toxiques lorsqu'elles rentrent en contact avec des muqueuses. Certains animaux vénéreux comme le crapaud et la salamandre sont capables de libérer activement leurs toxines, ce qui permet de les considérer comme venimeux (Figure 2). Ces animaux possèdent sur le corps des glandes à sécrétions toxiques qu'ils peuvent excréter lorsqu'ils sont malmenés.

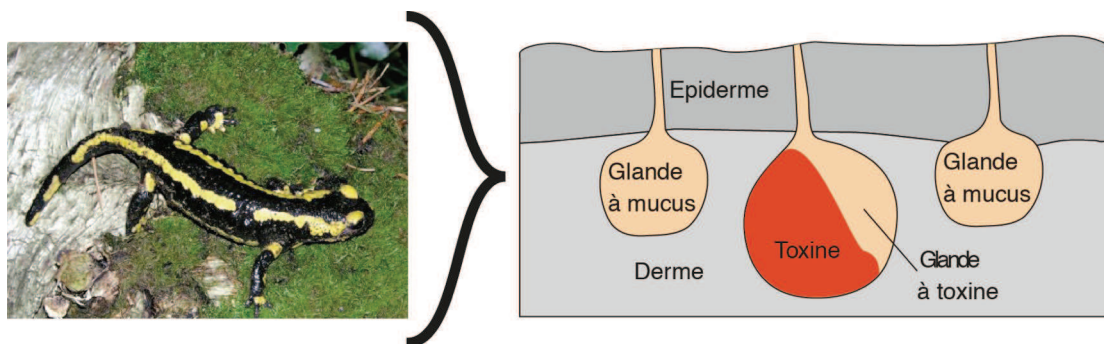


Figure 2: Exemple d'organe de sécrétion chez les animaux vénéreux.

Taxons	Animaux	Système d'inoculation	Substance toxique			Pathologies
			type	nature	exemples	
<b>Arthropodes</b>	Araignées	Chélicères	Neurotoxines Toxines nécrotoxiques Peptides antimicrobiens	Peptides, protéines, molécules polyaminiques	Robustoxine Latrotoxine Sphingomyélinase D	Nécrose locale, anurie, douleur intense, hypertension, hypersalivation, arythmie cardiaque
	Myriapodes → Scolopendre	Forcípules	Cardiotoxique	Protéines Histamine	/	Brûlures, érythèmes, oedèmes, nécroses superficielles, nausées, irrégularités cardiaque et respiratoire, paralysie
	Scorpions	Aiguillon	Neurotoxines Peptides antimicrobiens	Enzymes Polypeptides	Noxiustoxine Charybotoxine	Douleur aigüe, dyspnée, engourdissements, troubles cardiaques
	Hyménoptères → Guêpes, abeilles, fourmis	Aiguillon postérieur	Neurotoxines Agents hémolytiques Peptides antimicrobiens	Peptides Alcaloïdes	Mellitine, ponéricine, euménitine	Prurit, choc anaphylactique, oedème
<b>Coelentérés</b>	Actinies → Anémones de mer	Nématocystes	Neurotoxines Cytotoxines Agents hémolytiques	Protéines	Anémones toxines	Urticaire, prurit, brûlures, paralysie, vasodilatation intestinale, troubles respiratoires
	Méduses		Facteurs nécrotoxiques Cardiotoxiques Neurotoxines Facteurs hémolytiques	Protéines Enzymes	CrTXA-CrTXB	
	Physalie		Cytotoxine	Protéines	Physaliatoxine	
<b>Echinodermes</b>	Oursins	Pédicellaires	Neurotoxines Peptides antimicrobiens	Protéines Phospholipase A2	Strongylocine	Erythèmes, engourdissement, douleurs intenses, brûlures.
<b>Mollusques</b>	Céphalopodes → Pieuvre à anneaux bleus	Mâchoire cornée	Neurotoxines	Protéines Alcaloïdes	Maculotoxine Tetrodotoxine	Paralysie

	Gastéropodes → Cône marin		Proboscis	Neurotoxines	Protéines	α-conotoxine ω-conotoxine	Paralytie
<b>Vertébrés</b>	Amphibiens	Crapaud, dendrobates	Peau	Neurotoxines peptides antimicrobiens	Alcaloïdes stéroïdiens	Batrachotoxine	Vasoconstriction, polyurie,
		salamandre		neurotoxine	Alcaloïdes stéroïdiens	Samandarine	convulsions
		Musaraignes	Dents	Neurotoxine	Protéines Enzyme	Kallicrine	Hypotension rapide
	Mammifères	Ornithorynque	Eperon érectile sur les pattes arrière	Neurotoxines	Protéines Enzyme	5-hydroxytryptamine Histamine Hyaluronidase Autres...	Vive douleur persistante, oedème
	Oiseaux	<i>Pitohui dichrous</i> , <i>Pitohui kirhocephalus</i>	Plumes, peau, muscles	Neurotoxines	Alcaloïde stéroïdien	Homobatrachotoxine	Paralytie musculaire spastique, par contact brûlures des muqueuses et engourdissement des lèvres et bouche.
		<i>Ifrita kowaldi</i>		Neurotoxines	Alcaloïdes stéroïdiens	Batrachotoxine + homologues	
	Poissons osseux	Vive, Synancée	Aiguillon de l'opercule et de la nageoire caudale	Facteur létal hémolytique	Protéines	Stonustoxine	Vive douleur locale, paresthésies, hypotension, nécrose
	Poissons séliaciens Serpents protéroglyphes Serpents solénoglyphes	Raie pastenague	Aiguillon caudal	/	Proteines	/	douleur aigüe
		Cobra, mamba, taïpan, Serpent corail	Crochets buccaux, crochets cannelés	Neurotoxines Cardio-cytotoxiques	Polypeptides enzymes	Taipoxine Textilotoxine	Œdème local, vomissements, arythmies cardiaques, troubles respiratoires.
		Vipères, Crotale, fer de lance	Crochets buccaux creux	Facteurs hémorragiques		Daboïatoxine Agkistrodotoxine	Nécroses locales, douleurs abdominales, collapsus

**Tableau 1: Récapitulatif des animaux venimeux et vénéneux.**

Ce tableau a été réalisé à l'aide de l'ouvrage « Animaux venimeux et vénéneux » de Dietrich Mebs, Edition Tec&Doc Lavoisier 2006.

## 2 Le venin des arthropodes

Le venin des arthropodes est un cocktail de molécules de différentes natures et aux propriétés biologiques variées. Parmi ces composés on distingue des neurotoxines peptidiques et non peptidiques, des enzymes, des amines biogènes, des acides aminés libres ainsi que des peptides cytolytiques.

Ce chapitre est consacré plus précisément aux différentes toxines extraites des venins d'arachnides et d'hyménoptères (Figure 3).

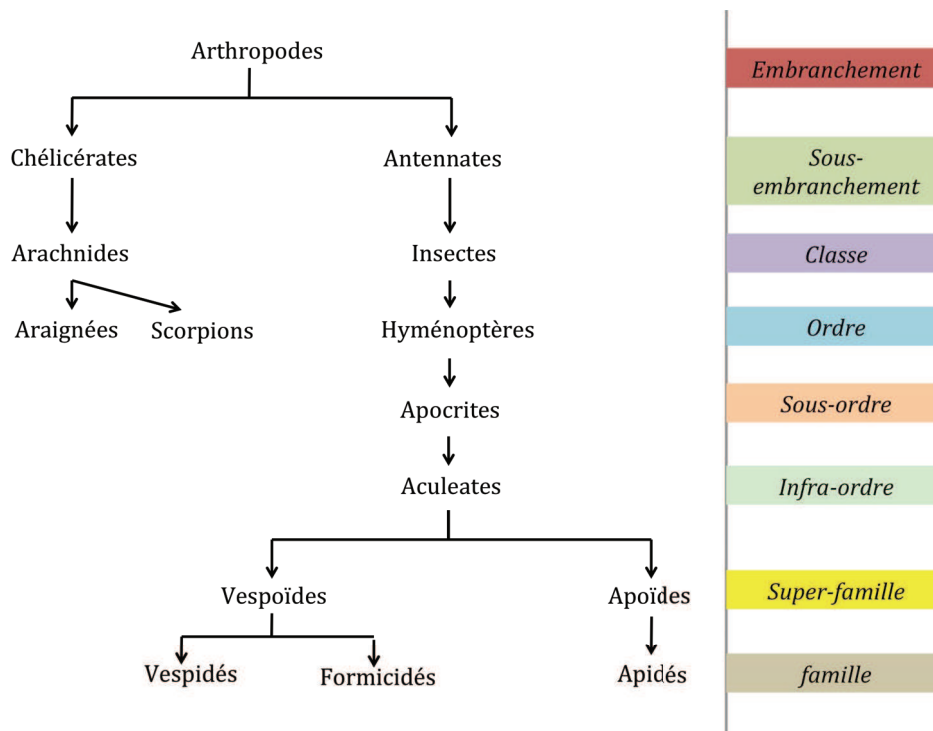


Figure 3 : Classification des différentes espèces d'arthropodes traitées dans ce chapitre.

### 2.1 Neurotoxines

#### 2.1.1 Cibles : les canaux ioniques

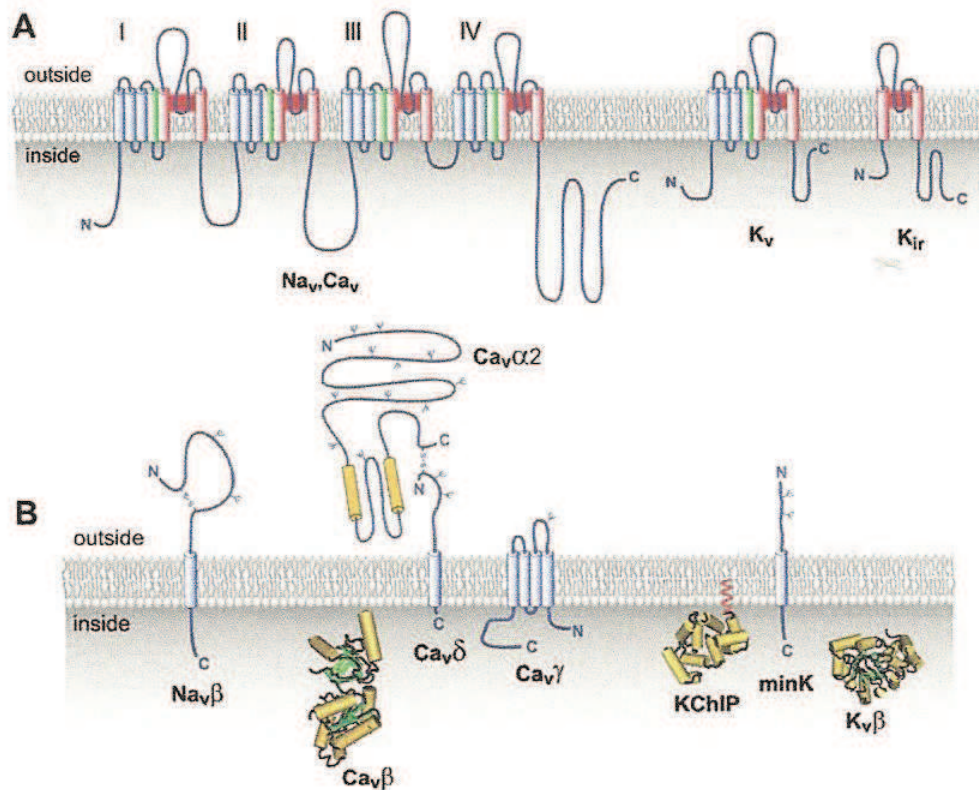
Un grand nombre de toxines ont comme cibles sélectives les canaux ioniques des neurones et autres cellules.

Dans les cellules excitables, les canaux calcium, sodium et potassium sont responsables de variations du potentiel d'action. De part leur sensibilité à certaines toxines ou agents pharmaceutiques, un grand nombre de canaux ont pu être isolés puis purifiés et ensuite clonés.

La sous-unité  $\alpha$  des canaux calcium et sodium est un polypeptide à quatre domaines (I, II, III, IV) constitués chacun de six segments transmembranaires (S1 à S6). Les extrémités N et C terminales sont localisées au niveau intracellulaire. La sous-unité  $\alpha$



des canaux potassium n'est composée que d'un seul ensemble de 6 segments transmembranaires (Figure 4).



**Figure 4 : Structure des différents canaux ioniques voltage dépendant (d'après Catterall et al. 2000)**

**A)** Les segments transmembranaires rouges (S5 et S6) sont responsables de la formation du pore ionique ; les segments verts (S4) sont les détecteurs de potentiel ; S1, S2 et S3 sont désignés par les segments bleus.

**B)** Sous-unités auxiliaires des canaux ioniques voltage dépendant. Les sous-unités auxiliaires intracellulaires sont illustrées sous leur forme tridimensionnelle.

Pour l'ensemble des canaux la sous-unité  $\alpha$  délimite le pore aqueux par lequel les ions traversent la membrane et contiennent des éléments qui déterminent leur sensibilité au potentiel (détecteur de potentiel).



---

Nomenclature des canaux ioniques :

$X_y1.1a$

avec

- X : la nature de l'ion
- y : le principal régulateur physiologique
- le premier chiffre : la famille du gène
- le deuxième chiffre : l'isoforme
- la lettre a : l'épissage

⇒ **Les canaux calciques voltage-dépendants (CCVDs)**

Ces canaux représentent une des voies majeures d'entrée d'ions calcium dans la cellule nerveuse et participent à l'excitabilité cellulaire ainsi qu'au processus moléculaire de la transmission synaptique. Ils sont exprimés dans divers tissus comme le cœur, les muscles lisses et l'ensemble du système nerveux. Sur la base de propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques, la famille des CCVDs est subdivisée en six types (Tableau 2).

Type	Nom	Activation	Cinétique de Désactivation	Pharmacologie	Sous-unités $\alpha$	Nom	Localisation du canal cité
L	Longue durée	-40 mV	Lente (300 à 600 ms)	Dihydropyridines Phénylalkylamines Benzothiazépines	S	Cav.1.1	Muscles squelettiques
					C	Cav.1.2	Muscle cardiaque, muscles lisses, cellules endocrines, neurones
					D	Cav.1.3	Muscle cardiaque, cellules endocrines, neurones
					F	Cav.1.4	Rétine
N	Neuronal	> -30 mV	Intermédiaire	$\omega$ -Conotoxine GVIA $\omega$ -Conotoxine MVIIIA $\omega$ -Agatoxine IIIA	B	Cav.2.2	Neurones
P/Q	Purkinje Q après P	-45 mV	P : lente Q : rapide	$\omega$ -Agatoxine IIIA $\omega$ -Agatoxine IVA $\omega$ -Conotoxine MVIIIC	A	Cav.2.1	Neurones, cellules pancréatiques $\beta$
					E	Cav.2.3	Neurones, cellules endocrines
R	Résistant	> -40 mV	Très rapide	Nickel Cadmium	G	Cav.3.1	Neurones, cœur, foie, muscles lisses, cellules endocrines spermatozoïdes
					H	Cav.3.2	
					I	Cav.3.3	
T	Transitoire	> -70 mV	Rapide (20 à 60 ms)	Benzimidazoles Amiloride Nickel Kurtoxine Ethosuximide			
Bas seuil d'activation (BSA)							

**Tableau 2 : Propriétés des différents types de CCVDs.**

Les agents pharmacologiques qui ont permis d'étudier et d'identifier les différents types de CCVDs sont des toxines, des métaux ainsi que des médicaments.

Les conotoxines et agatoxines sont des toxines issues respectivement des venins de cônes marins et d'araignées.

---

Les canaux de type L pour « Long lasting » en anglais sont caractérisés par leur cinétique d'ouverture et de fermeture assez lente. Ils sont activés par une forte dépolarisation membranaire et sont qualifiés de canaux à « haut seuil d'activation ». Ces canaux sont sensibles aux dihydropyridines, aux phénylalkylamines et aux benzothiazépines, traitements indiqués lors de troubles cardiaques tels que l'angine de poitrine, l'hypertension artérielle et les crises de tachycardie. Au moment de la dépolarisation membranaire, le canal passe d'un état inactivé à un état activé et le calcium extracellulaire peut ainsi entrer dans la cellule.

Les canaux de type N, exprimés principalement dans les neurones, sont également activés par une forte dépolarisation mais se désactivent plus rapidement. Leur résistance aux dihydropyridine ainsi que leur sensibilité à certaines  $\omega$ -conotoxines (GVIA et MVIIA) les distinguent des canaux de type L.

Les canaux de type P (caractéristiques des neurones de Purkinje du cervelet) font partis du groupe des canaux à « haut seuil d'activation » et se désactivent très lentement (à l'échelle de la seconde).

Les canaux de type Q, situés à proximité des canaux de type P dans les cellules granulaires, sont activés par une forte dépolarisation et leur cinétique d'inactivation est modérée. Ils sont sensibles à la  $\omega$ -Conotoxine MVIIC et à la  $\omega$ -Agatoxine IVA lorsque cette dernière est présente dans des concentrations de l'ordre du micromolaire.

Derniers représentants des canaux à « haut seuil d'activation », les canaux de type R qui ont la particularité d'être résistants à la plupart des produits pharmaceutiques et toxines connus.

Les canaux calciques de type T possèdent des courants entrant transitoires et sont activés par une faible dépolarisation membranaire proche du potentiel de repos ( $\approx -80$  mV). Leur cinétique de désactivation est rapide et leur réactivation nécessite une forte hyperpolarisation.

### ⇒ Les canaux sodiques voltage-dépendant (CSVDs)

Ils sont présents sur l'ensemble des cellules excitables et sont responsables de la génération du potentiel d'action et de sa propagation dans ces cellules. En effet, perméables aux ions sodium de manière sélective, ces canaux génèrent un courant sodique qui dépolarise la membrane et permet de propager l'influx nerveux. Ces canaux ont la particularité de s'activer très rapidement (1-5 msec) et de s'inactiver rapidement après ouverture (3-10 msec).

Le canal sodium voltage-dépendant est une protéine transmembranaire comportant une sous-unité  $\alpha$  et deux sous-unités auxiliaires  $\beta 1$  et  $\beta 2$ . La sous-unité  $\alpha$  comprend quatre domaines homologues (I à IV) comportant chacun six segments transmembranaires (S1 à S6) reliés entre eux par des boucles intra et extra cellulaires (Figure 5).

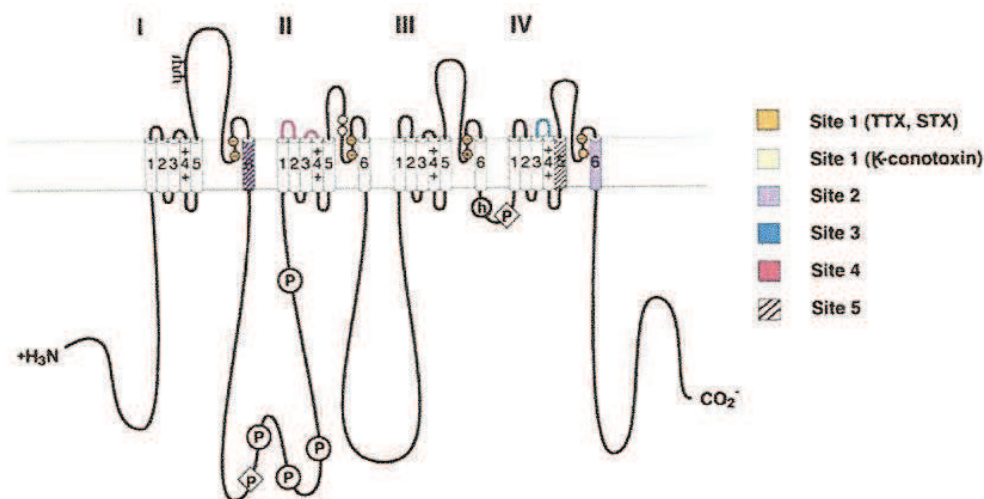


Figure 5 : Localisation des sites récepteurs aux neurotoxines sur la sous-unité  $\alpha$  du canal sodium (Cestèle et Catterall, 2000).

Six sites d'interaction avec des neurotoxines ont été caractérisés sur ce canal.

Le site 1 est le site de fixation de la tétrodotoxine (toxine isolée de poisson tétrodon mais aussi de mollusques et pieuvres, TTX), de la saxitoxine (toxine de dinoflagellés marins, STX) et les  $\square$ -conotoxines (toxines extraites de cônes marins). La fixation de ces toxines bloque directement la conduction des ions sodium en provoquant l'obturation du pore du canal.

L'interaction avec les autres sites récepteurs altère la dépendance au potentiel du canal soit en bloquant l'inactivation des courants sodium soit en provoquant un déplacement de l'activation de ces courants vers des potentiels de membrane plus bas.

Le site 3 du canal CSVD est la boucle extracellulaire qui connecte les segments transmembranaires S3 et S4 du domaine IV de la sous-unité  $\alpha$  du canal. Les segments S4 sont les détecteurs de potentiel du canal et contiennent des charges positives qui se déplacent quand la membrane est dépolarisée. Les mouvements des segments S4 vers l'extérieur provoquent un changement de conformation du canal nécessaire à son inactivation rapide.

Le site 4 correspond lui aussi à une boucle extracellulaire qui relie les segments transmembranaires S1 à S2 et S3 à S4 du domaine II de la sous unité  $\alpha$ .

La nomenclature des CSVDs est en fonction des dix différentes sous-unités  $\alpha$  exprimées. La majorité des CSVDs sont bloqués par de faibles concentrations, de l'ordre du nanomolaire, en TTX et en STX. Il existe cependant des CSVDs résistants à la TTX comme ceux présents dans le muscle cardiaque, les Na1.4 et dans les neurones afférents des ganglions périphériques, les NaN. Les différents canaux ioniques au sodium voltage-dépendants peuvent être donc classés en deux catégories : les sensibles et les résistants à la TTX (TTX-S et TTX-R).

### ⇒ Les canaux potassiques voltage-dépendants

Ils font partis de la plus grande famille des canaux ioniques. Les canaux potassiques sont responsables de l'hyperpolarisation du potentiel membranaire ce qui a pour conséquence de diminuer la propagation de l'influx nerveux. Ils participent donc à l'établissement du potentiel de repos ainsi qu'aux phases de repolarisation. Contrairement aux canaux sodiques, ils répondent plus lentement aux changements de potentiel.

Les canaux potassiques dépendants du potentiel  $K_v$  et les canaux sensibles à la concentration intracellulaire de calcium ( $K_{Ca}$ ) sont un assemblage de quatre sous-unités  $\alpha$  constituées chacune de six segments transmembranaires.

Chez les mammifères, les canaux  $K_v$  se subdivisent en quatre familles  $K_v1$ ,  $K_v2$ ,  $K_v3$  et  $K_v4$  basées sur leurs similitudes avec les canaux exprimés chez la drosophile : *Shaker*, *Shab*, *Shaw* et *Shal*. Les canaux *Shaker* et *Shal* génèrent des courants transitoires alors que les canaux *Shaw* et *Shab* génèrent des courants à rectification retardée. Les courants potassiques transitoires sont des courants présentant des cinétiques d'activation et d'inactivation très rapides. Ils jouent le rôle de filtre des signaux excitateurs en retardant l'apparition du potentiel d'action et donc en diminuant leur

fréquence. Les courants potassiques à rectification retardée sont des courants qui se développent progressivement à la suite du courant sodique lors du déclenchement du potentiel d'action. Avec une cinétique d'inactivation lente, ils participent à la phase de repolarisation et contribuent à la période réfractaire entre deux potentiels d'action.

Les canaux potassiques calcium-dépendants sont classés en trois sous-familles en fonction de leur conductance unitaire (facilité avec laquelle les ions traversent le pore aqueux du canal) : les canaux  $B_k$  (Big conductance), les canaux  $I_k$  (Intermediate conductance) et les  $S_k$  (Small conductance). Contrairement aux  $B_k$ , les canaux  $I_k$  et  $S_k$  ne dépendent pas du potentiel mais uniquement d'une augmentation intracellulaire de calcium. Leur sensibilité au calcium leur est conférée par la fixation de la calmoduline.

### 2.1.2 Exemple de neurotoxines

⇒ **Toxines des canaux calciques voltage-dépendants (CCVDs)**

#### Chez les araignées


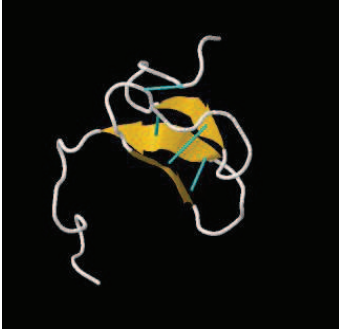
Les oméga-agatoxines ( $\omega$ -agatoxines) sont les premières toxines d'araignées ciblées contre les CCVDs qui ont été isolées du venin de l'araignée *Agelenopsis aperta*. Ce sont des polypeptides de 30 à 112 acides aminés ayant une action spécifique pour les différents types de CCVDs. Les  $\omega$ -agatoxines de type I, II et IV sont respectivement spécifiques des canaux calciques de type L, N et P (Beleboni et *al.*, 2004).

L' $\omega$ -agatoxine-Aa1a ( $\omega$ -Aga-IA) agit aussi bien sur les canaux calciques des invertébrés que des vertébrés. Cette toxine s'organise en hétérodimère : trois acides aminés (S-P-C) sont ancrés à la chaîne principale de 66 résidus par l'intermédiaire d'un pont disulfure.

Les  $\omega$ -agatoxines de type II ont peu d'homologie de séquence avec celles de type I mais bloquent elles aussi la transmission neuromusculaire chez les insectes.

Les  $\omega$ -agatoxines de type III partagent une homologie de séquence avec les agatoxines de type II et contiennent de nombreux résidus cystéines : 12 au total. L' $\omega$ -AGTX-Aa3a possède une forte affinité aussi bien pour les canaux calciques de type L que ceux de type N. Il y a une dizaine d'années, une étude a démontré que cette toxine interagissait en réalité avec tous les types des canaux CCVDs par l'intermédiaire d'un site commun localisé au niveau du vestibule externe de ces canaux (Yan et Adams, 2000).

La  $\omega$ -AGTX-Aa4a fait partie du dernier groupe des  $\omega$ -agatoxines de type IV, elle est inactive chez les insectes et les espèces aviaires mais se révèle être un inhibiteur des canaux calciques de type P/Q chez les mammifères. Cette toxine a permis de comprendre le rôle de ces canaux dans la libération de neurotransmetteurs. En effet, elle inhibe le mécanisme calcium dépendant nécessaire à la libération de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) au niveau des synapses des neurones du cerveau de rat. En agissant sur les canaux calciques de type P, la  $\omega$ -AGTX-Aa4a provoque une rétention du GABA, du glutamate, de la dopamine, de la sérotonine et de l'acétylcholine dans les synapses (Rash et Hodgson, 2002).

Araignée		Toxine		Structure 3D
<i>Agelenopsis aperta</i>		$\omega$ -Agatoxine-Aa4a	$\omega$ -AGTX-Aa4a	

**Tableau 3 : Structure de l'omega-agatoxine 4a, neurotoxine de l'araignée du genre *Agelenopsis* ciblant les CCDVs.**

La structure 3D est accessible sur le site <http://www.rcsb.org> avec le code PDB : 1IVA ( $\omega$ -AGTX-Aa4a). Cette toxine est architecturée autour du motif ICK (Inhibitor Cystine Knot). Ce motif est composé d'un feuillet  $\beta$  à deux ou trois brins antiparallèles stabilisés par des ponts disulfure internes formant un « nœud » de cystines « Cystine knot » (Norton et Pallaghy, 1998). La chaîne principale en acides aminés est représentée en blanc, les brins  $\beta$  antiparallèles sont illustrés en jaune et les ponts disulfure en cyan.

### ⇒ Toxines des canaux sodiques voltage-dépendants (CSVDs)

#### Chez les araignées

La nomenclature des toxines spécifiques aux canaux sodium est en fonction de leur action sur ces derniers (King *et al*, 2008):



- les toxines  $\beta$  induisent un déplacement de l'activation du courant sodium vers des potentiels de membrane plus négatifs.
- les toxines  $\delta$  ralentissent la phase d'inactivation du courant sodium et empêchent ainsi la fermeture du canal.

- les toxines  $\mu$  inhibent les CSVDs.

Les mygales d'Australie du genre *Hadronyche* et *Atrax* sont réputées pour leur agressivité et la haute neurotoxicité que provoque leur venin lors d'envenimation par morsures chez l'Homme.

Parmi les toxines de ces venins, on distingue la  $\delta$ -hexatoxine Ar1 d'*Atrax robustus* et la  $\delta$ -hexatoxine Hv1 d'*Hadronyche versutus*. Ces toxines sont des peptides constitués de 42 acides aminés réticulés par quatre ponts disulfure. Avec une homologie de 83,3%, leurs séquences sont très proche l'une de l'autre.

Ces toxines se révèlent être des compétitrices des toxines  $\alpha$  de scorpions au niveau du site 3 des canaux sodiques TTX-S des neurones cérébraux de rat et des neurones d'insectes. En se fixant sur ce site, elles retardent le mécanisme d'inactivation du canal en forçant ce dernier à maintenir une conformation de canal activé (Nicholson, 2006).

Araignée		Toxine		Structure 3D
<i>Hadronyche versutus</i>		$\delta$ -Hexatoxine-Hv1	$\delta$ -HXTX-Hv1	

**Tableau 4 : Structure de la delta-hexatoxine, neurotoxine de la mygale du genre *Hadronyche* ciblant les CSVDs.**

Code PDB : 1VTX ( $\delta$ -HXTX-Hv1). La chaîne principale en acides aminés est représentée en blanc, les brins  $\beta$  antiparallèles sont illustrés en jaune, l'hélice  $\alpha$  en violet et les ponts disulfure en cyan.

### Chez les scorpions

Les neurotoxines de scorpions sont classées en deux familles : les toxines  $\alpha$  et les toxines  $\beta$ .

#### **Toxines $\alpha$**

Ces toxines modulent l'activité des canaux sodiques voltage-dépendants en se fixant sur le site 3 des canaux CSVDs. La fixation des toxines  $\alpha$  sur le site 3 aboutit à un ralentissement voire un blocage du processus d'inactivation du canal CSVD. La fixation de ces neurotoxines reste cependant dépendante du voltage et corrélée avec le potentiel d'activation du canal.



Cette famille de toxines est subdivisée en trois classes :

- les toxines  $\alpha$  classiques
- les toxines dites «  $\alpha$ -like »
- les toxines  $\alpha$  anti-insectes

La première classe est constituée de toxines hautement toxiques pour les mammifères. Les toxines AaH II ( $\delta$ -buthitoxine-Aah2) et Lqh II ( $\delta$ -buthitoxine-Lqh2) ont été isolées du venin des scorpions, respectivement *Androctonus australis* et *Leiurus quinquestriatus hebraeus*.

Les toxines  $\alpha$  anti-insectes les plus connues sont Lqh $\alpha$ -IT et Lqq III. Lqh $\alpha$ -IT est composée de 64 acides aminés et extraite du venin du scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. Elle est très active sur les neurones de cafards et de sauterelles et ne déplace pas la toxine  $\alpha$  AaH II de son site de fixation sur les synaptosomes de rats. Purifiée à partir du venin du scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*, Lqq III possède également une très haute affinité pour les canaux sodium de neurone de cafards.

Les toxines «  $\alpha$ -like » agissent aussi bien sur les mammifères que sur les insectes. Ces toxines ont une forte homologie de séquence avec les toxines de la classe  $\alpha$ . Malgré une toxicité démontrée par injection intracérébroventriculaire chez la souris, ces toxines sont moins actives sur les canaux sodium de mammifères et n'entrent pas en compétition avec la toxine radiomarquée  $^{125}\text{I}$ -AaH II. Ces toxines partagent les mêmes sites de fixation que les toxines  $\alpha$  spécifiques aux insectes mais présentent une toxicité plus modérée que ces dernières (Bosmans *et al.*, 2006).

### **Toxines $\beta$**

Les toxines  $\beta$  affectent le processus d'activation des CSVDs en se fixant sur leur site 4. L'activation des canaux sodiques est affectée par les toxines  $\beta$  après avoir subi une forte impulsion dépolarisante indiquant que la fixation de ces neurotoxines nécessite l'activation du canal pour pouvoir accéder au site 4. Au moment de la dépolarisation membranaire, le segment S4 du domaine II se déplace vers l'extérieur offrant ainsi à la neurotoxine un libre accès à l'extrémité de la boucle extracellulaire du site 4. Une fois fixée, la toxine  $\beta$  « fige » le segment transmembranaire dans sa position activée et va induire à la fois un déplacement de la courbe d'activation du canal vers des valeurs plus

négatives et favoriser son activation pour les futures dépolarisations (Rodriguez *et al.*, 2005 ; Gurevitz *et al.*, 2007)

Les toxines  $\beta$  sont également classées selon leur affinité pour les canaux sodiques voltage-dépendants des mammifères et insectes mais aussi par rapport aux effets que ces toxines induisent sur l'organisme cible. Ces toxines sont classées en quatre groupes :

1) Les toxines  $\beta$  anti-mammifères comme la Cn2 et la CSS4, toxines des scorpions *Centruroides noxius* et *Centruroides suffusus suffusus*, sont hautement toxiques pour les mammifères.

2) Les toxines  $\beta$  anti-insectes excitatrices comme la Bj-xtrIT, toxine issue du venin de *Bothotus judaicus* sont des toxines de 70 à 76 acides aminés qui induisent chez l'insecte une paralysie spastique.

3) Les toxines  $\beta$  anti-insectes relaxantes ont la particularité d'induire une paralysie flasque progressive. Elles induisent une dépolarisation graduelle de la membrane aboutissant à un blocage total des potentiels d'action.

4) Les toxines  $\beta$  actives chez les mammifères et chez les insectes. Ces toxines entrent en compétition avec les toxines excitatrices et relaxante au niveau de leur site de fixation sur les canaux sodiques.

#### Chez les guêpes solitaires

Les pompilidotoxines (PMTx)  $\alpha$  et  $\beta$  sont de petits peptides de 13 acides aminés purifiés des venins des guêpes *Anoplius samariensis* ( $\alpha$ -PMTx) et *Batozonellus maculifrons* ( $\beta$ -PMTx). A des concentrations de l'ordre du micromolaire, l' $\alpha$ -PMTx est capable de retarder le processus d'inactivation de canaux sodiques TTX-S présents sur les neurones trigéminaux de rat (Sahara *et al.*, 2000). La  $\beta$ -PMTx, qui diffère d'un seul acide aminé Arg<sub>12</sub> par rapport à l' $\alpha$ -PMTx, s'avère être cinq fois plus efficace que cette dernière dans l'inhibition des canaux sodiques des jonctions neuromusculaires des pattes de homard (Konno *et al.*, 1997). La  $\beta$ -PMTx se fixe préférentiellement sur les canaux Nav1.2 au niveau de la boucle extracellulaire connectant les segments transmembranaires S3 et S4 du domaine IV du canal (Kinoshita *et al.*, 2001).

---

## ⇒ **Toxines des canaux potassiques**

### Chez les araignées

Les toxines de venin d'araignées ont participé à la caractérisation structurale et pharmacologique de deux sous-familles de canaux potassium voltage dépendants :  $K_v2$  et  $K_v4$ .

Les sparatoxines du venin de *Heteropodia venatoria* sont des peptides de 29 à 32 acides aminés qui prolongent la durée du potentiel d'action des myocytes ventriculaires de rat. Cette action résulte du blocage des canaux  $K_v4.2$ . Le mode d'action du blocage de ces canaux par ces toxines est similaire à celui de la toxine  $\square$ -TRTX-Hhn1b qui consiste au blocage préférentiel du canal fermé et dépendant du voltage.

La  $\kappa$ -theraphotoxine-Hm1a (HmTx1), la  $\kappa$ -theraphotoxine-Hm2a (HmTx2) issues du venin de la tarentule africaine *Heteroscodra maculata* se fixent au détecteur de potentiels des sous-unités  $\alpha$  des canaux potassium. La  $\kappa$ -TRTX-Hm1a inhibe 25% des courants potassium des canaux  $K_v2.1$  et  $K_v2.2$  à une concentration égale à 100 nM alors que la  $\kappa$ -TRTX-Hm2a a peu d'effet sur les courants des canaux  $K_v2.2$ . L'action de la  $\kappa$ -TRTX-Hm1a est plus modérée sur les canaux  $K_v4$  puisque sa concentration qui amène à 50% d'inhibition n'est que de 280 nM. L'injection de cette toxine par voie intracérébroventriculaire chez la souris, ne provoque pas de neurotoxicité.

### Chez les scorpions

Contrairement aux autres neurotoxines, les toxines de scorpions se liant aux canaux potassiques sont constituées en moyenne de 40 acides aminés. La plus courte est la toxine Tc1, peptide de 23 acides aminés isolé du venin de *Tityus cambridgei* (Rodriguez *et al.*, 2004).

La charybdotoxine, issue du venin du scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* inhibe le flux d'ions potassium au travers des canaux dépendants du potentiel de type *Shaker*  $K_v1.2$  et  $K_v1.3$ .

### Chez les abeilles

L'apamine est un peptide basique de 18 acides aminés réticulé par deux ponts disulfure. Cette neurotoxine est un bloqueur spécifique des canaux potassium calcium-dépendants : les SK. Ces derniers sont responsables du contrôle du stockage d'informations. Des chercheurs ont récemment décrit le mécanisme d'action de l'apamine sur ces canaux (Lamy *et al.*, 2010). L'apamine agirait à distance sur ces canaux

par un mécanisme « allostérique ». En effet, contrairement aux molécules capables de boucher physiquement le pore, l'apamine se fixe à une certaine distance de la bouche externe de celui-ci, entraînant une perturbation structurale et conduisant *in fine* au blocage du transport des ions K<sup>+</sup>.

---

## 2.2 Les amines biogènes

---

### 2.2.1 Chez les araignées

Autres composés présents dans le venin d'araignées : les amines biogènes. On classe parmi les amines biogènes les catécholamines (adrénaline, noradrénaline et dopamine), la 5-hydroxytryptamine (sérotonine), l'histamine, la tyramine et l'octopamine. De nombreuses amines biogènes tiennent le rôle de neurotransmetteurs au sein du système nerveux des insectes. De la sérotonine a été détectée dans le venin d'individus mâles chez les espèces *Latrodectus tredecimguttatus* et *Atrax robustus* alors que le venin des femelles contenait seulement des traces de 5-méthoxytryptamine. Duffield et ses collaborateurs ont détectés aussi bien chez les femelles que chez les mâles de l'espèce *A. robustus* de la tyramine et de l'octopamine dans leur venin. De l'histamine a été également détectée dans le venin de *Phoneutria nigriventer* et *Cupiennus salei*. La sérotonine et l'histamine sont connues pour être des substances algésiogènes qui sont le point de départ de la transmission de la sensation de douleur.

### 2.2.2 Chez les hyménoptères

Le venin des *Vespidae* contient des amines biogènes dont le principal est l'histamine. La dopamine et l'acétylcholine sont également présentes et se retrouvent en plus grande quantité dans le venin de frelon.

---

## 2.3 Les enzymes

---

### 2.3.1 Chez les araignées

De nombreuses enzymes composent le venin d'araignée comme les hyaluronidases que l'on retrouve aussi bien chez les mygalomorphes que chez les araneomorphes. Les hyaluronidases hydrolysent les acides hyaluroniques, composants majeurs des liaisons intercellulaires, augmentent la perméabilité des tissus et par conséquent favorisent la diffusion des substances toxiques de venin dans le sang.

L'enzyme hyaluronidase fait partie des composés majeurs du venin de la tarentule *Dugesiella hentzi* et l'activité de cette enzyme dans le venin a été observée chez d'autres espèces telles que les *Loxocoles*, chez *Cupiennius salei* ainsi que chez *Atrax robustus*.

Le venin de cette dernière contient également des phosphodiesterases, enzymes catabolisant les nucléotides cycliques libres.

Si le venin de l'araignée brune *Loxocoles reclusa* ne présente aucune action propre aux phosphodiesterases et collagénases, il possède néanmoins la capacité d'hydrolyser l'ATP de nucléotides, cette faculté suggère la présence d'estérases. Norment et ses collaborateurs ont démontré l'activité phosphatase alcaline et estérases de ce venin.

Des études sur le venin des *Loxocoles*, révèlent la présence de toxines dermonécrosantes capables d'hydrolyser une large gamme de lipides tels que les sphingophospholipides et glycérophospholipides. Une étude menée sur trois toxines dermonécrosantes recombinées du venin de l'araignée brune, *Loxocoles intermedia*, a démontré que deux de ces toxines, LiRecDT1 et LiRecDT2, induisaient des oedèmes sous-cutanés importants au niveau des pattes de souris, à faibles doses et 10 à 20 min après injection. Elles sont également capables d'entraîner la mort de ces rongeurs 24 h après injection intra-péritonéale de 50 µg de produit (Ribeiro *et al.*, 2007).

### 2.3.2 Chez les abeilles

Dans le venin, la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) et une enzyme de type hyaluronidase, ont une forte activité protéolytique. La PLA<sub>2</sub> est l'enzyme la plus importante du venin puisqu'elle représente entre 12 et 15% du poids sec de ce dernier. C'est une petite glycoprotéine de 134 résidus présentant un pôle hydrophobe et hydrophile et qui possède un site de fixation au calcium. Cette enzyme ainsi que ses produits d'hydrolyse, les lysophosphoglycérides comme la lysolécithine, sont très actifs sur les membranes biologiques. A partir des phospholipides membranaires, la PLA<sub>2</sub> libère de l'acide arachidonique à partir duquel la 5-lipoxygénase et la cyclo-oxygénase de l'hôte vont générer des leucotriènes et prostaglandines, médiateurs de la réaction inflammatoire. La PLA<sub>2</sub> est également l'allergène le plus important du venin d'abeille. L'hyaluronidase présente également dans le venin d'araignée tient son rôle de facteur de diffusion du venin dans les espaces intracellulaires. Une phosphomonoestérase acide et une α-D-glucosidase sont également présentes à faible concentration dans ce venin.

### **2.3.3 Chez les Vespides : guêpes et frelons**

L'antigène 5 est considéré comme l'allergène majeur du venin des *Vespidae*. C'est une protéine de masse moléculaire de 23 kDa.

Les enzymes de ces venins sont la phospholipase A1 (Ves v 1-Pol a 1), la hyaluronidase (Ves v 2-Pol a 2), ainsi qu'une phosphatase acide.

Le venin d'arthropodes renferme également de nombreux peptides antimicrobiens.

## Chapitre 2 : Les peptides antimicrobiens

Les organismes vivants sont confrontés quotidiennement aux infections microbiennes et pathogènes. Leur survie dépend des mécanismes de l'immunité. Lors d'une infection, les mécanismes de la réponse immunitaire innée sont les premiers à s'enclencher, suivis par l'activation spécifique des cellules T et B, éléments de la réponse immunitaire acquise chez les vertébrés.

Les peptides antimicrobiens (PAMs) sont des peptides endogènes, éléments clefs de la défense immunitaire innée des organismes multicellulaires animaux et végétaux.

### 1 Historique

L'activité antimicrobienne de sécrétions, du sang, de leucocytes et des tissus lymphatique a été observée et reconnue vers les quinze dernières années du 19<sup>ème</sup> siècle (Skarnes et al., 1957). A partir des années 20, des substances isolées du mucus nasal, de sécrétions lacrymales, telles que le lysozyme et de sécrétions bronchiques ont montré une sélectivité contre les bactéries Gram+ et Gram-.

Le champ d'étude des peptides antimicrobiens se développe principalement dans les années 70 avec des études menées sur la peau des amphibiens et les plantes. En effet, au cours de ses recherches, Espamer découvre que le mucus recouvrant la peau des amphibiens, renferme une multitude de peptides possédant des propriétés biologiques variées : antibactérienne, antivirales et antifongiques (Espamer et al., 1970).

L'étude des peptides antimicrobiens est en plein essor dans les années 80 avec les travaux d'Hans Boman, Michael Zasloff et Robert Lehrer portés respectivement sur l'isolement et la purification des cécropines d'insectes, des magainines d'amphibiens et des défensines de mammifères (Hultmark et al., 1980 ; Selsted et al., 1985 ; Zasloff et al., 1987)

De nos jours, plus de 1960 peptides antimicrobiens ont été identifiés et recensés dans les bases de données comme l'APD (Antimicrobial Peptide Database).

### 2 Les PAMs des invertébrés

Les peptides antimicrobiens des invertébrés sont produits dans le cadre d'une réponse systémique inductible. Lors d'une agression microbienne, ils sont synthétisés par le

corps gras, équivalent fonctionnel du foie et du tissu adipeux, puis sécrétés dans l'hémolymphe, équivalent du sang, chez l'insecte (Figure 6).

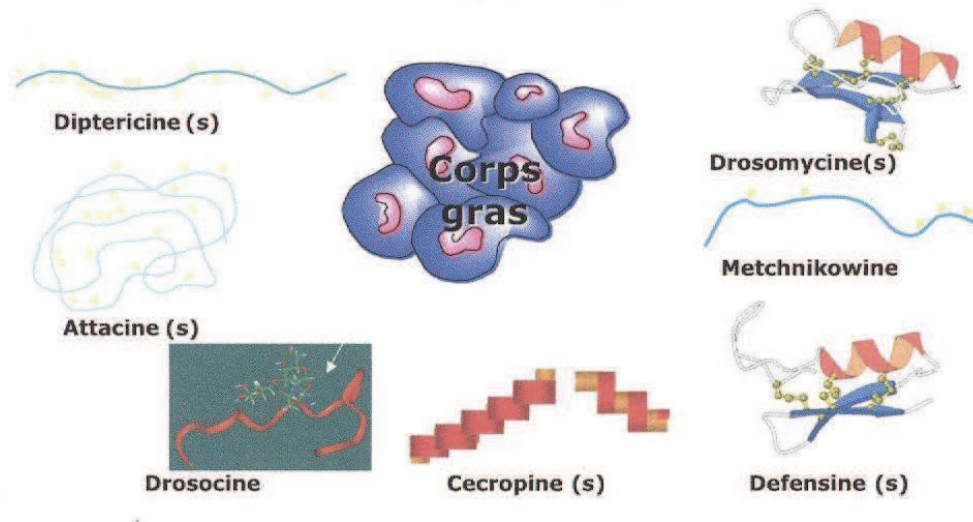


Figure 6 : Principaux peptides antimicrobiens cationiques produits par le corps gras et sécrétés dans l'hémolymphe par *Drosophila melanogaster* en réponse à une agression microbienne. D'après E. Andrés, J.-L. Dimarcq / *Médecine et maladies infectieuses* 37 (2007) 194-199.

## 2.1 Structure

Les peptides antimicrobiens contiennent, en moyenne, 20 à 50 acides aminés, présentent un caractère cationique et des propriétés amphiphiles. On distingue trois grandes familles de peptides antimicrobiens :

1. les peptides linéaires formant une hélice  $\alpha$ .
2. les peptides riches en cystéine présentant un ou plusieurs ponts disulfures.
3. les peptides linéaires basiques, dépourvus de cystéine et riche en un acide aminé particulier tel que la proline ou glycine.

### 2.1.1 PAMs linéaires

Les PAMs linéaires sont les peptides antimicrobiens les plus étudiés. De petite taille (inférieure à 40 résidus), ces peptides cationiques possèdent une majorité d'acides aminés hydrophobes (Tossi *et al.*, 2000). L'absence de résidu cystéine explique leur structure linéaire. Non structurés en milieu aqueux, ces peptides adoptent une structure secondaire de type hélice  $\alpha$  au contact de la membrane ou d'une structure mimant la membrane comme les liposomes (Brogden, 2005).

Parmi ces PAMs, on retrouve le groupe des ponéricines, molécules issues du venin de la fourmi *Pachycondyla goeldii* (Orivel *et al.*, 2001). La plupart des ponéricines sont riches



en tryptophane et leur extrémité C-terminale n'est pas amidée. Les cupiennines, peptides isolés du venin de l'araignée *Cupiennius salei*, font également partis des PAMs linéaires. Ils sont très basiques et composés de 35 acides aminés (Kuhn-Nentwig *et al.*, 2004). Ils possèdent une région N-terminale hydrophobe et une extrémité C-terminale constituée d'acides aminés polaires et chargés ainsi qu'un résidu d'acide glutamique amidé. Les cupiennines sont connus pour être de puissants antibactériens et pour avoir des propriétés hémolytique et insecticide (Tableau 5).

	Origine	Organisme	Nom	Activité	Structure primaire
Invertébrés	Arthropodes	Moustique <i>Anopheles gambiae</i>	Cecropin A	B,F,Y	GRLKKLGKKIEGAGKRVFKAEEKALPVVAGVKAL*
		Mouche <i>Stomoxys calcitrans</i>	Stomoxyn	B,F,Y,T	RGFRKHFNKLVKVKHTISETAHVAKDTAVIAGSGAAVVAAT*
		<b>Fourmis</b> <i>Pachycondylas goeldii</i>	<b>Ponericin G1</b>	<b>B,H,I</b>	<b>GWKDWAKKAGGWLKKKGPGMAKAALKAAMQ</b>
		Termite <i>Pseudacanthotermes spiniger</i>	Spinigerin	B,F,Y	HVDKKVADKVLKQLRIMRLTRL
		Araignée <i>Oxyopes kitabensis</i>	Oxyopinin 1	B,H,I	FRGLAKLLKIGLKS FARVLKVKL PKAAKAGKALAKSMADENAIRQQNQ
		Araignée <i>Cupiennius salei</i>	Cupiennin 1	B,H,I	GFGALFKFLAKKVAKTVAKQAAKQGAKYVVNKQME*

**Tableau 5 : Principales caractéristiques des PAMs à hélice  $\alpha$  des invertébrés.** Les activités des molécules sont notées : B, antibactérien; F, antifongique; H, hémolytique; I, insecticide; T, activité trypanolytique et Y, lyse sur les levures. \*, amidation de l'extrémité C-terminale. Tableau extrait de la revue de Bulet *et al.*, 2004 sur les peptides antimicrobiens.

### 2.1.2 PAMs riches en cystéines : motif feuillet $\beta$ stables

De nombreux PAMs contiennent des paires de cystéines qui, une fois oxydées, forment des ponts disulfures. Ces peptides adoptent, le plus souvent, une conformation dite en épingle à cheveux (Tableau 6).

	Origine	Organisme	Nom	Activité	Structure primaire
Invertébrés	Arthropodes	<b>2 ponts disulfure</b> Scorpion <i>Androctonus australis</i>	Androctonin	B,F	 RSVCRQIKICRRRGGCYKCTNRPY
		<b>3 ponts disulfure</b> Mouche <i>Phormia terranova</i>	Defensin-A	B	 ATCDLLSGTGINHSA CAAHCLLRGNRGGYCNKGVCVCRN
		<b>4 ponts disulfure</b> Mouche <i>Drosophila melanogaster</i>	Drosomycin	F	 DCLSGRYKGPCAVWDNETCRRVCKEEGRSSGHCSPSLKWCCEGC

**Tableau 6 : Caractéristiques des PAMs présentant plusieurs ponts disulfure chez les invertébrés.** Tableau extrait de la revue de Bulet, *et al.*, 2004 sur les peptides antimicrobiens.

L'androctonine est un peptide antibactérien fortement cationique de 25 acides aminés extrait de l'hémolymphe du scorpion *Androctonus australis*. Ce peptide est composé de deux brins antiparallèles formant une épingle à cheveux stabilisée par deux ponts

disulfures. L'androctonine possède un large spectre d'activité : elle affecte aussi bien les bactéries Gram + et Gram - que les champignons. Le rôle des ponts disulfures dans le maintien de la structure en épingle à cheveux est très important dans l'activité bactéricide de l'androctonine. En effet, Mandard et ses collaborateurs (2001) ont montré qu'en absence de ces ponts, le peptide linéaire devenait inactif sur des bactéries Gram - telles que *E. coli* dont la membrane externe contient des molécules de lipopolysaccharides (LPS). Cette structure en épingle à cheveux optimiserait donc l'interaction entre le peptide et ce type de membrane.

Autres peptides riches en ponts disulfures : les défensines des insectes et la drosomycine. La défensine A est un peptide qui comporte six cystéines engagées dans trois ponts disulfures intramoléculaires qui délimite trois domaines : une boucle amino-terminale, une hélice  $\alpha$  amphiphiles et un feuillet  $\beta$  au niveau de l'extrémité C-terminale.

### 2.1.3 Les PAMs riches en proline

Ce type de peptides est largement répandu chez l'ensemble des espèces d'insectes, de mammifères mais aussi d'amphibiens et même chez les mollusques. Leur caractéristique commune est leur haute teneur en résidus proline et arginine au sein de leur séquence peptidique ce qui leur confère un caractère cationique. Ils sont essentiellement actifs sur les bactéries Gram- et ne provoquent pas de lyse membranaire.

Origine	Organisme	Nom	Séquence	% Pro
Insectes	Abeille	Apideacine	GnnRPvyipqPRPPHPRI	33
		Abaecine	YVPLPNiPQPGRPFPTFPGQGPFNPKIRWPQGY	30
	Mouche	Drosocine	GKPRPYSPRPTSHPRPIRV	32
	Fourmi	Formaecine	GRPNPVNnKPTPhPRL	31

Tableau 7 : PAMs-RP d'insectes

Les résidus notés en majuscule sont les plus conservés entre espèces, ceux en minuscules les moins conservés.

Les résidus noté en rouge présentent une O-glycosylation. D'après Scocchi et al., 2011.

## 3 Mode d'action des PAMs

Les peptides antimicrobiens présentent divers mécanismes d'actions mais nous pouvons les classer en deux groupes:

1- Les PAMs perturbant la structure de la membrane cytoplasmique.

---

2- Les PAMs ayant une action sur des éléments intracellulaires entraînant un dysfonctionnement du micro-organisme.

Quelque soit le mécanisme d'action du peptide antimicrobien, celui-ci devra obligatoirement interagir avec l'enveloppe bactérienne pour pouvoir ensuite accéder à sa cible. Cette interaction peut se faire de manière non spécifique (interactions électrostatiques,...) ou s'effectuer par reconnaissance d'un constituant de l'enveloppe.

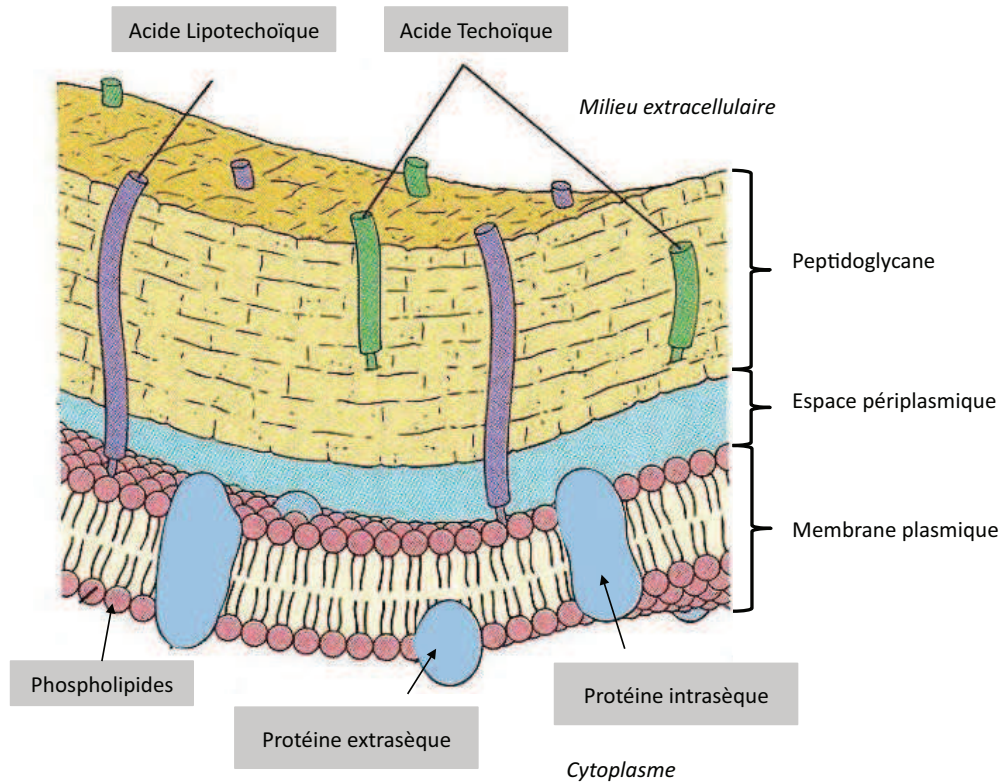
---

### **3.1 Interactions PAMs/Enveloppe bactérienne**

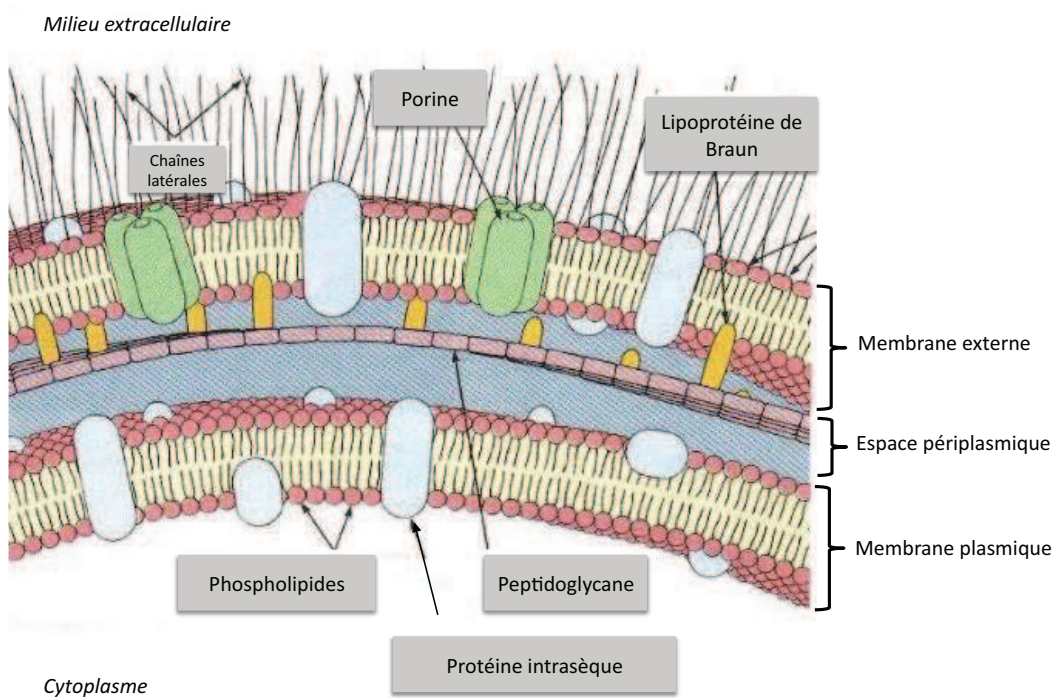
---

Les peptides antimicrobiens, molécules cationiques, vont être attirés par les charges négatives présentes à la surface des bactéries. Les interactions électrostatiques permettent d'orienter ces peptides vers la surface de l'enveloppe bactérienne. La prochaine étape consiste en la traversée des peptides au sein des constituants de l'enveloppe pour atteindre la membrane cytoplasmique. La structure de l'enveloppe bactérienne diffère selon le genre de bactérie : Gram+ ou Gram-. La structure de la paroi des bactéries Gram + est schématisée par la Figure 7.

Dans le cas des Gram-, l'enveloppe apparaît sous forme plus complexe. En effet, elle contient une fine couche de peptidoglycane (de 2 à 7 nm d'épaisseur) entourée d'une membrane externe épaisse de 7 à 8 nm et de la membrane cytoplasmique (Figure 8).



**Figure 7 : L'enveloppe des bactéries Gram positives.** Schéma tiré du livre *MICROBIOLOGIE* (Prescott, Harley et Klein, édition De Boeck Supérieur, 2003)



**Figure 8 : L'enveloppe des bactéries Gram négatives.** Schéma tiré du livre *MICROBIOLOGIE* (Prescott, Harley et Klein, édition De Boeck Supérieur, 2003)

---

## 3.2 Action sur la membrane cytoplasmique.

---

La membrane cytoplasmique est le support de fonctions vitales chez les bactéries. Ces fonctions assurent le maintien des gradients, la perméabilité sélective, l'énergie cellulaire conduite par le transport d'électrons ainsi que la synthèse et l'assemblage du peptidoglycane (Yeaman and Yount, 2003). Une perméabilisation de la membrane induite par des peptides antimicrobiens va perturber ces fonctions et par conséquent entraîner la mort du micro-organisme.

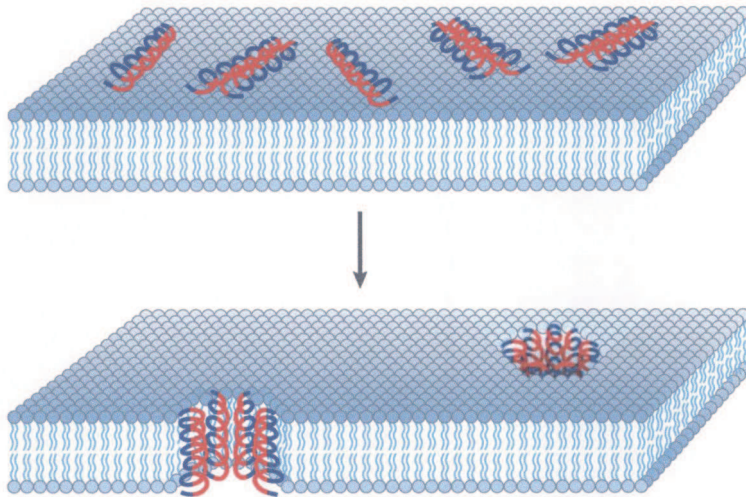
Le premier phénomène observé pour l'ensemble des peptides antimicrobiens est leur adsorption sur la membrane. L'attraction électrostatique est le facteur principal dans l'ancrage des peptides sur la membrane. Une fois fixés, les peptides s'accumulent en surface jusqu'à une concentration seuil permettant leur assemblage et leur multimérisation. Au contact de la membrane, ces peptides adoptent une structure secondaire de type hélice  $\alpha$  et feuillets  $\beta$  tout en orientant leurs charges positives et leurs différentes faces hydrophiles et hydrophobes en fonction des phospholipides (Matsuzaki *et al.*, 1997).

Les peptides antimicrobiens vont ensuite adopter différents modèles de perméabilisation de la membrane cytoplasmique. Quatre types de modèles ont été observés et expliqués dans la littérature.

### 3.2.1 Le modèle du pore en « tonneau » (barrel-stave model)

Ce modèle dit de tonneau est un modèle assez simple. Les peptides antimicrobiens présentant une structure en hélice alpha vont s'insérer sous forme d'amas dans la membrane. Les régions hydrophobes de ces peptides s'alignent avec les chaînes hydrocarbonées des phospholipides alors que les régions hydrophiles constituent l'intérieur du pore transmembranaire ainsi créé. Un recrutement de plusieurs peptides au niveau de la membrane induit une augmentation du diamètre du pore ce qui entraînera par la suite une fuite du contenu cytoplasmique et la mort de la bactérie.



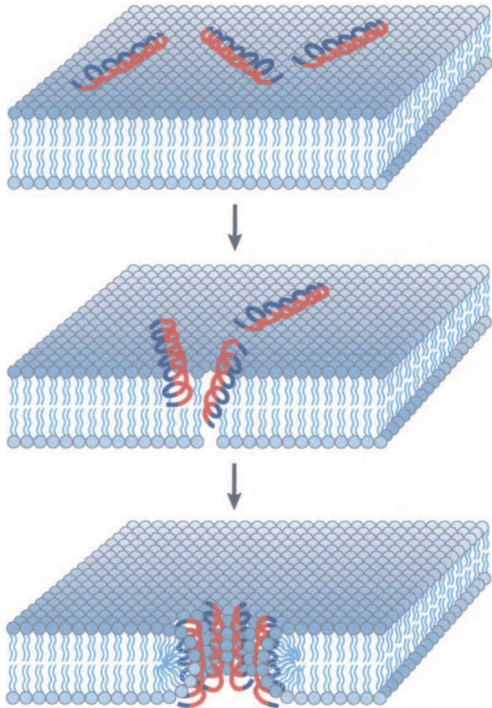


**Figure 9 : Modèle du pore en « tonneau » d'après Brogden 2005** Les régions hydrophiles des peptides sont représentées en rouge et les régions hydrophobes en bleu.

L'alaméthicine, un peptide isolé du champignon *Trichoderma viride*, génère ce type de pores, qui ne requièrent pas moins de 11 peptides placés comme les douves d'un tonneau (Leitgeb *et al*, 2007).

### 3.2.2 Le modèle du pore torique (Torroidal pore, wormhole model)

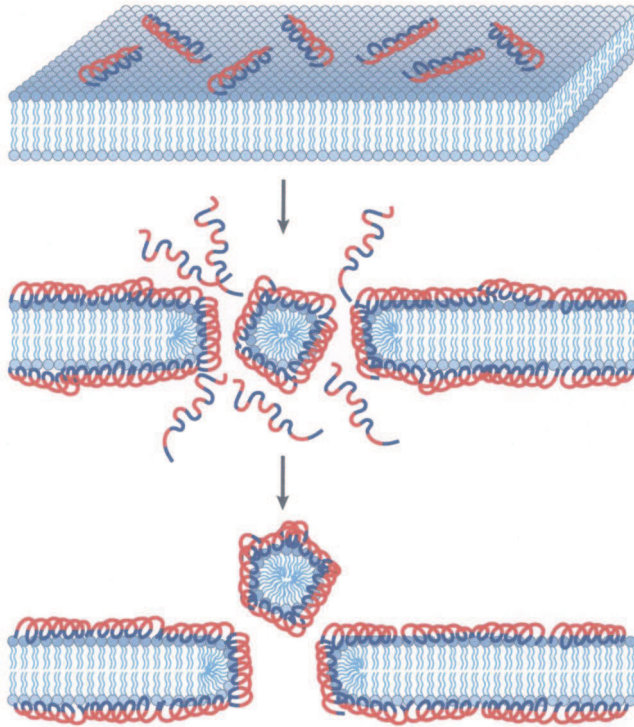
Ce modèle gagne en complexité par rapport au modèle énoncé précédemment. En effet, certains peptides ayant le même type de structure en hélice alpha vont s'insérer dans la membrane tout en induisant une courbure membranaire positive. De cette façon, leurs résidus polaires seront associés avec les têtes polaires des phospholipides. Les études effectuées sur le mode d'action de la magainine 2 ont révélées que les pores induits par ce peptide étaient de grande taille, jusqu'à 5 nm de diamètre interne et 8 nm de diamètre externe. Ce peptide entraîne également un basculement des phospholipides par diffusion latérale d'un feuillet de la membrane à l'autre (Matsuzaki *et al.*, 1998).



**Figure 10 : Modèle du pore torique d'après Brodgen 2005.** Les régions hydrophiles des peptides sont représentées en rouge et les régions hydrophobes en bleu.

### 3.2.3 Le modèle du tapis (carpet model)

Le mécanisme de ce modèle repose sur l'accumulation de peptides parallèles à la surface de la membrane, menant à la formation d'un tapis. Ce tapis de peptides s'insère entre les têtes hydrophiles des phospholipides provoquant une perturbation dans la fluidité de la membrane par la formation de micelles et de pores. La présence de lipides chargés négativement aide à la formation d'un tapis dense en réduisant les répulsions électrostatiques entre les peptides cationiques (Oren and Shai, 1998).



**Figure 11 : Modèle du tapis d'après Brogden 2005.** Les régions hydrophiles des peptides sont représentées en rouge et les régions hydrophobes en bleu.

### 3.2.4 Les peptides à effet détergent

En fonction de leur concentration, les peptides induiront des effets différents sur la membrane pouvant aller de la simple perturbation à la solubilisation complète de celle-ci. A faible concentration, les peptides peuvent induire trois effets distincts. Ces peptides s'agrègent sous forme de micelles qui en entrant en contact avec la membrane cytoplasmique, absorbent quelques lipides membranaires. Ce phénomène entraîne la formation de pores de petit diamètre. Les micelles peptidiques peuvent également s'insérer dans la membrane et créer un canal global micellaire. Dans le troisième cas, ces peptides peuvent simplement s'adsorber sur la membrane et la déstabiliser. En effet, la diffusion latérale des peptides « détergents » le long de la surface membranaire induit un changement transitoire de sa densité et induit un effondrement de sa résistance ohmique lors d'un rapprochement entre deux peptides (Brogden, 2005).

Lorsque que la concentration en peptides est plus importante, on assiste aux mécanismes évoqués pour les modèles de tapis et de pores toriques (Bechinger and Lohner, 2006).



### 3.3 Perturbation du fonctionnement cellulaire : cibles intracellulaires.

Une action ciblée essentiellement sur la membrane cytoplasmique ne suffit pas toujours pour tuer les microorganismes. Des interactions entre des peptides antimicrobiens et des éléments intracellulaires ont été mises en évidence (Tossi and Sandri, 2002). Il en résulte un désordre au niveau des voies métaboliques qui aboutit *in fine* à la mort cellulaire.

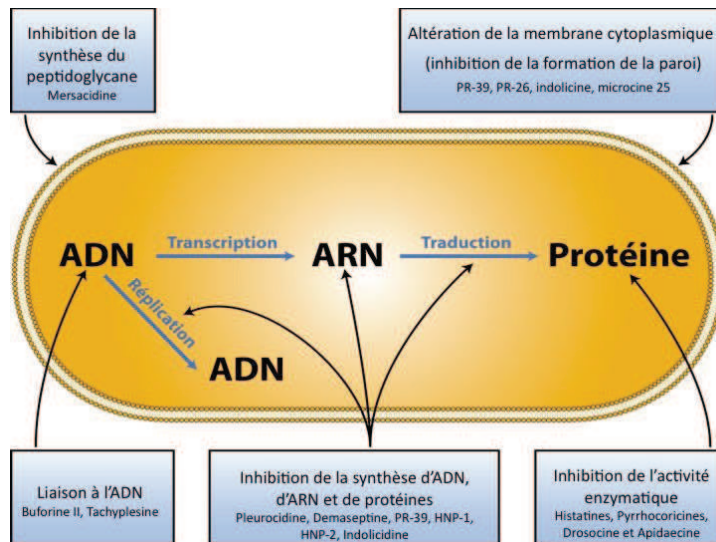


Figure 12 : Mode d'action des peptides antimicrobiens à action intracellulaire d'après Brogden 2005. Dans ce schéma, le microorganisme cible est une bactérie de type *E. coli*.

#### 3.3.1 Inhibition de la synthèse du peptidoglycane

Le peptidoglycane est une structure commune aux bactéries, dont l'épaisseur varie selon le type Gram- et Gram+ et qui forme un réseau autour de la membrane plasmique.

Cette structure est composée d'une partie glucidique (polysaccharide) et d'une partie peptidique. Le polysaccharide est un polymère de N-acétyl-glucosamine (NAG) et d'acide N-acétyl-muramique (NAM) reliés par des liaisons osidiques  $\beta$  1-4. La partie peptidique est un ensemble de chaînes latérales peptidiques identiques composées de 4 acides aminés et attachées à l'acide NAM. On retrouve comme acides aminés dans ces chaînes latérales, la L-alanine en position 1 (liée au NAM), le D-glutamate en position 2, l'acide diaminopimélique ou la lysine en position 3 et la D-alanine en position 4.

La synthèse du peptidoglycane se résume en trois étapes majeures :

- 1- Synthèse du précurseur UDP-acide-N-acétyl-muramique-pentapeptide au niveau du cytoplasme.
- 2- Translocation des précurseurs à travers la membrane cytoplasmique.

3- Polymérisation du peptidoglycane à partir de ces précurseurs lipidiques par transpeptidation et transglycosylation à l'extérieur de la membrane cytoplasmique.

### ⇒ Les peptides agissant sur la synthèse du peptidoglycane

Les glycopeptides font partis des molécules qui inhibent la synthèse du peptidoglycane des bactéries. L'action des glycopeptides réside dans la formation d'un complexe stable avec le mucopeptide D-ala/D-ala par établissement de liaisons hydrogènes. La vancomycine est le chef de file de la classe des antibiotiques glycopeptidiques et a longtemps été considéré comme l'antibiotique de derniers recours contre les infections causées par *S. aureus* (Boneca, 2003).

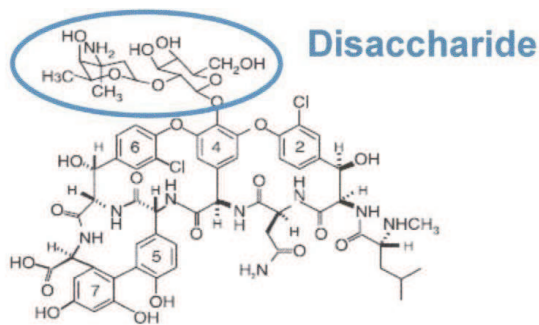


Figure 13 : Structure de la vancomycine.

La vancomycine (Figure 13) se fixe préférentiellement sur l'extrémité D-Ala-D-Ala des précurseurs au stade lipidique et inhibe ainsi la synthèse du peptidoglycane, entraînant inévitablement la mort cellulaire.

La mersacidine (Figure 15) est une bactériocine de type lantibiotique de classe II produite par *Bacillus sp.* Les lantibiotiques sont des peptides produits par de nombreuses bactéries Gram + comme les Streptocoques pour attaquer d'autres bactéries Gram +. Ces peptides sont généralement de petite taille, inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et comportent, dans leur séquence, des acides aminés souffrés peu communs tels que la lanthionine, la  $\beta$ -méthyllanthionine ainsi que la déhydrobutyryne et la déhydroalanine.

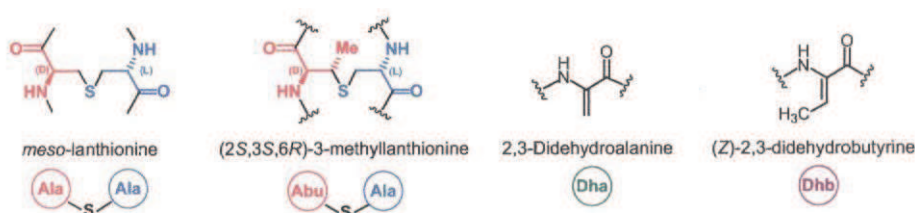


Figure 14: Acides aminés et modifications post-traductionnelles rencontrés chez les lantibiotiques. D'après Wiley et A Van Der Donk, 2007.

La mersacidine est caractérisée par 4 ponts thioéther intra-caténaire, formés par les résidus 3-méthyllanthionine (MeLan) et S-(2-aminovinyl)-3-méthylcystéine (Kruszewska et al, 2004).

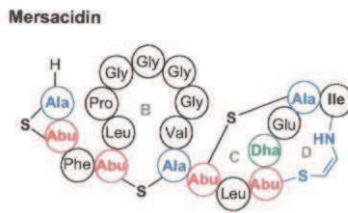


Figure 15 : Structure de la mersacidine.

Contrairement au PAMs classiques et autres lantibiotiques de classe I comme la nisine, la mersacidine n'induit pas de pores membranaires mais agit essentiellement sur la synthèse du peptidoglycane.

Ce peptide inhibe la synthèse du peptidoglycane au moment de l'étape de transglycosylation, en se liant à un précurseur du peptidoglycane, le lipide II (UDP-MurNac-pentapeptides-GlcNac) au niveau de la membrane cytoplasmique du microorganisme cible (Brötz *et al.*, 1997).

### 3.3.2 Cibles intracellulaires

Les apidaecines, peptides riches en proline, ne s'attaquent pas directement à la membrane des bactéries Gram -. Ces peptides s'adsorbent de manière non spécifique sur un des composants de la membrane externe puis entrent dans l'espace périplasmique. La traversée de la membrane interne s'effectue à l'aide d'un transporteur, type perméase. La liaison peptide-perméase semble spécifique et irréversible. Une fois, le peptide à l'intérieur du cytoplasme, il interagit avec un composant de la synthèse des protéines bactériennes et inhibe son activité. Otvos et ses collaborateurs ont observé que l'apidaecine, la pyrrococine et la drosocine se fixent de manière spécifique sur la protéine de choc thermique DnaK de 70 KDA (Figure 16) et de manière non spécifique sur la chaperonine GroEL.

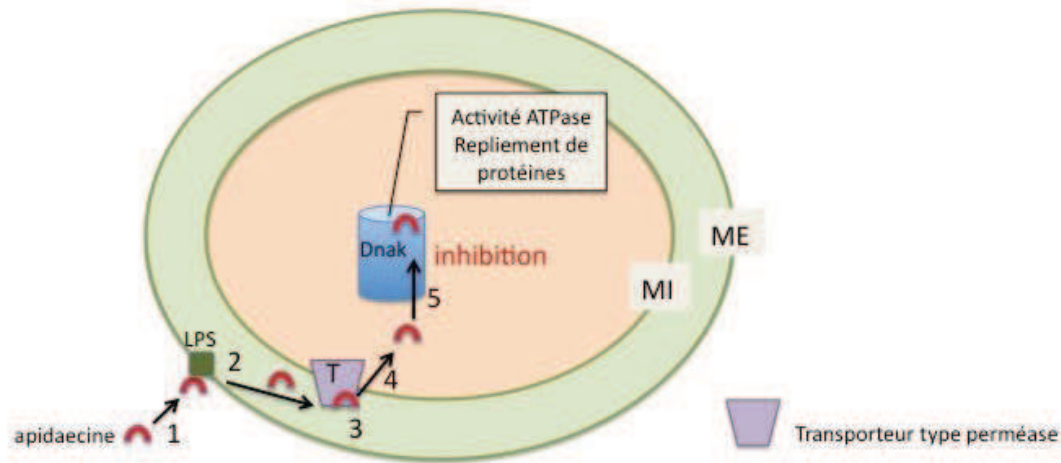


Figure 16 : Le mécanisme d'action de l'apidaécine. D'après Li *et al.*, 2006.

La fixation de l'apidaécine sur la protéine Dnak est corrélée à l'action antibactérienne. Chez *E. coli*, la Dnak est connue pour posséder une activité ATPase et participer à l'initiation de la synthèse de l'ADN bactérien. L'action de l'apidaécine en inhibant l'activité de la Dnak menace la survie de la bactérie.

#### 4 Mécanismes de résistance aux PAMs

De récentes études ont démontré l'existence de mécanismes de résistances des micro organismes et plus particulièrement des bactéries aux peptides antimicrobiens. Ces mécanismes interviennent principalement au niveau de la membrane bactérienne pour contrer l'action des PAMs lors de leur fixation, leur insertion et de l'induction de la perméabilité.

##### 4.1 Modification de la charge nette

L'interaction avec les charges négatives des phospholipides est le principal déterminant de la fixation des PAMs sur la membrane des bactéries. *Staphylococcus aureus* possède un opéron *dlt* comprenant les gènes *dltA*, *dltB*, *dltC* et *dltD* codant pour des protéines responsables de la translocation de la D-alanine du cytoplasme aux acides téchoïques de surface. Par conséquent, l'estérification de ces acides au niveau de leurs groupements phosphate déprotonés va entraîner une réduction de la charge négative nette (Peschel *et al.*, 1999).

Dans le cas des bactéries Gram-, la charge de la membrane externe est modulée par le régulateur PhoP/PhoQ qui par l'intermédiaire d'un régulateur PmrA va modifier la

---

composition de la membrane en éthanolamine et 4-aminoarabinose provoquant ainsi une augmentation des charges positives et réduisant toute interaction avec les PAMs cationiques (Guina *et al.*, 2000).

---

#### 4.2 Modification de la fluidité membranaire

---

Une des stratégies élaborées par les bactéries Gram- pour réduire leur fluidité membranaire et donc leur sensibilité aux PAMs est l'augmentation des interactions hydrophobes.

L'addition d'aminoarabinose ou de palmitate sur le lipide A du LPS réduisent respectivement l'interaction électrostatique entre les peptides cationiques et les charges négatives des groupements phosphate estérifiés et augmente les interactions hydrophobes entre les chaînes acyles du lipide A. Ce dernier point empêche toute insertion de peptide au sein de la membrane et la formation de pores transmembranaires (Guo *et al.*, 1998).

La capsule polysaccharidique (CPS) de *Klebsiella pneumoniae* confère à cette bactérie une résistance aux PAMs tels que la lactoferrine, la défensine 1 des neutrophiles humains et la  $\beta$ -défensine 1 humaine. Le rôle de cette capsule dans les mécanismes de résistance a été démontré en exposant une souche mutante « 52k10 », dépourvue de CPS, à ces peptides. Cette dernière s'est révélée être nettement plus sensible aux peptides antimicrobiens que la souche sauvage (Campos *et al.*, 2004).

---

#### 4.3 Modification des protéines membranaires

---

La membrane externe de la bactérie Gram- *Yersinia enterocolitica* présente une résistance aux PAMs. Cette résistance est liée à la présence d'un plasmide codant pour l'adhésine A (YadA) et la lipoprotéine A (YlpA). YadA protéine membranaire externe de 45 kDa forme des fibrilles à la surface de la bactérie (Visser *et al.*, 1996).

---

#### 4.4 Production d'enzymes protéolytiques

---

La sécrétion de protéases et peptidases est impliquée dans les mécanismes de résistance aux PAMs. Les bacilles *Bacillus sp* et *Pseudomonas aeruginosa* par le biais de ces enzymes dégradent les cécropines et plusieurs espèces de salmonelles sont capables de contrer les attaques de magainines (Guina *et al.*, 2000). Des études *in vitro* ont montré qu'*Escherichia coli* sécrète une sérine-protéase DegP (protéine de choc thermique) afin de résister à la lactoferrine B (Yeaman *et al.*, 2003).

## Chapitre 3 : Généralités sur le venin de fourmis

La composition biochimique des venins de fourmis ainsi que la morphologie de leur appareil vulnérant évoluent en fonction des espèces, de leur comportement et de leur capacité à explorer et à s'adapter à de nouveaux environnements. Les principales fonctions du venin de fourmis sont l'attaque, la défense et la communication chimique.

### 1 Rôle du venin

#### 1.1 L'attaque

Le venin est une arme redoutable utilisée dans la capture des proies mais également lors de conflits avec d'autres espèces de fourmis ou organismes pour préserver l'exclusivité d'une ressource alimentaire ou pour l'extension d'un territoire. Par exemple, *Solenopsis geminata* et *Pheidole dentata* sont connues pour être des concurrents sympatriques convoitant les mêmes ressources. Lors d'affrontement, *Solenopsis* utilise son dard tel une épée contrairement aux *Pheidole* qui se servent de leurs puissantes mandibules pour appréhender leurs opposants (Wilson, 1976).

#### 1.2 La Défense

Pour une large majorité d'espèces de fourmis, la défense est la fonction essentielle de leur venin. Comme les autres insectes sociaux, leur principale préoccupation est d'assurer la sécurité de la colonie face aux prédateurs. Les énormes différences d'échelle entre les fourmis et leurs prédateurs, les obligent à adopter diverses tactiques défensives incluant les mandibules, les allomones (substances produites ou acquises par un organisme et qui induisent chez l'espèce réceptrice une réponse comportementale ou physiologique favorable à l'émetteur et non au récepteur), l'agressivité, l'effet de masse et la présence d'un aiguillon. Ce dernier tel une seringue hypodermique délivre les substances actives du venin dans les tissus du prédateur, ces substances peuvent endommager les tissus sensibles et affecter l'assaillant. Cependant, les fourmis doivent adapter leurs stratégies de défense en fonction du type et de la taille de leurs prédateurs.

### 1.2.1 Emploi du venin contre les prédateurs appartenant aux arthropodes et les concurrents

Les arthropodes prédateurs de fourmis sont généralement de la même taille que celles-ci voire légèrement plus grands. Dans ce cas de figure, les meilleurs moyens de protection employés par les fourmis sont les mandibules, la sécrétion d'allomones et leur capacité à recruter rapidement un nombre considérable d'individus de la colonie pour faire bloc et décourager l'assaillant. Lorsque l'emploi du venin est nécessaire, il a plus une fonction d'allomone que de virulent poison. Dans la sous-famille des *Formicinae*, l'usage d'allomones est très développé car pour certaines d'entre elles le dard venimeux est réduit sous forme de simple vestige ce qui rend impossible l'injection de venin. Les principaux prédateurs des fourmis restent les fourmis elles mêmes. Lors d'un affrontement entre espèces, l'injection de venin est rarement utilisée. Chez les *Myrmicinae* comme *Crematogaster* et autres espèces dites non-piqueuses, l'inefficacité du dard a été compensée par tout un arsenal de défense qui comprend une adaptation morphologique (épines cuticulaires), des armes mécaniques (puissantes mandibules), des sécrétions actives lors d'application locale et une agilité inégalée. Le comportement défensif ainsi que la toxicité des sécrétions abdominales de *Crematogaster scutellaris* ont été testés sur plusieurs sous familles de fourmis dont certaines sont des concurrentes directes. Face au faible pouvoir toxique de leurs sécrétions abdominales sur d'autres espèces de fourmis telles que *C. cruentatus*, les auteurs ont conclu que le rôle majeur de ces sécrétions est de maintenir à distance ses concurrentes durant la recherche de nourriture. Les fourmis appartenant à l'espèce *P. pallidula* se sont révélées très sensibles aux sécrétions de *C. scutellaris* puisque 80% de leurs proies leur ont été subtilisées par ces dernières (Marlier et al, 2004).

### 1.2.2 Emploi du venin contre les vertébrés

Les fourmis appartenant à la sous-famille des *Formicinae* pulvérisent leur venin riche en acide formique sur leurs agresseurs. L'efficacité de ce spray est d'autant plus importante lorsque celui-ci atteint des organes sensoriels tels que les yeux, le nez, la bouche et les muqueuses. L'action corrosive de l'acide formique sera intensifiée si celui-ci entre en contact avec des plaies infligées par les mandibules de fourmis. S'attaquer physiquement au prédateur pour une meilleure diffusion de l'arsenal chimique est la tactique de défense la plus courante chez ses fourmis. Autre particularité du venin et autres sécrétions : ce sont de puissants répulsifs. En effet, ils ont la propriété de rendre



---

les fourmis impropres à la consommation. La saveur âcre de l'acide formique est un bon exemple de ce mécanisme de répulsion. D'autres venins, dépourvus d'acide formique, possèdent eux aussi un caractère répulsif. Les venins de *Dinoponera grandis*, *Pachycondyla obscuricornis* et *Ectatomma tuberculatum* provoquent un engourdissement et une intense sensation de brûlure dans la bouche de leurs prédateurs (Piek, 1986). Malgré cette propriété, l'injection de venin par les espèces de fourmis dites « piqueuses » est un moyen de défense couramment employé. Le venin a pour mission d'infliger une douleur suffisante pour, dans un premier temps, repousser le prédateur puis le maintenir à distance lors d'une prochaine rencontre. Le venin de fourmis non piqueuses comme les *Dolichoderinae* et les *Formicinae* est riche en agents répulsifs et a un réel impact sur les prédateurs lorsqu'il est pulvérisé par une multitude d'individus. L'effet de masse combiné aux diverses « armes » vues précédemment, reste le rempart absolu face aux agresseurs.

### 1.2.3 Emploi du venin contre les microorganismes

Le venin de fourmis est également un bon système de défense contre les bactéries et les champignons. En effet, de nombreux peptides et autres composés extraits de ces venins présentent une activité antibactérienne et antifongique. On suppose que le venin est employé comme agent de stérilisation de la nourriture destinée à être stockée au sein de la fourmilière.

---

## 1.3 La communication chimique

---

Ce troisième point est tout aussi essentiel que l'attaque et la défense pour le bon fonctionnement de la colonie. En effet, le comportement des individus et leurs interactions sont régis par une variété de phéromones. Ces phéromones sont produites aussi bien par les glandes mandibulaires et abdominales que la glande de Dufour et la glande à venin. La nature de ces phéromones sera discutée dans la partie consacrée à la biochimie des venins.

## 2 Biochimie des venins

On peut classer le venin de fourmis en deux catégories principales : ceux composés de simples molécules telles que les alcaloïdes et ceux qui sont essentiellement protidiques. Cette discussion traitera, dans un premier temps, des molécules les plus simples puis évoluera sur la complexité chimique du venin.



---

## 2.1 L'acide formique des *Formicinae*

---

Cet acide formique est présent chez toutes les espèces appartenant à la sous famille des Formicinae (Hefetz et Orion, 1982). Le venin de ces fourmis peut représenter plus de 22% de leur poids total et l'acide formique est le constituant principal de ce venin. Les autres composés sont des acides aminés et des petits peptides, ils ne représentent que 5% du venin (Piek, 1986 ; Hermann et Blum, 1968). L'étude par électrophorèse a permis de révéler la nature acide de ces acides aminés libres. En effet, l'acide aspartique et glutamique sont majoritaires dans la structure de ces petits peptides. La fonction première de l'acide formique est bien entendu la défense contre les prédateurs. L'acide formique, plus acide ( $pK_a = 3.75$ ) qu'un simple acide organique aliphatique possède des propriétés corrosives et cytotoxiques. Il a été démontré que les constituants lipophiles de la glande de Dufour améliorent l'action de l'acide formique contre des prédateurs tels que les arthropodes. En effet, les molécules liposolubles de la glande de Dufour pulvérisées facilitent la pénétration de l'acide formique à travers l'épicuticule des arthropodes (Regnier et Wilson, 1968). Les vapeurs d'acide formique ont également des propriétés insecticides. Le spray, résultant d'un mélange du contenu de la glande à venin et celui de la glande de Dufour, se révèle très efficace lors de conflits avec d'autres espèces de fourmis. Les mandibules de cette espèce jouent un rôle majeur dans la pénétration de l'acide formique. Lors d'attaques directes, les glandes mandibulaires sécrètent des terpènes et autres composés organiques volatils provoquant de lourdes abrasions dans la cuticule de l'adversaire et favorisant ainsi la pénétration de l'acide formique. La synergie entre les composés des glandes mandibulaires, de la glande de Dufour et du venin contribue à la supériorité de *Lasius neoniger* sur *Solenopsis invicta*, une espèce redoutable de fourmis piqueuses (Bhatkar *et al.*, 1972). En parallèle de son rôle de défense, l'acide formique est un facteur essentiel dans le système de communication chimique. D'après Hefetz et Orion (1982), il représente un puissant signal d'alarme et d'agressivité alors que les produits issus de la glande de Dufour et des mandibules jouent un rôle dans l'attraction et le recrutement des congénères.

---

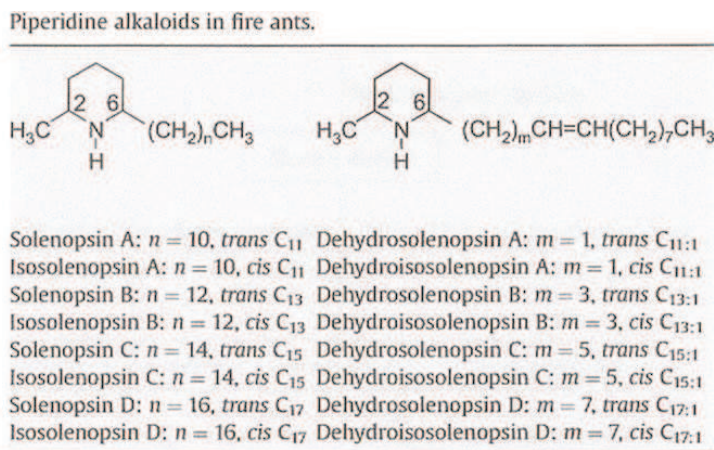
## 2.2 Les alcaloïdes des venins de fourmis

---

Les alcaloïdes se définissent en général comme des molécules organiques hétérocycliques azotées d'origine naturelle pouvant avoir une activité pharmacologique.

La majorité des alcaloïdes proviennent d'extraits de plantes et sont les principes actifs de nombreux médicaments, poisons et psychotropes.

Trois espèces, considérées comme espèces nuisibles pour l'Homme et ses activités comme l'agriculture, ont été étudiées en détail. Il s'agit de *Solenopsis invicta*, *S. richteri* et *S. geminata*, espèces présentes dans les caraïbes, au sud-est des Etats-Unis ainsi que dans les îles de l'Océan Pacifique. Les venins de ces fourmis de feu contiennent quelques traces de protéines de l'ordre de 0,1 à 1% (Baer *et al.*, 1979) mais leurs principaux constituants sont des alcaloïdes. Les fourmis de feu présentent une large variété d'alcaloïdes dont les plus connus sont des *n*-méthyl-*n'*-alkylpiperidines aux chaînes latérales saturées ou insaturées. Par exemple, les venins des fourmis *S. richteri* et *S. invicta*, sont un mélange de 2-méthyl-6-alkylpiperidines (Blum *et al.*, 1992 ; Leclercq *et al.*, 1994). Ces alcaloïdes sont nommés solenopsines, isosolenopsines, dehydrosolenopsines ou encore dehydroisosolenopsines en fonction de la configuration relative (les configurations absolues de tous les carbones asymétriques qui la composent) de ces constituants, de leur longueur et de l'insaturation des chaînes alkyl. Les alcaloïdes identifiés et le système d'abréviations utilisé pour simplifier la nomenclature sont listés dans le Tableau 8



**Tableau 8 : Nomenclature des alcaloïdes isolés du venin des fourmis de feu.**

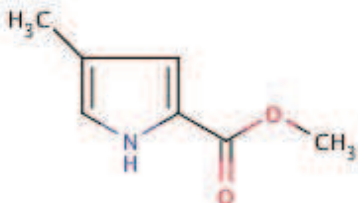
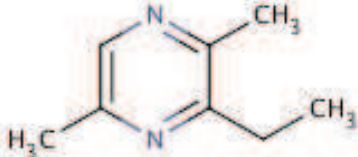
D'après Chen *et al.*, 2009.

Les auteurs reportent la configuration absolue des alcaloïdes en indiquant s'ils sont *trans* (2R, 6R) ou *cis* (2R, 6S). C<sub>n</sub> fait référence au nombre d'atomes de carbone qui composent la chaîne alkyl greffée au noyau, la saturation de cette chaîne est indiquée par C<sub>n</sub>:1 (ex : *trans*-C<sub>13</sub>:1 = *trans*-2-méthyl-6-(*cis*-4'-*n*-trideceny) piperidine).

### 2.2.1 Autres alcaloïdes : Les phéromones de piste

La phéromone de piste a pour origine une ouvrière seule qui trouve une source de nourriture. Afin de guider ses congénères vers la source, elle retourne à la fourmilière en émettant cette phéromone à intervalles réguliers en frottant l'extrémité de son abdomen sur le sol. Lorsqu'une nouvelle fourmi arrive près de la source de nourriture, elle mesure sa qualité, et selon celle-ci dépose sa propre phéromone de piste. L'accumulation de nombreuses phéromones de piste renseigne donc sur la bonne qualité de la nourriture et maintient un flux important d'ouvrières pour son transport. La phéromone de piste est une molécule extrêmement volatile et par conséquent, a un effet attracteur assez court dans le temps. Ainsi, les fourmis ne risquent pas de se tromper en visitant une piste abandonnée. Les phéromones de piste sont produites par différentes glandes comme la glande de Dufour, la glande à venin, les glandes abdominales et les glandes du tarse.

Des phéromones de pistes ont été retrouvées dans le venin de plusieurs espèces comme *Tetramorium*, *Myrmica* et *Monomorium*. Ces phéromones de piste très volatiles ne peuvent pas être des protéines et acides aminés libres. Les analyses chimiques qui ont permis l'identification de ces substances présentes dans le venin ont révélé leur simplicité structurale. Selon les espèces, elles se présentent sous forme de carboxylate de méthylpyrrole ou de pyrazines (Tableau 9) :

Phéromones	Espèces	Référence
 <p>Méthyl 4-méthylpyrrole-2-carboxylate</p>	<i>Atta texana</i> <i>Atta cephalotes</i> <i>Atta sexdens rubropilosa</i> <i>Acromyrmex octospinosus</i>	Tumlinson <i>et al.</i> (1971,1972) Riley <i>et al.</i> (1974) Cross <i>et al.</i> (1979) Cross <i>et al.</i> (1982)
 <p>3-Ethyl-2,5-diméthylpyrazine</p>	<i>Atta sexdens rubropilosula</i> <i>Myrmica rubra</i> <i>Tetramorium caespitum</i> <i>Acromyrmex octospinosus</i>	Cross <i>et al.</i> (1979) Evershed <i>et al.</i> (1981,1982) Attygale and Morgan (1983,1984) Cross <i>et al.</i> (1982)

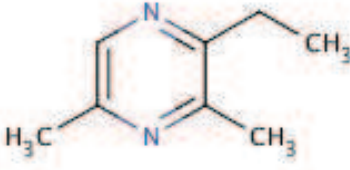
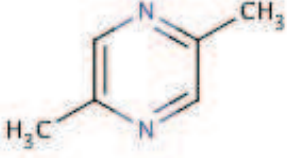
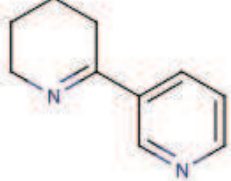
	<i>Acromyrmex octospinosus</i>	Cross <i>et al.</i> (1982)
2-Ethyl-3,5-diméthylpyrazine		
	<i>Tetramorium caespitum</i>	Attygale and Morgan (1983,1984)
2,5-Diméthylpyrazine		
	<i>Messor capensis</i> <i>Aphaenogaster rudis</i>	Brand <i>et al.</i> (1993) Wheeler <i>et al.</i> (1981)
Anabaseine		

Tableau 9 : Exemples d'alcaloïdes employés comme phéromones.

### 2.2.2 Alcaloïdes comme neurotoxines

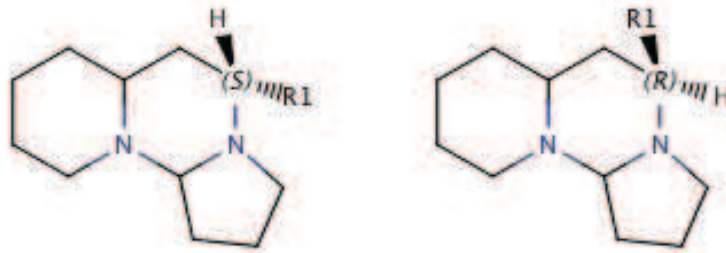
Les alcaloïdes servant de phéromones d'alarme et de recrutement possèdent également des propriétés neurotoxiques. Plusieurs études ont démontré leur capacité à paralyser des proies.

Par exemple, l'anabaseine est une toxine animale présentant des similarités structurales avec l'anabasine, principal alcaloïde des feuilles de tabac sauvage de l'espèce *Nicotiana glauca*. Cette toxine animale est utilisée par les nématodes, vers marins carnivores, pour paralyser leur proies et se retrouve également dans la composition du venin des fourmis du genre *Messor* et *Aphaenogaster* (Kem *et al.*, 1976 ; Wheeler *et al.*, 1981). La neurotoxicité de l'anabaseine et celle d'énantiomères d'anabasine ont été évaluées parallèlement à celle de la nicotine sur plusieurs modèles tels que :

- des souris (injection intraveineuse dans la queue).
- des récepteurs nicotiques de cellules musculaires de fœtus humain.
- des récepteurs nicotiques  $\alpha 7$  et  $\alpha 4\beta 2$  isolés de cerveau de rat.

Les essais *in vivo* sur les souris ont révélé que l'anabaseine, agoniste des récepteurs nicotiques neuromusculaires, était capable d'induire une mortalité à faible dose ( $LD_{50}$  = 0,5 mg/kg).

Les tétraponerines sont des alcaloïdes, isolés du venin de fourmis de Nouvelle-Guinée appartenant au genre *Tetraponera*, dont l'action inhibitrice sur des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChRs) de vertébrés a été démontrée. Les 8 tétraponerines, notées de T1 à T8, sont des alcaloïdes cycliques :



T4 : R1 = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>

T7 : R1 = C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>

T8 : R1 = C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>

Figure 17 : Tetraponerines T4, T8 et T7.

Trois tétraponerines (T4, T7 et T8) ont été testées sur 4 types de nAChRs : ceux présents sur un muscle squelettique de grenouille, ceux exprimés sur les cellules PC 12 (lignée cellulaire dérivée d'un phéochromocytome médullosurrénale de rat), ceux de neurones corticaux et de l'hippocampe de rat et les récepteurs neuromusculaires de l'organe électrique de la raie torpille (Kem *et al.*,2004).

Les tétraponerines T7 et T8, sous leur forme ionisée, inhibent de manière non-compétitive la stimulation du carbachol sur le muscle squelettique de grenouille. La toxine T7, à une concentration de 100 µM, inhibe également l'efflux de <sup>86</sup>Rb (rubidium) émanant des récepteurs nicotiques des cellules PC 12. La tétraponerine T8 bloque les récepteurs nAChR sensibles et résistants à l'α-bungarotoxine (toxine extraite du venin des serpents du genre Bongare) des neurones du cerveau de rat.

### 2.3 Autres phéromones et petites molécules dans le venin

Autre que les phéromones de piste, les venins contiennent également des phéromones sexuelles, d'alarme et de recrutement. Certains possèdent même des allomones.

Hölldobler a identifié la glande à venin de l'espèce *Xenomyrmex floridanus* comme étant l'organe producteur d'une phéromone sexuelle. Chez cette espèce, la glande à venin

produit une phéromone capable à la fois d'attirer les mâles et de les inciter à introduire leurs pièces génitales.

Les venins jouent également un rôle essentiel dans le système d'alarme. Maschwitz (1964) a observé que le venin de *Myrmica* induisait un signal d'alarme et Cammaerts et ses collaborateurs identifiaient les composés de ce signal comme étant de l'éthanal, de l'acétone, de la butanone et d'autres molécules volatiles présentes dans la glande de Dufour et de venin.

Les terpènes entrent également dans la composition de certains venins. Neufs monoterpènes ont été identifiés chez *Myrmicaria natalensis* (Brand *et al.*, 1974) et six autres chez *Myrmicaria eumenoides* (Tableau 10). Ces terpènes ont plusieurs fonctionnalités : ce sont des molécules de recrutement et ils agissent en tant que phéromones d'alerte. Ils s'avèrent être de bons répulsifs et sont dans certains cas très toxiques pour d'autres espèces de fourmis.

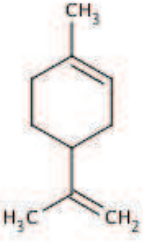
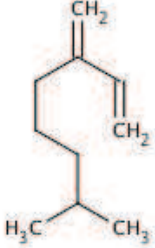
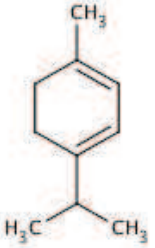
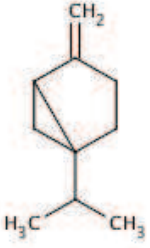
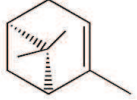

Terpène	Quantité relative	
	<i>M. natalensis</i>	<i>M. eumenoïdes</i>
 <p>Limonène</p>	Composé majeur	36,4 %
 <p><math>\beta</math>-Myrcène</p>	Composé mineur	8,5 %
 <p>Terpinolène</p>	Composé mineur	2,3 %
 <p>Sabinène</p>	Composé majeur	0,3 %
 <p><math>\alpha</math>-Pinène</p>	Composé mineur	4,5 %
 <p><math>\beta</math>-Pinène</p>	Composé mineur	45 %

Tableau 10 : Exemples de terpènes présents dans le venin de fourmis (Piek).



## 2.4 Les polysaccharides des venins

Le venin des fourmis du genre *Pseudomyrmex* contient des polysaccharides bioactifs qui interagissent avec le système du complément humain (ensemble de protéines thermolabiles faisant partie de l'immunité non spécifique). Certaines fractions de ce venin induisent une diminution du taux de protéines du complément C4, C2. Une fraction, de faible poids moléculaire, contenant des polysaccharides comme du mannose, du N-acetylglucosamine, du galactose, du fructose ainsi que du N-acetylgalactosamine peut activer C1 aboutissant à la perte de C4 et C2 (Schultz *et al.*,1979).

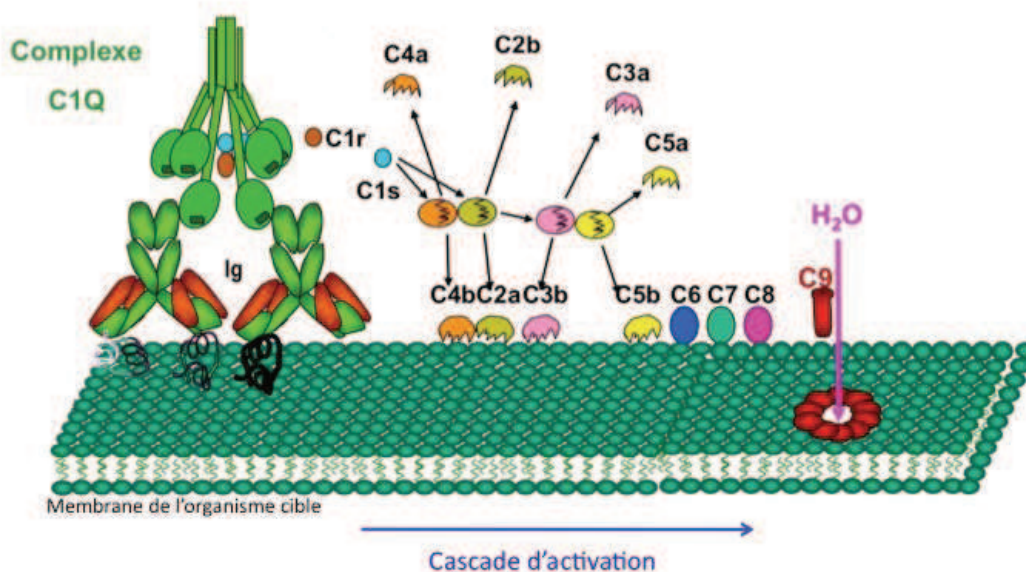


Figure 18 : Cascade d'activation du complément par voie classique.

Le mécanisme d'activation du complément est lié à la fixation des éléments C1 à des complexes antigène-anticorps (Figure 18). Plusieurs sous unités de C1 polymérisent entre elles pour former le facteur C1 qui a une activité convertase sur les facteurs C4 et C2. Les éléments C2b et C4b s'associent pour former la C3 convertase puis les éléments C2b, C3b et C4b s'assemblent pour former la C5 convertase. L'élément C5b va ensuite se lier aux facteurs C6 et C7 pour former le complexe C5b67 qui se liera à la membrane du pathogène par le biais de C7. Le facteur C8 s'ajoutera au complexe tout en s'insérant dans la membrane. Au final le facteur C9 sera recruté et va polymériser pour générer un pore dans la bicouche lipidique.



## 2.5 Les protéines et peptides

Les venins protéiques se retrouvent chez une grande majorité d'espèces de fourmis telles que les *Ponerinae*, les *Myrmeciinae*, les *Pseudomyrmecinae*, les *Ecitoninae* et chez certaines *Myrmicinae*. Les protéines, enzymes et peptides issus des venins et clairement identifiés sont répertoriés dans les banques de données de séquences protéiques telles que Swissprot.

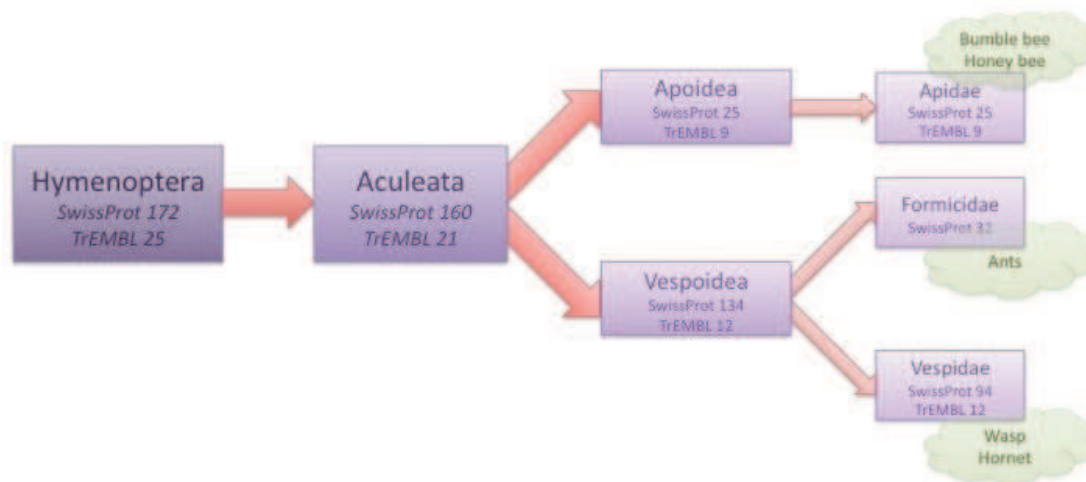


Figure 19 : Schéma représentant l'ordre des Hyménoptères, du sous-ordre des Aculéates ainsi que leurs superfamilles des Apoidea et Vespoidea et leurs familles (Apidae, Formicidae et Vespidae) avec le nombre de protéines isolées de leurs venins référencées dans les banques de données Swissprot et TrEMBL.

Schéma inspiré de celui de Stöcklin et al., 2010.

Actuellement, une trentaine de ces composés ont été recensés dans le venin de fourmis (Figure 19).

### 2.5.1 Les enzymes

Une grande majorité des venins d'insectes comporte des enzymes. Les venins d'hyménoptères utilisés comme arsenal de défense contiennent, sauf exception, des phospholipases et hyaluronidases. Le venin de fourmi possède de faibles taux en phospholipases et plus exactement en phospholipase A (PLA) comparativement au venin d'abeille et de guêpe. Seul le venin de *Pogonomyrmex* présente une forte concentration en PLA (Schmidt et Blum 1978). Des traces de PLA ont été même retrouvées dans le venin de *Solenopsis invicta* (Baer et al 1979) connu pour être essentiellement constitué d'alcaloïdes. D'autres enzymes peuvent être également

présentes dans les venins de fourmis. L'acide phosphatase (AP) est présente chez dix espèces (Tableau 11).

Espèces	Activité relative						
	PLA	PLB	HYAL	AP	ALKP	PDE	LIP
<i>Dinoponera grandis</i>	t	t	++	+	0	t	t
<i>Eciton burchelli</i>	+	t	+	+++	0	-	0
<i>Ectatomma quadridens</i>	+	t	+	++	0	t	++
<i>Ectatomma tuberculatum</i>	+	t	+	++	0	t	+
<i>Myrmecia pilosula</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>Myrmecia pyriformis</i>	+	0	t	-	-	-	-
<i>Myrmecia ruginodis</i>	0	0	p	-	-	-	-
<i>Odontomachus hematodus</i>	t	t	+	t	0	-	-
<i>Paraponera clavata</i>	+	t	t	t	t	t	0
<i>Platythyrea cribrinodis</i>	++	t	+	++	0	0	+
<i>Pogonomyrmex badius</i>	+++	++	++	++	t	0	++
<i>Pseudomyrmex mexicanus</i>	++	++	+	+	0	0	0
<i>Solenopsis invicta</i>	p	p	p	-	-	-	-

Tableau 11 : Enzymes présentes dans le venin de fourmi (Piek, 1986)

Activité relative : +++, très forte ; ++, moyenne ; +, faible ; t, traces ; p, présente mais non quantifiable ; 0 non détectée ; -, non renseignée.

De forts taux d'AP ont été découverts dans le venin de *Eciton burchelli*, *Ectatomma quadridens*, et *Pogonomyrmex badius*. L'alcaline phosphatase (ALKP) est détectée sous forme de traces dans le venin de deux fourmis. L'activité de l'ALKP et celle de l'AP ne semble pas corrélées puisque nous retrouvons dans le venin d'*Eciton* de fortes concentrations en acide phosphatase et aucune en alcaline phosphatase alors que chez *Paraponera* c'est le phénomène inverse. Les phosphodiesterases, enzymes que l'on retrouve essentiellement dans les venins de serpents sont présentes dans les venins des ponerines du genre *Paraponera* et *Ectatomma*. Les estérases font également parties des enzymes qui composent le venin d'une variété de fourmis et de guêpes. Parmi les estérases, on trouve dans le venin de certaines fourmis des lipases. Le venin de *Pogonomyrmex badius* et celui de *Ectatomma quadridens* possèdent une forte activité lipasique. La dernière enzyme analysée est une protéase. Cette enzyme est présente en grande quantité dans le venin des soldats *Eciton burchelli* contrairement à *Ectatomma quadridens* qui en possède de faibles quantités.

### 2.5.2 Autres protéines et peptides

D'autres protéines de nature non enzymatique composent également le venin de fourmis.

#### ⇒ Structure des différentes toxines peptidiques

La barbatolysine est un polypeptide issu du venin de *Pogonomyrmex barbatus* possédant des propriétés hémolytiques puisqu'il est capable de lyser les membranes d'érythrocytes de plusieurs espèces de mammifères. Ce polypeptide, d'un poids moléculaire d'environ 3 kDa, contient 34 acides aminés et est très basique : son point isoélectrique se situe à pH égal à 10 (Bernheimer *et al.*, 1980). Ce peptide se distingue des autres peptides par une absence des résidus lysine, arginine, isoleucine et leucine au sein de sa séquence et par sa richesse en histidine, glycine et glutamate.

D'autres toxines peptidiques ont été identifiées plus récemment : les dinoponeratoxines présentes dans le venin de la fourmi néotropicale *Dinoponera australis*. Les piqûres de ces fourmis infligent une douleur aiguë qui peut être suivie de nausées et sueurs froides. Dans les cas les plus sévères, cette envenimation provoque des troubles cardiaques de type tachycardie qui peut aboutir à un malaise (Haddad junior *et al.*, 2005). Les différentes dinoponeratoxines sont référencées dans le Tableau 13. Celles de masses égales à 3108 et 3180 Da adopteraient une structure en hélice  $\alpha$  et auraient des propriétés amphiphiles comme une majorité de peptides antimicrobiens. Parmi ces toxines, le peptide de masse 1585 Da est issu du clivage du peptide de masse 2503 Da et présente des similitudes structurales avec la gaegurine-5 et la brevinine-1PTa, peptides antimicrobiens issus de grenouille.

L'ectatomine est la principale toxine du venin de la fourmi *Ectatomma tuberculatum*, espèce endémique de l'Amérique du sud et plus précisément de l'Amazonie. L'ectatomine est une protéine de 7928 Da constituée de deux chaînes polypeptidiques A et B (Tableau 13). Chaque chaîne comporte deux hélices  $\alpha$  antiparallèles connectées par une région charnière de 4 acides aminés et des ponts disulfure. Les régions charnières des deux chaînes A et B sont liées entre elles par un troisième pont disulfure (Arseniev *et al.*, 1994).

Les formaecines sont des petits peptides de 16 acides aminés riches en proline et O-glycosylés. En effet un groupement N-acétylgalactosamine (GalNac) est greffé sur la thréonine<sub>11</sub> des formaecines 1 et 2.

Les 6 myrmexines du venin de la fourmi tropicale *Pseudomyrmex triplarinus* sont des isoformes composées de 2 sous-unités : une grande et une petite. Pan et Hink ont identifié 3 petites et 2 grandes sous-unités (Tableau 12) :

		Séquence
Petites sous-unités	SS1	LFGGLLDKLG EKIKKYCNKE NLDKACSKL
	SS2	LFGGLLDKLR EKIKKYCNKE NLDKACSKL
	SS3	LFGNIIDKLR EKIKKYCNKE NLDKACSKL
Grandes sous-unités	LS1	LSLGTIKKLL QILAQGLKAI CDNRDLIAKG CQA
	LS2	ISLAQIKKLL QIIKQGLKAI CNHRDLIAKG CQA

Tableau 12 : Séquence des 5 sous-unités qui composent les myrmexines.

Les myrmexines sont donc une combinaison de ces 6 sous-unités.

Chez la fourmi *Myrmecia pilosula*, une espèce endémique du sud-est de l'Australie, deux peptides allergènes ont été identifiés : la pilosuline 1 et la pilosuline 2. Ces peptides sont extrêmement basiques, des résidus de lysines et arginines représentent 30% de leurs acides aminés totaux.

Seul neuropeptide identifié actuellement dans le venin de fourmi, la poneratoxine est une petite toxine composée de 25 acides aminés. Les études structurales menées en RMN indiquent que la conformation de ce peptide se résume en deux hélices  $\alpha$  connectées entre elles par un coude  $\beta$ . La première hélice est de nature apolaire et hydrophobe alors que la seconde contient essentiellement des acides aminés polaires et acides.

Toxine peptidique	Fourmis	Mw (Da)	Séquence
Dinoponeratoxines	<i>Dinoponera australis</i>	1039	GVVPHDFRI
		1585	ALKAVPAVMG MIKKE
		3108	GLKDWWNKHK DKIIAVAKEM GKAGLQAA-NH <sub>2</sub>
		3180	GLKDWWNKHK DKIIDVVKEM GKAGLQAA-NH <sub>2</sub>
		2503	FWGTLAKLAL KAVPAVMGMI KKE
Ectatomine	<i>Ectatomma tuberculatum</i>	1837	FLGGLIGPLM SLIPGLLK-NH <sub>2</sub>
		4149	GVIKKIWET VCPTVEPWAK KCSGDIATYI KREGGKL
Formaécines	<i>Myrmecia gulosa</i>	3786	WSTIVKLTIC PTLKSMKCK EGSIAATMIKK KCDK
		1794	GRPNPVNNKP TPHPRL
		1807	GRPNPVNTKP TPHYRL
Myrmexines	<i>Pseudomyrmex triplarinus</i>	7069	LFGGLLDKLL EKIKKYCNKE NLDKACSKLI SLAQIKKLLQ IIKQGLKAIC NHRDLIAKGC QA
		6998	LFGGLLDKLL EKIKKYCNKE NLDKACSKLL SLGTIKKLLQ ILAQGLKAIC DNRDLIAKGC QA
		7090	LFGGLLDKLL EKIKKYCNKE NLDKACSKLI SLAQIKKLLQ IIKQGLKAIC NHRDLIAKGC QA
		7143	LFGNIIDKLL EKIKKYCNKE NLDKACSKLI SLAQIKKLLQ IIKQGLKAIC NHRDLIAKGC QA
		7017	LFGGLLDKLL EKIKKYCNKE NLDKACSKLL SLGTIKKLLQ ILAQGLKAIC DNRDLIAKGC QA
		7069	LFGNIIDKLL EKIKKYCNKE NLDKACSKLL SLGTIKKLLQ ILAQGLKAIC DNRDLIAKGC QA
Pilosulines	<i>Myrmecia pilosula</i>	6052	GLGSVFGRLA RILGRVIPKV AKKLGPKVAK VLPKVMKEAI PMAVEMAKSQ EEQQPQ
		3212	IDWKKVDWKK VSKKTCKVML KACKFL-NH <sub>2</sub>
		2458	IIGLVSKGTC VLVKTVCK KVLKQG-NH <sub>2</sub>
		4088	FDITKLNIIKK LTKATCKVIS KGASMCCKVLF DKKKQE
		4275	DVKGMMKKAIK EILDVCVIEKG YDKLAAKLLKK VIQQLWE
Poneratoxine	<i>Paraponera clavata</i>	2757	FLPLLILGSL LMTPPVQAI HDAQR-NH <sub>2</sub>
Ponerícines G	<i>Pachycondyla goeldii</i>	3214	GWKDWAKKAG GWLKKKGGPGM AKAALKAAMQ
		3308	GWKDWLKKGGK EWLKAKGPGI VKAALQAATQ
		3383	GWKDWLNKGGK EWLKKKGGPGI MKAALKAATQ
		3165	DFKDWMTAG EWLKKKGGPGI LKAAMAAAT

	G5		3109	GLKDWVKIAG GWLKKKGGPGI LKAAMAAATQ
	G6			GLVDVLGKVG GLIKKLLP-NH <sub>2</sub>
	G7			GLVDVLGKVG GLIKKLLPG
Ponericines W	W1		2710	WLGSAIKIGA KLLPSVVGLF KKKKQ
	W2		2710	WLGSAIKIGA KLLPSVVGLF QKKKK
	W3		2865	GIWGTAKIG IKAVPRVISM LKKKKQ
	W4		2853	GIWGTALKWG VKLLPKLVGM AQTKKQ
	W5		2600	FWGALIKGAA KLIPSVVGLF KKKQ
	W6		2031	FIGTALG IAS AIPAIVKLFK-NH <sub>2</sub>
Ponericines L	L1		2596	LLKELWTKMK GAGKAVLGKI KGLL-NH <sub>2</sub>
	L2	2578	LLKELWTKIK GAGKAVLGKI KGLL-NH <sub>2</sub>	

Tableau 13 : Liste des peptides identifiés dans les venins de fourmis.

Une quinzaine de peptides, les ponerines, ont été identifiés dans le venin de *Pachycondyla goeldii* (Orivel *et al.*, 2001). Selon leur séquence en acides aminés, ces peptides ont été répartis en trois familles : les ponerines G, W et L (Tableau 13). L'attribution du nom de chaque famille est en relation avec le premier acide aminé N-terminal des ponerines. Les éléments communs aux ponerines G sont l'abondance de résidus glycine (G), lysine (K), alanine (A) et tryptophane (W) au sein de leur séquence peptidique. Les 5 ponerines G (G1 à G5) composés de 31 acides aminés font parti des plus grands peptides de ce venin. Au sein de cette famille seule la ponerine G6 possède une extrémité C-terminale amidée. Nous retrouvons chez la seconde famille de ponerines cette abondance en résidus lysine mais également en leucine (L) et valine (V). La troisième famille ne comprend que deux ponerines d'une longueur de 24 acides aminés et amidées en C-terminale. Ces ponerines ne diffèrent l'une de l'autre que d'un seul acide aminé en position 9, où la méthionine de la ponerine L1 est remplacée par de l'isoleucine pour la L2.

#### ⇒ Propriétés des toxines peptidiques

Une majorité des toxines peptidiques citées précédemment sont cytolytiques ce qui leur confère des propriétés antibactérienne, antifongique et hémolytique. Prenons l'exemple de l'ectatomine, les tests effectués sur des membranes artificielles suggèrent que cette protéine s'insinuerait dans la bicouche lipidique pour former des pores membranaires.

Lors des essais biologiques menés sur les ponerines, les auteurs ont montré que ces toxines possèdent différentes actions cytolytiques. Les ponerines G1 et G3 possèdent une activité antibactérienne et insecticide alors que les ponerines G4 et G6 sont actives uniquement sur les bactéries Gram + et les levures telles que *Saccharomyces cerevisiae*. Les ponerines W sont actives, sans exception, sur l'ensemble des bactéries Gram+ et Gram- ainsi que sur les levures, démontrent une activité insecticide et sont capables de lyser la membrane d'érythrocytes de mammifères. Ces propriétés biologiques peuvent s'expliquer par les similitudes de séquence (environ de 70%) avec la mellitine et la gaegurine 5, peptide isolé de la peau de grenouille *Rana rugosa*.

Les ponerines L sont similaires aux dermaseptines sécrétées par la peau de grenouille *Phyllomedusa sauvagii*.

Quant aux myrmexines, elles agiraient comme anti-inflammatoires puisqu'elles réduisent, à une dose égale à 5,4 mg/kg, 52% de l'œdème induit par injection de carraghénane (polysaccharide d'algues rouges) au niveau des pattes de rat. Le mode d'action de ces toxines est encore inconnu, l'absence d'homologie de séquence par rapport à d'autres peptides de venin aux propriétés anti-inflammatoires comme les peptides de dégranulation de mastocytes (MCD) des venin d'abeilles et de guêpes, suggère que ces toxines interviennent dans d'autres voies de signalisation pour limiter le processus inflammatoire (Pan et Hink, 2000).

La poneratoxine est une neurotoxine peptidique qui affecte les canaux sodiques voltage dépendants et bloque la transmission synaptique au niveau du système nerveux central des insectes (Piek *et al.*, 1991 ; Duval *et al.*, 1992).



## Chapitre 4 : Les fourmis de l'étude

Ce chapitre présente les deux modèles de fourmis étudiés durant cette thèse : *Tetramorium bicarinatum* et *Crematogaster striatula*. Ces espèces ont été sélectionnées sur la base de critères éthologiques: la première étant une fourmi terricole et la seconde, une fourmi arboricole. De ce fait, leur technique de chasse est adaptée à leur environnement ce qui implique peut-être une différence dans la nature chimique de leur venin.

### 1 *Tetramorium bicarinatum*

Cette espèce fait partie des fourmis dites « vagabondes » ou « tramp species ». Hölldobler et Wilson (1990) définissent ce genre comme typiquement polygyne, largement distribué dans le monde par le commerce humain et vivant en association étroite avec l'Homme, pouvant être unicolonial et se propager par « bouturage ».

#### 1.1 Taxonomie

Règne	Animal
Ordre	Hyménoptère
Famille	Formicidae
Sous-famille	Myrmicinae
Tribu	Tetramoriini
Genre	<i>Tetramorium</i> (Mayr 1855)
Espèce	<i>Tetramorium bicarinatum</i>

#### 1.2 Historique et répartition géographique

*Tetramorium bicarinatum* est une *Myrmicinae* de la tribu des *Tetramorini* appartenant à la famille des *Formicidae*. Elle a été décrite pour la première fois sous le nom de *Myrmica bicarinata* par Nylander en 1846.

Actuellement *T. bicarinatum* est une espèce très répandue dans les régions tropicales et subtropicales comme en Asie du sud-est et en Amérique du sud. Cette « fourmi vagabonde » est désormais présente sur tous les continents. Elle a été décrite successivement à Porto Rico (Torres, 1984), à Tahiti dans le Pacifique (Perrault, 1987), aux Bermudes (Hilburn *et al.*, 1990), à Santa-Fe aux Galapagos (Abedrabbo, 1994), en Californie, en Floride et aux îles Hawaii (Martinez, 1993 ; Deyrup *et al.*, 1989 ; Reimer, 1994) et dans le nord de l'Australie (Andersen *et al.*, 1994).

### 1.2.1 Origine de l'élevage

Les fourmis qui composent notre élevage sont originaires de l'état de Bahia au Brésil. Elles proviennent de la région d'Itabuna (Figure 20).

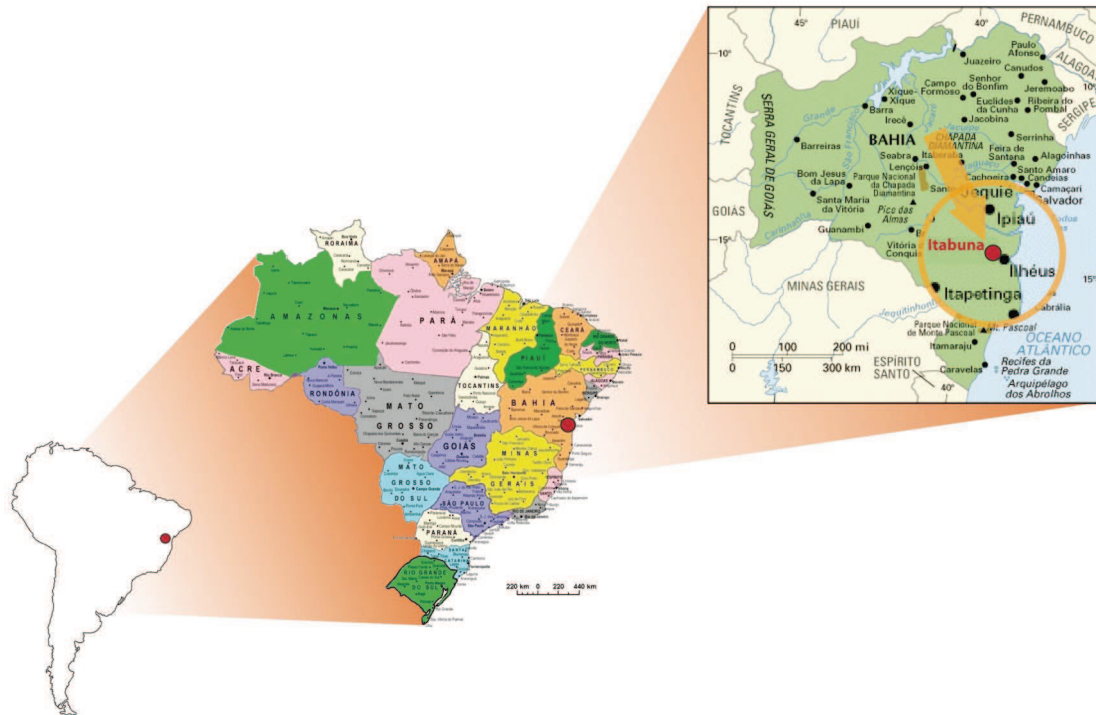


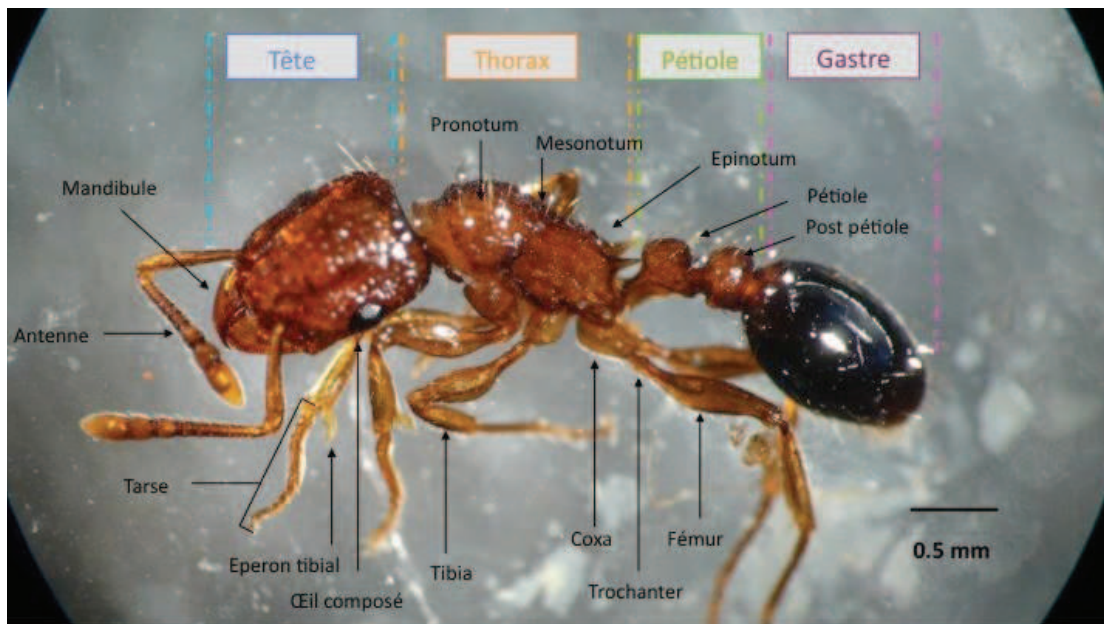
Figure 20: Localisation de la région d'Itabuna (Brésil).

### 1.3 Morphologie de l'espèce

La longueur des ouvrières est comprise entre 3,4 à 4,5 mm (Figure 21)



Figure 21: Taille d'une ouvrière de *T. bicarinatum*.



**Figure 22: Anatomie d'une ouvrière de *T. bicarinatum*. Vue sous binoculaire**

Les ouvrières sont monomorphiques. La teinte de la tête et du thorax varie du rouge foncé au brun orangé, celle du pédicelle (ensemble pétiole/postpétiole) du brun orangé au jaune orangé, le gastre est brun très foncé. Chez la jeune ouvrière, nous retrouvons ces mêmes couleurs dans des nuances beaucoup plus claires, leurs couleurs définitives apparaîtront quelques semaines plus tard. Le corps est parsemé de carènes plus ou moins prononcées excepté sur le gastre qui est lisse et brillant. Les deux carènes les plus marquantes sont situées sur la partie frontale de la tête, de part et d'autre de l'axe principal de l'animal. L'épinotum, premier segment abdominal soudé au thorax, est armé d'une paire d'épines sur la face dorsale. Leurs mandibules sont finement striées. Le diamètre des yeux composés varie de 0,19 mm à 0,29 mm. Toute la surface du corps est recouverte d'un grand nombre de soies. Les antennes sont segmentées en 12 segments dont 3 qui leur confèrent une forme de massue.

La reine, d'une longueur légèrement plus élevée, se distingue essentiellement des ouvrières par la largeur de son thorax. Les mâles sont facilement reconnaissables avec leur thorax très bombé vers l'avant de la tête, leur tête de petite taille ainsi que leur yeux proéminents.

#### 1.4 Biologie de l'animal

*T. bicarinatum* est une fourmi terricole. Les colonies sont de petite et moyenne taille et polygéniques. Ces fourmis sont omnivores, elles consomment aussi bien des insectes

vivants ou morts, des fruits et végétaux. Elles se nourrissent également de sécrétions sucrées provenant d'hémiptères comme des pucerons par exemple. Par conséquent, elles ont tendance à protéger ces insectes afin de les utiliser comme source de nourriture.

#### ⇒ Cycle de vie :

De la même façon qu'une chenille se transforme en papillon, les larves de fourmis se transforment en fourmis adultes en plusieurs phases.

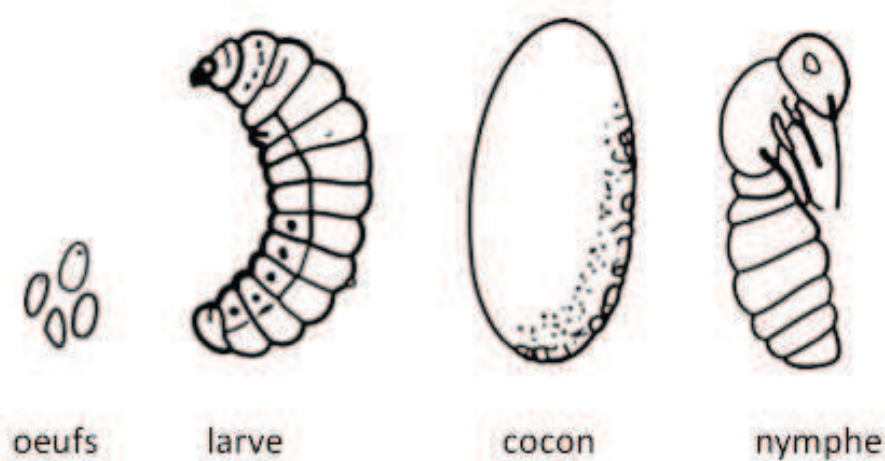


Figure 23: Les différents stades de développement d'une fourmi.

La croissance d'une fourmi se déroule en plusieurs étapes comprenant quatre stades: oeufs, larves, nymphes et adultes. Les œufs minuscules, blancs, éclosent deux à six semaines après leur ponte par la reine et donnent naissance à des larves blanches. Après une période de quelques semaines, les larves deviennent des nymphes puis les adultes succèdent au stade nymphal. Les travaux de Cyril Astruc en 2001 sur l'étude du cycle de développement de *T. bicarinatum* nous indiquent que la durée moyenne totale de développement des ouvrières de la ponte jusqu'à l'imago était de  $43,44 \pm 1,90$  jours et que cette espèce comportait trois stades de développement larvaire.

### 1.5 Système vulnérant des *Tetramorium*

Le système vulnérant des *Tetramorium* se compose de deux glandes à venin débouchant sur le réservoir à venin et de la glande de Dufour (Figure 24).

Comparativement au réservoir à venin, la glande de Dufour est de plus petite taille.



Figure 24 : Photo de l'appareil vulnérant de *T. bicarinatum* prise sous microscope à contraste de phase. Grossissement X40

## 1.6 Investigations sur le venin de *Tetramorium*

Les premières analyses sur la composition chimique du venin de *Tetramorium* datent de 1965 par Blum et Ross. La composition du venin de *Tetramorium caespitum* a été comparée avec le venin d'autres myrmécines (Von Sicard, 1989). Cette étude a montré que, dans le venin de *Tetramorium caespitum*, le taux de protéines est nettement plus élevé que chez *Solenopsis invicta* et *Myrmica ruginodis*. Toutefois, il reste inférieur au taux trouvé dans le venin de *Pogonomyrmex badius*. Le venin de *T. caespitum*, riche en protéines et polypeptides, contient également des acides aminés libres en faible concentration. La composition en acides aminés du venin de *T. caespitum* est illustrée dans le Tableau 14.

Acide aminé		Quantités présentes		% en poids sec de venin w/w
		nmoles	ng	
Asp	D	0,52 ± 0,08	69,2 ± 10,6	2,8
Glu	E	0,23 ± 0,06	33,8 ± 8,8	1,4
Ala	A	0,10 ± 0,01	8,9 ± 0,9	0,4
Thr	T	0,09 ± 0,01	10,7 ± 1,2	0,4
His	H	0,04 ± 0,01	6,2 ± 1,6	0,3
Ser	S	0,05 ± 0,02	5,3 ± 2,1	0,2
Lys	K	0,03 ± 0,01	4,4 ± 1,5	0,2
Leu	L	0,03 ± 0,01	3,9 ± 1,3	0,2
Val	V	0,03 ± 0,00	3,5 ± 0,0	0,1
Gly	G	0,03 ± 0,01	2,3 ± 0,8	0,1
Met	M	0,02 ± 0,01	3,0 ± 1,5	0,1
Arg	R	0,01 ± 0,00	1,7 ± 0,0	0,1
Total			152,9	6,3

**Tableau 14 : Acides aminés libres du venin de *T. caespitum*.**

D'après N.A.E. Von Sicard et al. (1989)

Le contenu en acides aminés est exprimé en ng par réservoir à venin extrait ± SEM (standard error of mean = écart-type à la moyenne).

En comparant ce venin avec celui d'une autre espèce de *Tetramorium* (*Tetramorium guineens*), les auteurs ont noté l'absence de tyrosine, un faible taux en glycine ainsi que des taux plus importants en histidine et en thréonine. La prédominance de l'acide aspartique et glutamique parmi ces acides aminés libres marque la similitude qui existe chez ces fourmis appartenant au même genre. De l'histamine a été également détectée chez *T. caespitum* ; cette amine biogène représente 0,9% du poids sec en venin ce qui équivaut à la moitié des taux trouvés chez des fourmis primitives telles que *Myrmecia gulosa* et *Myrmecia pyriformis* (Cavill et al., 1964 ; Lewis et De Lande, 1963). La présence d'histamine dans le venin de *T. caespitum* lui confère une propriété allergénique. Des traces de phospholipase et hyaluronidase ont été retrouvées dans la composition de ce venin mais aucune activité enzymatique n'a été constatée.

## 2 *Crematogaster striatula*

Cette espèce arboricole d'Afrique Tropicale est relativement présente dans les plantations. De très petite taille, ces fourmis n'en sont pas moins de redoutables prédatrices et peuvent se montrer agressives.

### 2.1 Taxonomie

Règne	Animal
Ordre	Hyménoptère
Famille	Formicidae
Sous-famille	Myrmicinae



Tribu  
Genre  
Espèce  
Sous-espèce

Crematogastrini  
Crematogaster (Lund 1831)  
*Crematogaster striatula* (Emery 1892)  
*Crematogaster striatula striatula*

## 2.2 Historique et répartition géographique

*Crematogaster striatula* est une Myrmicinae de la tribu des Crematogastrini qui a été décrite pour la première fois en 1892 par l'entomologiste Carlo Emery. Le genre *Crematogaster* renferme 430 espèces décrites dans le monde (Bolton, 1995) et occupe aussi bien des régions tempérées que tropicales. *Crematogaster striatula* vit essentiellement en Afrique de l'est et domine le bush africain (territoire peu habité de savane ou de forêts, très fourni en arbustes et arbres isolés) (Leston, 1973).

### Origine de l'élevage :

Plusieurs nids ont été prélevés dans les environs de Yaoundé (Figure 25).

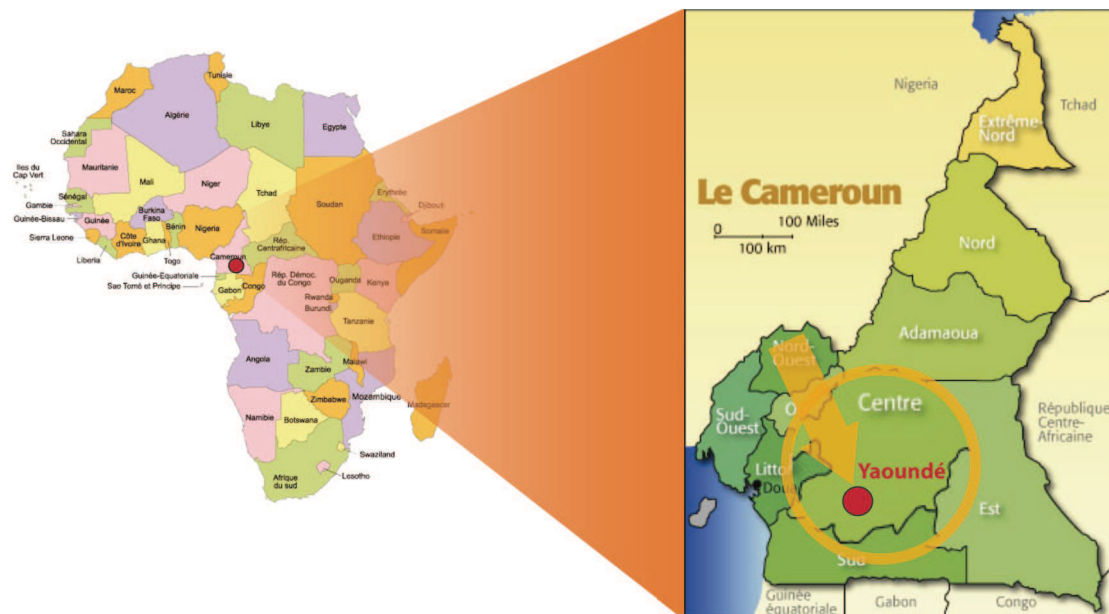


Figure 25: Localisation du site de prélèvement des *C. striatula*.

## 2.3 Morphologie de l'espèce

La longueur des individus est comprise entre 3 à 3,5 mm (Figure 26)

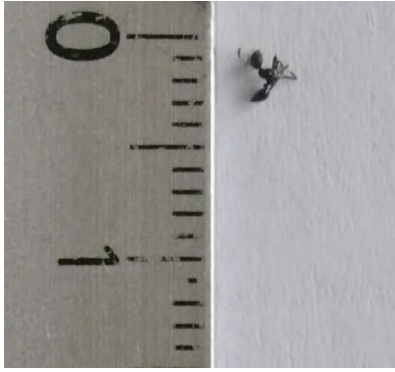


Figure 26: Taille d'une ouvrière *C. striatula*.

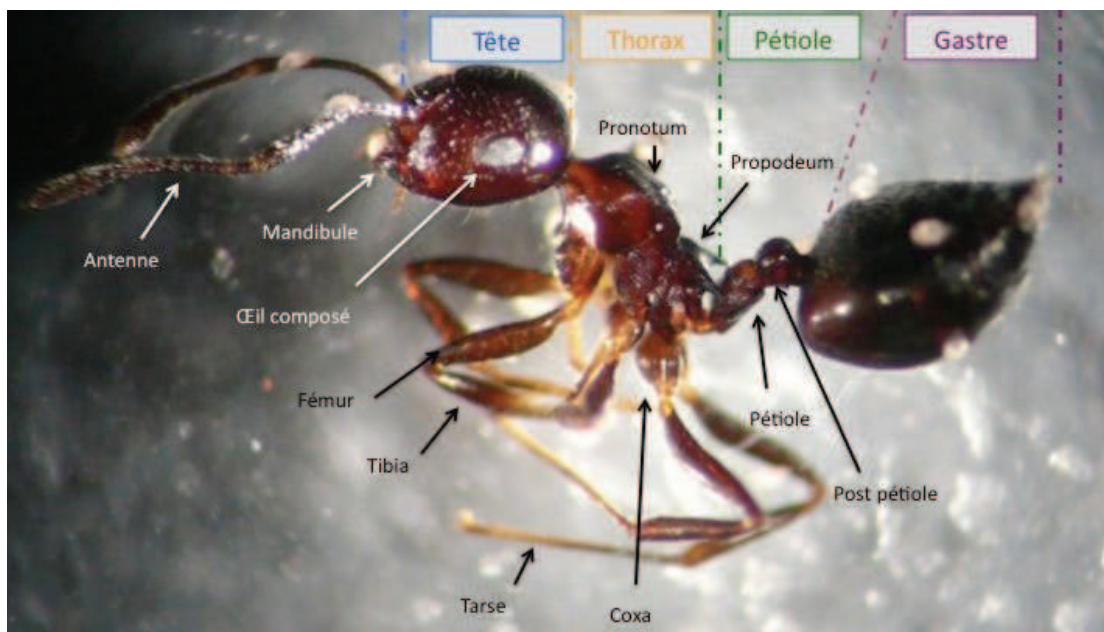


Figure 27: Anatomie d'une ouvrière *C. striatula*. Vue sous binoculaire.

Ces fourmis sont petites, de couleur marron rouge de la tête au pétiole. La tête est ronde et luisante. Elle est couverte de stries fines et serrées, plus profondes sur la partie antérieure et entremêlées de petits points d'où sortent les soies (Figure 27). Les mandibules sont courtes et densément striées. Les antennes sont longues et leur extrémité a une forme de massue. Leur abdomen a la particularité d'être en forme de cœur (caractéristique principale des *Crematogaster*). Il est d'un brun très foncé qui tend sur le noir, il est lisse, sauf les points piligères, et très luisant. Le post-pétiole est articulé sur la partie dorsale du premier segment du gastre, ce dernier ayant un aspect condiforme. Ces fourmis ont tendance à élever leur abdomen au dessus du thorax et de la tête lorsqu'elles inspectent leur environnement. Cette posture indique qu'elles sont constamment en état d'alerte et prêtes à pulvériser leur venin sur un éventuel ennemi.



---

Le propodeum présente deux épines et au niveau du gastre, l'aiguillon atrophié possède une extrémité spatulée.

Les reines de cette espèce sont nettement plus grandes que les ouvrières.

---

## 2.4 Biologie de l'animal

---

*Crematogaster striatula* est une fourmi arboricole d'Afrique Tropicale relativement fréquente dans les plantations et ses colonies sont monogynes. Les nids se trouvent dans le bois mort, sur les arbres ou dans des termitières. Les colonies se nourrissent à la fois de nectars produits par les hémiptères qu'elles élèvent et également de proies qu'elles capturent. Le comportement de capture chez cette espèce est particulier : une fois la proie localisée, les ouvrières s'approchent à reculons de cette dernière en pointant leur aiguillon. En agitant leur abdomen, elles aspergent leur proie de venin.

---

## 2.5 Investigation sur le contenu de la glande de Dufour

---

Le système vulnérant des *Crematogaster* présente une glande de Dufour hypertrophiée par rapport à la glande à venin. Daloze propose que l'efficacité de leur substance venimeuse réside dans l'action combinée de la glande de Dufour avec la glande à venin. En effet, la glande de Dufour produirait des précurseurs peu toxiques comme de longues chaînes d'acétates polyinsaturés. Ces molécules seraient les substrats de deux enzymes, une acétate estérase et une alcool-oxydase, présentes dans la glande à venin. Lors de l'émission de la substance venimeuse, le contenu des deux glandes se mélangeraient au niveau du canal défèrent : les protoxines de la glande de Dufour se transformeraient en toxines.

L'acétate estérase induit la transformation des acétates en alcool et l'alcool-oxydase permet de produire des aldéhydes très toxiques (Pasteels *et al.*, 1989).

L'analyse chimique du contenu de la glande de Dufour des *Crematogaster* a été réalisée sur plusieurs espèces issues d'Europe (Daloze *et al.*, 1987, 1991 ; Pasteels *et al.*, 1989), de Papouasie Nouvelle-Guinée (Leclercq *et al.*, 1997), du Brésil (Daloze *et al.*, 1998 ; Leclercq *et al.*, 2000a,b) et du Kenya (Laurent *et al.*, 2003).

Des études menées sur la composition de la glande de Dufour ont révélé que, chez les espèces du genre *Crematogaster* de Nouvelle-Guinée, cette glande contenait comme composés des 4-oxo-2,5-diénoles acétates.

Des équipes belge et brésilienne ont isolé deux nouvelles molécules : le crematofurane (1) et l'isocrematofurane (2) dans les sécrétions de la glande de Dufour de la fourmi

brésilienne *Crematogaster brevispinosa rochai*. Ces molécules appartiennent à la famille des diterpènes furanocembrenes.

### Rappels :

Les diterpènes se composent de quatre unités d'isoprènes et ont pour formule moléculaire  $C_{20}H_{32}$ . Ils dérivent du pyrophosphate de géranylgeranyl (GGPD). Les diterpènes forment également une base pour les composés biologiquement importants comme la vitamine A par exemple. Ils sont connus pour être des antimicrobiens et anti-inflammatoires. Le cembreène est un diterpène monocyclique normal.

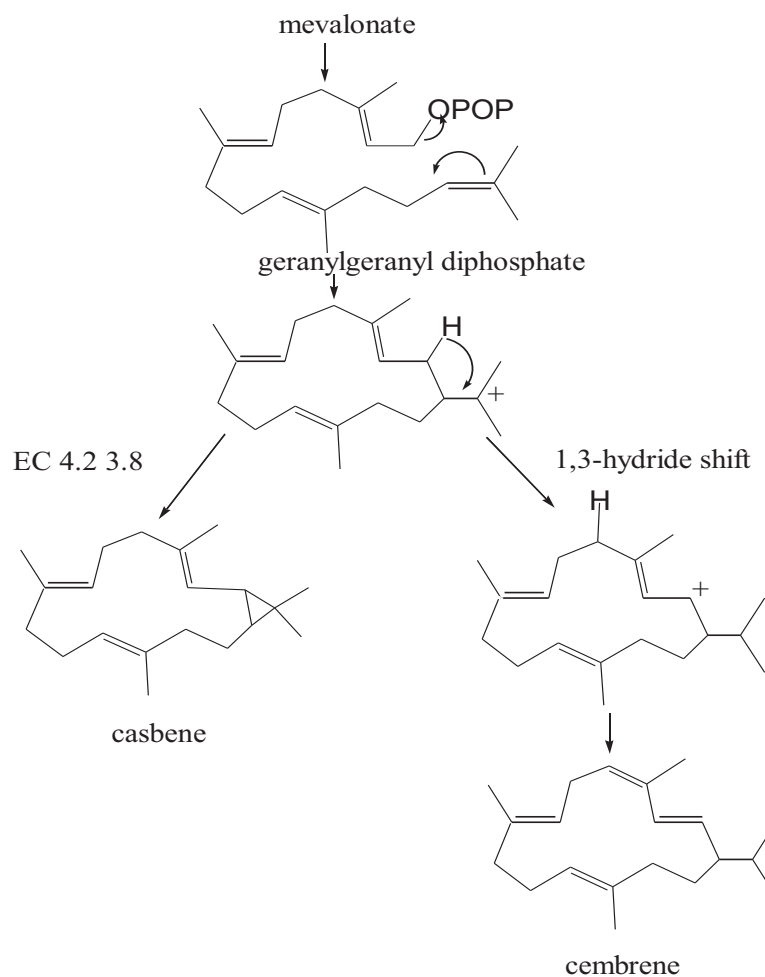
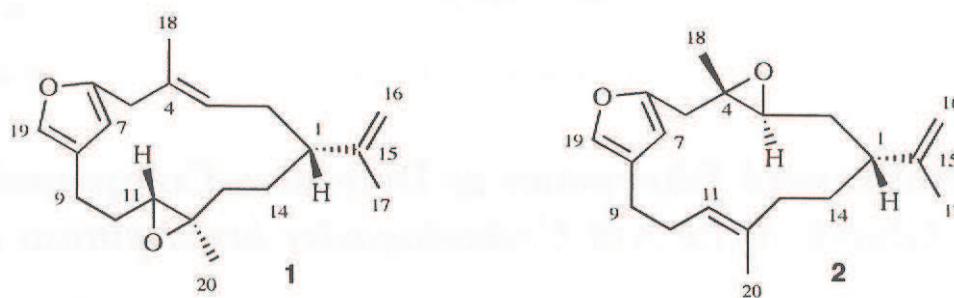


Figure 28 : Formation de cembreene.

Schéma des crematofurane (1) et isocrematofurane (2)

S. Leclercq et al. / Tetrahedron 56 (2000) 2037–2042



L'activité insecticide du contenu de la glande de Dufour et du crematofurane isolé a été testée sur des ouvrières de l'espèce *Myrmica sabuleti* par application locale. Les résultats ont montré que le crematofurane est une toxine à action lente puisqu'il faut attendre 72 heures pour observer une mortalité maximale des *Myrmica sabuleti*. La dose létale capable de tuer 50% des *Myrmica* a été estimée à 5 µg/mg de fourmis. Il est connu que les alkylfuranes présentent des activités insecticides. Dans ce cas, les auteurs émettent l'hypothèse que la partie furane du crematofurane serait responsable en partie de cette activité.

Une autre étude a montré que chez la fourmi africaine *Crematogaster nigriceps*, la glande de Dufour contenait environ huit dérivés de type 1-alkyl(en)yl-1,3,5-trihydroxycyclohexanes.

La toxicité de la substance venimeuse (venin et contenu de Dufour) de trois *Crematogaster* tropicales (*C. sp. prox. abstinens*, *C. distans* et *C. brevispinosa rochai*) a été évaluée plus en détail sur des termites (*Nasutitermes ephratae*) et sur des fourmis appartenant à d'autres genres (*Solenopsis sp.* et *Cephalotes pusillus*). Le venin des *Crematogaster* a été appliqué localement sur l'abdomen des espèces « cobayes » (fourmis et termites). Les termites sont plus sensibles aux sécrétions des trois *Crematogaster* alors que l'espèce *Cephalotes pusillus* montre une forte résistance. L'épaisseur de la cuticule des insectes cibles semble être un facteur important à la résistance aux sécrétions des *Crematogaster*. Comparativement aux autres études menées sur le liquide de Dufour et le venin des *Crematogaster*, ces travaux confirment la lente action de ces sécrétions : la mortalité des individus n'apparaît qu'au bout de plusieurs heures voire plusieurs jours. Le principal objectif du contenu de Dufour ainsi que du venin n'est pas de tuer instantanément leurs proies mais de les paralyser ainsi que de repousser leurs agresseurs et autres espèces compétitrices.

*Notre étude se portera donc sur l'identification des composés du réservoir à venin de *Tetramorium bicarinatum* et de la glande de Dufour de *Crematogaster striatula* ainsi qu'à l'évaluation de leurs activités biologiques.*

## Matériel et méthodes

Evoqué lors de l'introduction, le principal objectif de cette étude, est la découverte et l'identification de molécules bioactives isolées du venin de fourmis exotiques. Ce type de recherche implique une méthodologie alliant la complémentarité de techniques à l'interface de la microbiologie, de la biochimie analytique ainsi que des études comportementales. Cette seconde partie, traitée en six chapitres, présente le dispositif expérimental mis en place pour l'étude des sécrétions venimeuses des deux fourmis étudiées : *Tetramorium bicarinatum* et *Crematogaster striatula*.

Le premier chapitre expose la mise en place des nids expérimentaux ainsi que les conditions d'élevage des deux espèces de fourmis au sein du laboratoire. Le « bien-être » des insectes est essentiel pour le bon déroulement des travaux puisqu'une bonne croissance des nids est la garantie de quantité suffisante en matière première: le venin.

Le second chapitre traite de la partie la plus limitante et délicate de l'étude : l'extraction des glandes à venin et de Dufour sous loupe binoculaire.

Le troisième chapitre résume les différents tests biologiques réalisés *in vivo* et *in vitro* dans la détermination des propriétés du venin brut et du liquide de la glande de Dufour. Parmi ces tests biologiques, figurent les tests microbiologiques. C'est pourquoi les techniques de microbiologie sont décrites plus en détail.

Le quatrième chapitre présente les techniques analytiques de biochimie utilisées pour l'identification des molécules d'intérêt.

Les cinquième et sixième chapitres évoquent respectivement la synthèse des composés et les expériences préliminaires dans la détermination de leur structure spatiale.

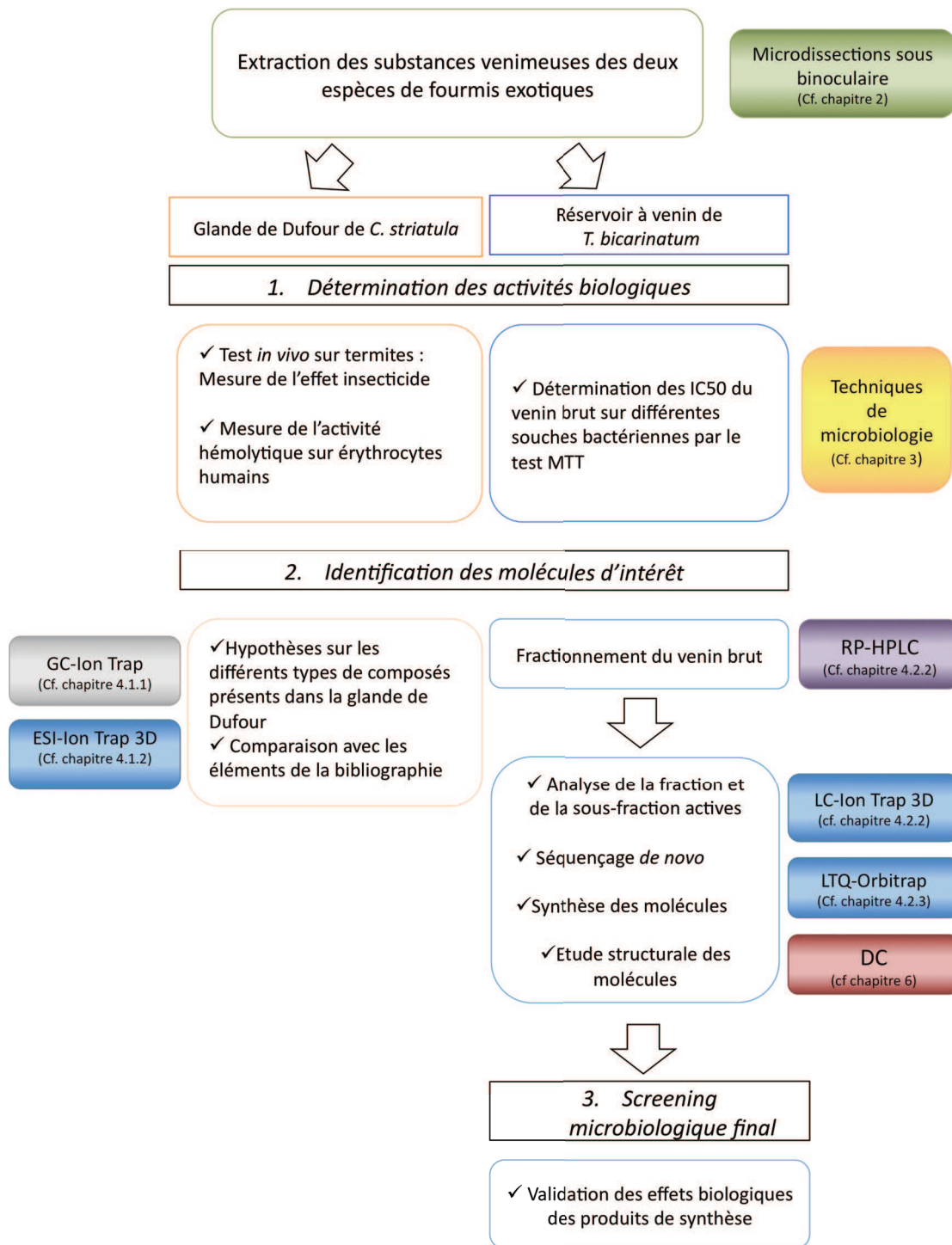


Figure 29: Schéma synthétique de la démarche expérimentale adoptée pour l'étude des venins des deux fourmis.

## Chapitre 1 : Elevage des fourmis

### 1 Construction des nids et aires de chasse

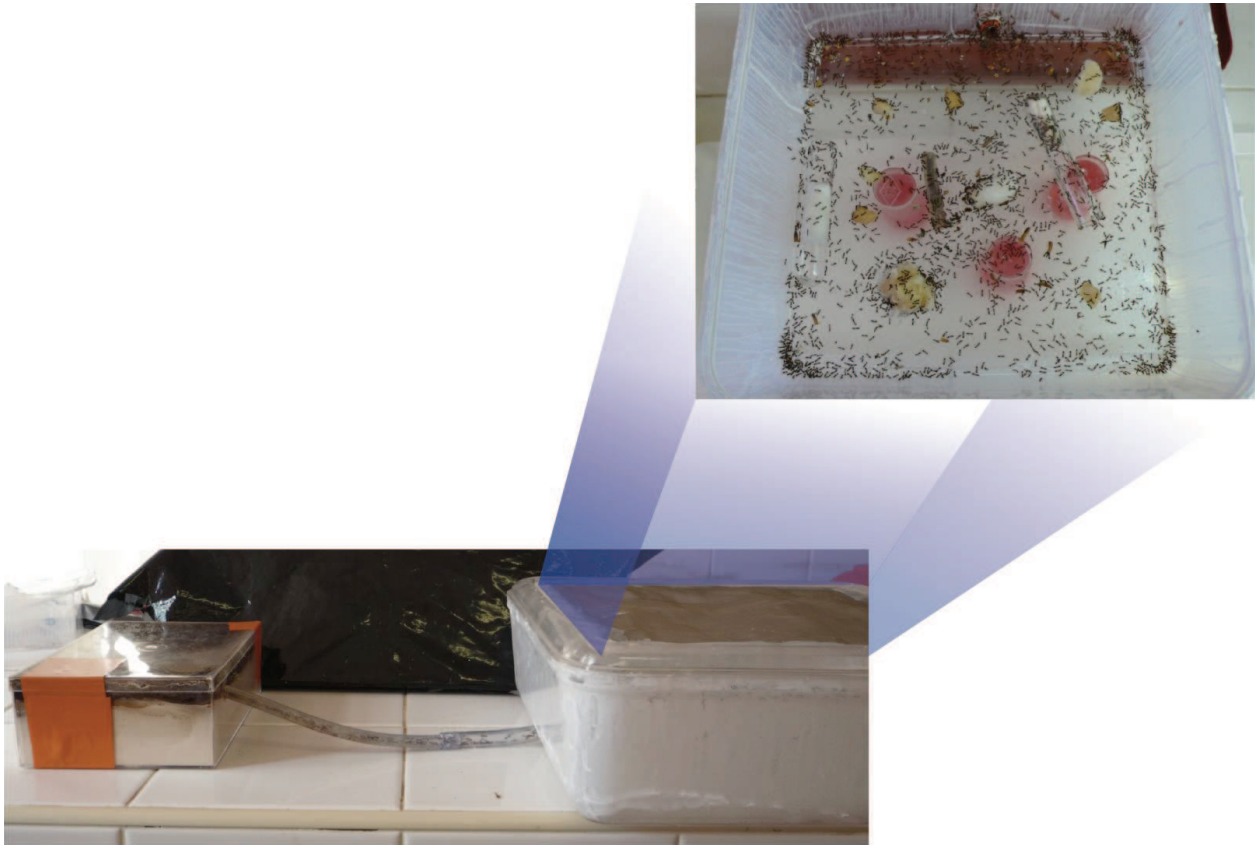
*Tetramorium bicarinatum* et *Crematogaster striatula* sont deux espèces plus ou moins difficiles à maintenir dans un espace clos. De petite taille et de nature curieuse, les ouvrières créent des passages et s'y faufilent aisément pour sortir du nid d'où la nécessité d'une vigilance quotidienne.

#### 1.1 *Tetramorium bicarinatum*

Les nids sont constitués d'une boîte en plastique rectangulaire avec un couvercle (L : 18,5 ; l : 12,3 ; h : 5,5 cm). La boîte est remplie à mi-hauteur par du plâtre qui contient en son cœur, une chambre réservée pour l'humidification du nid. Le plâtre du nid est humidifié avec de l'eau à l'aide d'une seringue. Les nids sont maintenus à l'obscurité par un couvercle en carton afin de recréer les conditions du sous-sol et sont reliés à l'aire de chasse par un tube en silicone transparent.

L'aire de chasse, espace réservé à la distribution de nourriture et au prélèvement des fourmis, est une boîte en plastique de type « Tupperware » dont les parois sont enduites de Fluon. Ce dernier, forme liquide du Téflon, constitue une barrière glissante pour les fourmis et les empêche de s'évader. Le couvercle des aires de chasse est percé en son centre afin d'aérer l'espace (Figure 30).





**Figure 30 : Nid de *T. bicarinatum* avec son aire de chasse.**

*Le Zoom représente l'intérieur de l'aire de chasse qui contient des tubes à essai remplis d'eau et de coton afin de maintenir un taux d'humidité suffisant. Des morceaux de fruits ainsi que des cotons imbibés d'une solution de miel sont les principales sources de sucre pour la colonie. Des vers de farine vivants sont découpés et disposés aux quatre coins de l'aire de chasse.*

## **1.2 *Crematogaster striatula***

Cette fourmi arboricole vit dans les branches sèches des arbres. Ces branches sont récoltées et placées dans des boîtes en plastique, également reliées à l'aire de chasse par un tube en silicone. Cette fois, la paroi et le couvercle de l'aire de chasse sont enduits de lubrifiant siliconé (dégrippant) et l'aération est assurée par un grillage au maillage très serré.

Dans les deux cas, les nids et aires de chasse sont « montés sur pilotis » afin d'éviter toute évasion de ces fourmis tropicales. Des bacs remplis d'eau savonneuse sont placés en dessous des différents compartiments.

## 2 Conditions d'élevage

Le dispositif d'élevage est placé dans une salle où la température ambiante est maintenue entre 22 et 25°C. Afin de recréer les conditions tropicales, nous nous assurons de maintenir un taux d'humidité équivalent à 60% et d'exposer nos aires de chasse à la lumière durant l'hiver.

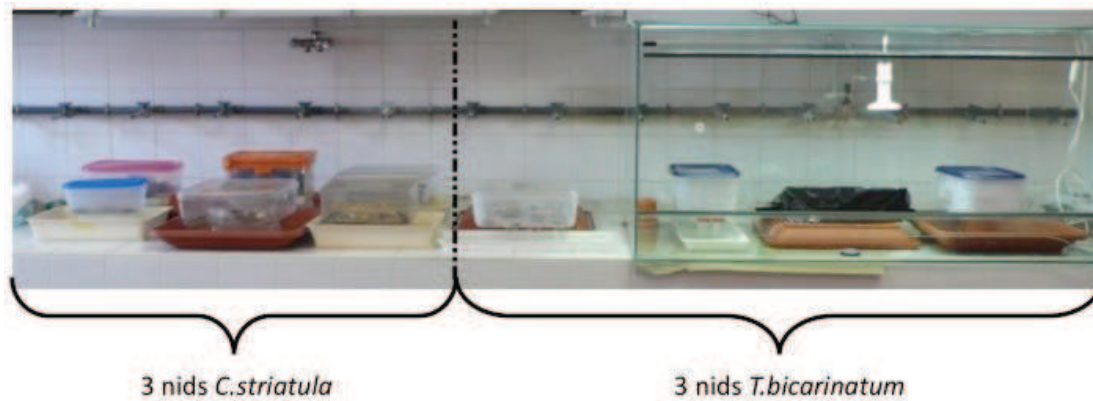


Figure 31: Vue d'ensemble de l'élevage de fourmis.

Les fourmis sont nourries *ad libitum* tous les deux jours et leur régime alimentaire est relativement varié :

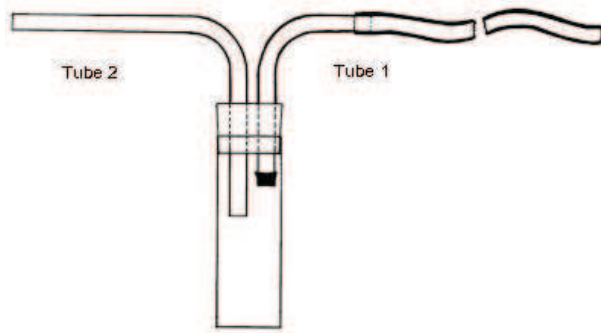
1. source de protéines (vers de farine, asticots)
2. source de sucre (solution de miel, morceaux de fruits juteux comme de la poire, de la pêche et de la pastèque)
3. eau (eau du robinet dans un tube à essai fermé par du coton)

Les carcasses de vers et autres résidus alimentaires sont éliminés régulièrement de l'aire de chasse afin de conserver un environnement sain pour les fourmis.

## Chapitre 2 : Extraction des venins

### 1 Glande à venin de *Tetramorium bicarinatum*.

Les fourmis sont prélevées dans l'aire de chasse à l'aide d'un aspirateur à insectes artisanal. Seules les ouvrières sont utilisées pour l'ensemble des travaux. Les jeunes adultes, reconnaissables par leur teinte plus claire sont préservées de toute capture.



**Figure 32 : Schéma d'un aspirateur à insectes.**

L'aspirateur à insectes est réalisé à partir d'un flacon de plastique fermé par un bouchon de liège. Deux tubes en plastique transparent, semi-rigide traversent le bouchon. L'extrémité du tube 1, située à l'intérieur du flacon, est recouverte d'une gaze à mailles très fines ; il se prolonge, à son autre extrémité, par un tuyau en caoutchouc. L'autre tube (2) est ouvert à ses deux extrémités. En plaçant l'extrémité du tube 2 près des fourmis et en aspirant de l'air avec la bouche par le tube 1, on crée une dépression qui fait entrer de l'air de l'extérieur vers l'intérieur. De cette façon les fourmis sont capturées sans dommages corporels.

Une fois capturées, les fourmis sont tuées rapidement par congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes. Cette méthode permet, non seulement, de conserver les fourmis en bon état mais aussi d'éviter tout stress et par conséquent toute effusion de sécrétions venimeuses.

L'extraction des glandes à venin se déroule sous une loupe binoculaire et dans de l'eau distillée. A l'aide de pinces à microdissection, l'aiguillon est tiré délicatement vers l'extérieur amenant ainsi le contenu abdominal : appareil vulnérant, estomac et système ovarien. Le réservoir à venin, surmonté par ses deux glandes, est soigneusement débarrassé des autres organes puis déposé dans un tube eppendorf de 1,5 mL contenant de l'eau distillée et maintenu dans de la glace tout au long de la dissection.

Après une sonication de 10 min, les réservoirs et les glandes à venin sont ensuite centrifugés à 13 000 g pendant 10 min afin de libérer leur contenu et d'éliminer tous les

débris tissulaires. Le surnageant est récolté puis évaporé à sec au moyen d'un évaporateur centrifuge (SpeedVac) : à 35°C pendant 2h. Le résidu obtenu est pesé puis solubilisé soit avec du PBS stérile soit avec de l'eau ultrapure selon le type d'expérience envisagée. Il est ensuite conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

## 2 Glande de Dufour de *Crematogaster striatula*

Le protocole d'extraction de la glande de Dufour de *Crematogaster striatula* diffère de celui décrit précédemment. En effet, contrairement au venin de *Tetramorium*, le contenu de la glande de Dufour, de nature lipidique, est insoluble dans l'eau. On ajoute 100 µL d'hexane dans le tube de récolte afin de rompre facilement les membranes et permettre ainsi la libération du contenu de la glande de Dufour. A la fin du prélèvement, le tube contient deux phases :

- la phase aqueuse (l'eau de dissection)
- la phase hexanique

L'échantillon subit une sonication et une centrifugation à 1000 g pendant 5 min. La phase hexanique contenant l'extrait de la glande de Dufour est récupérée et séchée sous flux d'azote. Le résidu huileux et de couleur jaune est pesé puis conservé à -20°C.

## Chapitre 3 : Détermination des activités biologiques des substances venimeuses

### 1 Etude comportementale des *Crematogaster striatula*

Le comportement des ouvrières *Crematogaster striatula* face à leur proie naturelle, les termites, et à d'autres espèces de fourmis a été étudié par l'équipe du Pr. Alain Dejean au sein de l'UMR « Ecologie des forêts de Guyane » au campus agronomique de Kourou, Guyane, France.

#### 1.1 La prédation

##### 1.1.1 Mise en place de la zone d'observation

Des bacs en plastiques de dimensions (80 x 40 cm) ont été disposés à une distance de 60 cm de l'entrée du nid de la colonie. Avant d'établir tout contact avec les espèces intruses et de procéder aux observations, les ouvrières *C. striatula* ont une semaine pour marquer et s'approprier ce nouvel espace.

##### 1.1.2 Observations

Les ouvrières *C. striatula* vont être confrontées à des termites de la classe des ouvriers et des soldats appartenant à l'espèce *Macrotermes bellicosus*. Le Tableau 15 renseigne sur la taille et le poids des sujets de l'étude.

	Fourmi	Termites	
	Ouvrière <i>C. striatula</i>	Ouvrier <i>M. bellicosus</i>	Soldat <i>M. bellicosus</i>
Longueur en mm	3 à 3,5	5 à 7,2	13
Poids en mg	1,2 ± 0,1	10 ± 0,4	21 ± 0,3
Nb d'individus	30	30	20

Tableau 15 : Evaluation de la taille et du poids des *C. striatula* et termites.

Lors du test, un individu termite est placé au centre de l'aire de chasse au niveau des bacs en plastique. Différentes phases du comportement sont prises en comptes :

- la détection de la proie
- la réaction qui suit la détection et les différentes postures d'alarme adoptées
- le recrutement de renfort
- les effets de l'attaque
- le rapatriement de la proie au nid

L'étude comprend deux périodes d'observations espacées de 30 minutes l'une de l'autre.

---

## 1.2 Contrôle d'une source de nourriture

---

La deuxième étape de l'étude comportementale consiste à confronter les *Crematogaster* à d'autres espèces de fourmis autour d'une source de nourriture qui se présente sous la forme de gouttes de miel.

Les différentes espèces rencontrées sont des ouvrières de *Camponotus brutus*, d'*Oecophylla longinoda* et de *Tetramorium aculeatum*.

## 2 Activité insecticide (*Crematogaster striatula*)

---

### 2.1 Test *in vivo* sur termites

---

Le résidu sec du liquide de Dufour de *C. striatula* est repris dans du dichlorométhane. Ainsi les différentes dilutions du contenu de Dufour à tester sont toutes réalisées avec ce solvant.

Chaque dilution est testée sur un groupe de dix termites appartenant à l'espèce *Reticulitermes grassei* (Rhinotermitidae), installés dans une boîte de petri tapissée de papier absorbant (papier filtre Whatman). Ce dernier est imbibé d'eau, afin de maintenir un taux correct d'humidité. Il faut compter deux boîtes de pétri (2 x 10 individus) pour chaque concentration en liquide de Dufour testée.

*Exemple de préparation de solution correspondant à 3 glandes/termite:*

Volume de solution déposé sur 1 termite = 0,5 µL

Nombre Total de termites / [Concentration] = 20

Volume Total de solution = 20 x 0,5 µL = 10 µL

Si la solution mère de liquide de Dufour comprend 200 glandes dans 100 µL de dichlorométhane, il faut prélever 30 µL pour obtenir l'équivalent de 60 glandes. Ces 30 µL seront ensuite séchés et repris dans 10 µL de dichlorométhane pour constituer la solution de concentration correspondant à 3 glandes/termite.

L'application du liquide de Dufour est réalisée sous binoculaire. Chaque termite est maintenu à l'aide d'une pince souple puis 0,5 µL de solution est appliqué à l'aide d'une microseringue de 100 µL sur l'abdomen de l'insecte (Figure 33).

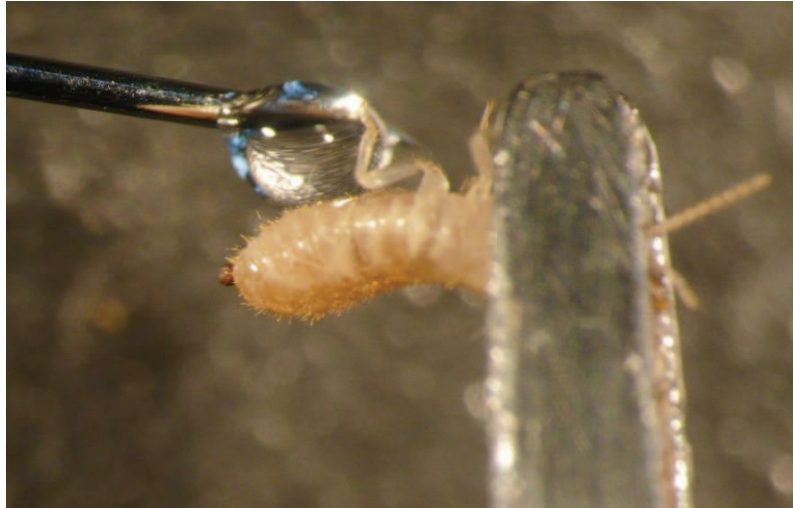


Figure 33 : Application locale des 0,5  $\mu$ L de solution de contenu de la glande de Dufour sur l'abdomen d'un termite.

L'état des termites est observé au cours du temps.

L'effet dose/temps du liquide de Dufour est quantifié selon trois critères :

- le nombre d'individus normaux (inspection de l'environnement et déplacements)
- le nombre d'individus paralysés (tremblements, incapacité à se déplacer mais réaction à des stimuli physiques)
- le nombre d'individus morts (aucune réaction même sous stimulation).

## 2.2 Statistiques

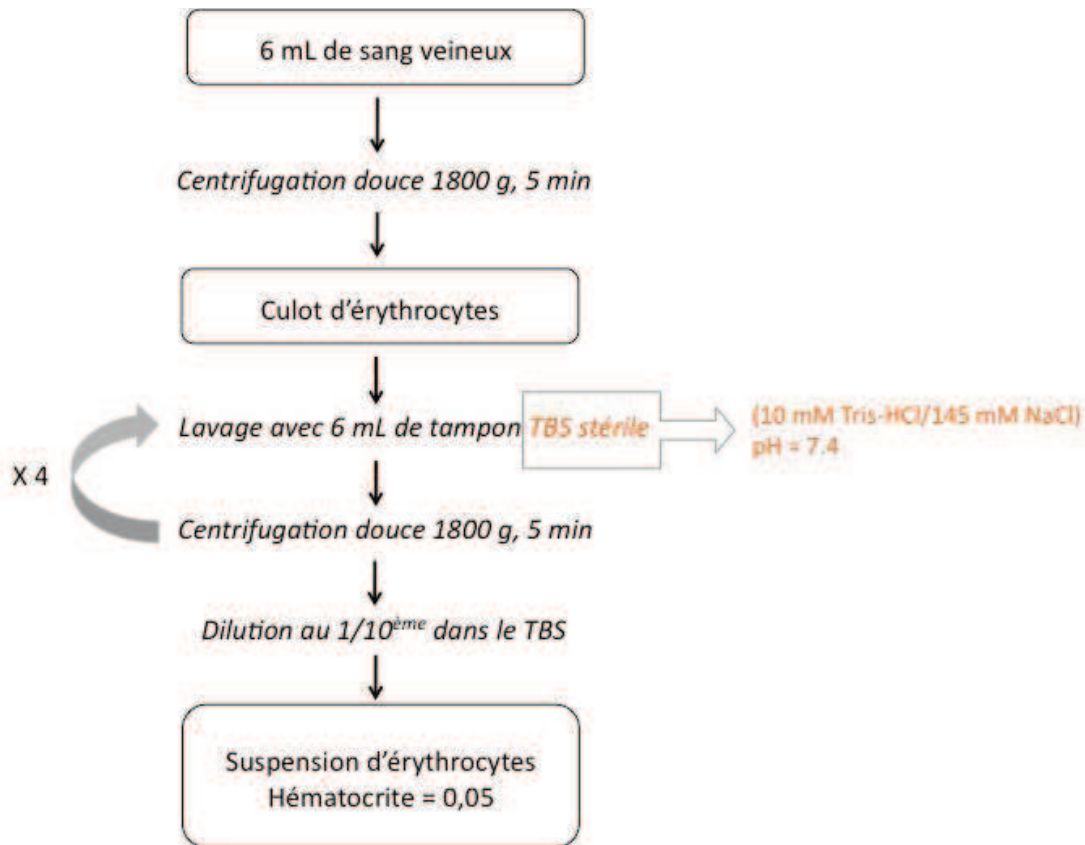
Pour ce type d'étude, nous avons utilisé le test de Friedman (équivalent « non-paramétrique » de l'ANOVA pour mesures répétées) suivi par un test *post-hoc* : le test de Wilcoxon avec ajustement de Bonferonni. L'ensemble des graphes a été construit à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 5.02) et les statistiques ont été réalisées avec le logiciel R.

## 3 Activité hémolytique du liquide de la glande de Dufour

L'activité hémolytique du contenu de la glande de Dufour a été uniquement étudiée sur *C. striatula*.

Des érythrocytes humains sont préparés dans une solution tampon (TBS, pH= 7,4) selon le protocole de la Figure 34:



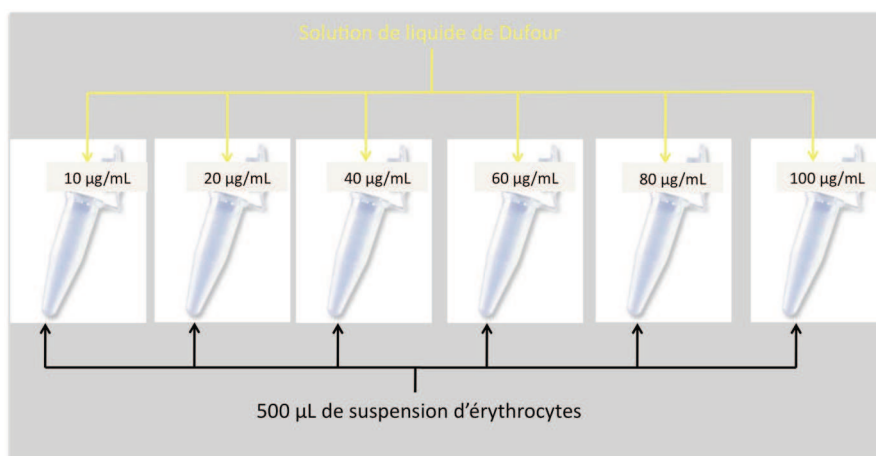


**Figure 34: Protocole de préparation des érythrocytes pour le test hémolytique.**

Un volume de 500  $\mu\text{L}$  de cette suspension est distribué dans chacun des tubes eppendorfs préparés pour le test (Figure 35).

Une solution de liquide de Dufour de 6,8 mg/mL est préparée dans du méthanol.

Le méthanol permet une dissolution totale des composés lipophiles de la glande de Dufour tout en préservant, à faible concentration, l'intégrité des hématies.



**Figure 35: Condition 1 du test hémolytique.**

Hématies en présence de différentes concentrations en solution de liquide de la glande de Dufour.



La suspension d'érythrocytes est incubée à 37°C en présence de différentes concentrations en solution de liquide de la glande de Dufour « SD » (10-20-40-60-80-100 µg/mL) à différents temps (0-0,5-1-2-4-6-8-24h).

Les autres conditions d'exposition sont citées dans le Tableau 16:

Condition 2		Condition 3		Condition 4		Condition 5	
SD en µg/mL		SD en µg/mL		SD en µg/mL		SD en µg/mL	
10	GSH 3mM	10	CaCl <sub>2</sub> 10mM	10	KCl 10mM	10	EDTA 10mM
20		20		20			
40		40		40			
60		60		60			
80		80		80			
100		100		100			
100		100		100			

Tableau 16: Tableau récapitulatif des différents paramètres du test hémolytique.

Chaque échantillon est dupliqué.

Pour chaque temps d'incubation, les érythrocytes sont centrifugés 5 min à 1800g et 100 µL de surnageant sont prélevés puis disposés sur microplaque.

La densité optique du surnageant est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Infinite200, Tecan) à une longueur d'onde de 450 nm.

L'utilisation de solutions ioniques en complément du liquide de la glande de Dufour a pour but d'observer une amplification ou non de l'action des toxines présentes dans la glande de Dufour de *Crematogaster* en présence de cations. En parallèle, nous avons réalisé les témoins associés :

- Témoin de lyse totale (hématies + H<sub>2</sub>O distillée)
- Témoin hématies + méthanol
- Témoin négatif (hématies + TBS)
- Témoin (hématies + GSH ; hématies + CaCl<sub>2</sub> ; hématies + KCl ; hématies + EDTA)

### 3.1 Statistiques

ANOVA à une voie avec le test de Beferonni.

## 4 Techniques de microbiologie (*Tetramorium bicarinatum*)

### 4.1 Souches bactériennes et conditions de culture

#### 4.1.1 Souches bactériennes

Les tests des premières phases de l'étude ont été réalisés sur des souches de microorganismes dites « de terrain » issues de prélèvements vétérinaires et fournies par l'équipe du Dr Duquesnel, directeur du Laboratoire Départemental d'Analyses (LDA) du Tarn. Ces souches sont listées dans le Tableau 17 :

Bactérie	Paroi
<i>Escherichia coli</i> K99	Gram -
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Gram +
<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram +

Tableau 17 : Liste des souches bactériennes fournies par le LDA d'Albi.

Des souches appartenant à la même famille mais référencées ont été gracieusement fournies par Virginy Châtain, microbiologiste de l'Ecole Nationale de Formation Agronomique (ENFA) de Toulouse.

Bactérie	Référence	lot
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 51329	756191
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 13932	-
	ATCC 19115	-
<i>Staphylococcus xylosus</i>	ATCC 35033	-
		797452
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC S9971	605427
	CIP 53156 (LLV)	-
	sauvage	-

Tableau 18 : Liste des souches bactériennes fournies par le laboratoire de microbiologie de l'ENFA.

Des tests microbiologiques ont été également effectués sur des mycobactéries telles que :

- *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
- *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155

---

La souche *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 (ATCC 700084) est un mutant de *M. smegmatis* ATCC 607 fourni par le Dr Constant (Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (IPBS), Toulouse)

Concernant la souche *M. tuberculosis*, les essais ont été réalisés dans le laboratoire de haute sécurité de type P3 du même institut.

L'ensemble des souches décrites ci-dessus sont anaérobies facultatives.

#### 4.1.2 Milieux de cultures

- culture des staphylocoques

Les *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus xylosus* ont été cultivés, dans un premier temps, sur gélose de Baird-Parker pour leur identification et leur isolement. Les souches sont ensuite inoculées dans du bouillon Tryptone soja (VWR) à 37°C. Les cultures liquides de staphylocoques sont réalisées en erlenmeyer de 250 mL contenant 25 mL de tryptone soja.

- culture de *Listeria*

L'identification des *Listeria monocytogenes* est réalisée sur gélose ALOA®, milieu spécifique à toutes les espèces de *Listeria*. Les colonies de *L. monocytogenes* présentent une coloration bleu-vert avec un halo contrairement aux autres espèces de *Listeria* qui ne présentent pas de halo. L'isolement sur gélose pour amorcer les cultures en milieu liquide se fait en milieu tryptone-soja agar.

- culture des mycobactéries

*Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 est cultivée en milieu liquide Middlebrook 7H9 (Difco) à 37°C pendant 3 jours. La croissance de cette culture se fait sans agitation afin d'obtenir une culture dite « en voile ». Ce voile sera ensuite rompu à l'aide de microbilles en verre, stériles de 4 mm de diamètre, pour l'ensemencement sur microplaque.

- culture des *Escherichia coli*

Les différentes souches d'*E. coli* sont cultivées en milieu LB (VWR) sous agitation à 37°C. Les cultures liquides des *E. coli* sont réalisées en erlenmeyer de 250 mL contenant 25 mL de milieu LB.

---

## 4.2 Contrôle des souches de terrain

---

### 4.2.1 Identification des Staphylocoques à coagulase positive

Afin de déterminer si les staphylocoques de terrain sont lécithinase, lipo-protéinase et coagulase positives, des isolements sur des géloses de Baird-Parker avec ajout de plasma de lapin et fibrinogène (RPF = Rabbit Plasma Fibrinogen) ont été réalisés. La pathogénicité des staphylocoques est basée sur la production de coagulase libre, le milieu Baird-Parker RPF a donc été mis au point pour détecter la présence de cette enzyme.

Le principe de ce milieu sélectif réside dans la capacité des staphylocoques lécithinase, lipoprotéinase et coagulase positive à métaboliser les différents constituants de ce milieu.

La présence de tellurite de potassium dans ce milieu favorise l'inhibition de la microflore contaminante à Gram + et induit une coloration noire aux colonies de Staphylocoques suite à la réduction du tellurite de potassium en tellure.

Le plasma de lapin, ajouté au milieu, est un excellent substrat pour la coagulase staphylococcique, il en résulte la formation d'une staphylothrombine à partir de la prothrombine. Le plasma de lapin est supplémenté en fibrinogène bovin. En présence de fibrinogène, la staphylothrombine des bactéries coupe les fibrinopeptides A et B de ce dernier, provoquant ainsi l'apparition de fibrine autour des colonies.

---

## 4.3 Application du test MTT comme test d'inhibition de croissance bactérienne

---

La sensibilité de l'ensemble des souches au venin brut ainsi qu'aux peptides synthétisés a été évaluée en mesurant les effets d'une gamme de concentrations croissantes de ces substances sur la croissance bactérienne. Pour cela, un test colorimétrique de cytotoxicité a été utilisé: le test MTT. Ce test est basé sur la réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium de couleur jaune (MTT, Sigma Aldrich) en cristaux de formazan (bleu) par les cellules métaboliquement actives.

Dans une plaque 96 puits, des dilutions sériées de venin brut ou de peptides synthétisés sont réalisées dans 100  $\mu\text{L}$  de milieu de culture. Un inoculum de 50  $\mu\text{L}$  de la bactérie étudiée, dilué à une  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$  de 0,002 dans du milieu de culture, est incorporé dans chaque puit. Dans le cas de *M. smegmatis* et *M. tuberculosis*, l'inoculum bactérien est introduit à une  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$  de 0,02. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 3h, 24h pour *M. smegmatis* et six jours pour *M. tuberculosis*. Le réactif MTT, préalablement

---

préparé dans du PBS stérile à une concentration de 1 mg/mL, est ajouté à raison de 50 µL dans chaque puit et les plaques sont à nouveau incubées à 37°C (1h voire plus : 24 h pour *M. tuberculosis*). Du tampon de solubilisation (mélange de diméthylformamide et de SDS 20% (p/v), 1 :2) est ajouté pour dissoudre les cristaux de formazan formés. La densité optique est mesurée à 570 nm à l'aide du spectrophotomètre Infinite 200 (Tecan, Autriche). Les cultures, traitées en parallèle avec un cocktail d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine) et éthambutol, sont utilisées comme témoins positifs.

La mellitine est également utilisée comme témoin positif lors de l'évaluation de l'activité antibactérienne des peptides synthétiques.

La détermination des concentrations d'inhibition de 50% de la population bactérienne est effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 5.02).

## Chapitre 4 : Techniques analytiques de biochimie et de chimie

Ce quatrième chapitre présente les différentes techniques de biochimie et de chimie utilisées lors des travaux.

### 1 Etude du contenu de la glande de Dufour de *Crematogaster striatula*

#### 1.1 Analyse GC-MS

100 glandes ont été préparées dans 100  $\mu$ L d'hexane afin de constituer un lot homogène utilisé pour l'ensemble des analyses GC/MS.

Les analyses ont été conduites par chromatographie en phase gazeuse (CG) à l'aide du chromatographe Trace GC 2000 couplé à une trappe ionique (ion trap Polaris Q, Thermo-Finnigan, Courtaboeuf, France) illustrée par la Figure 36.

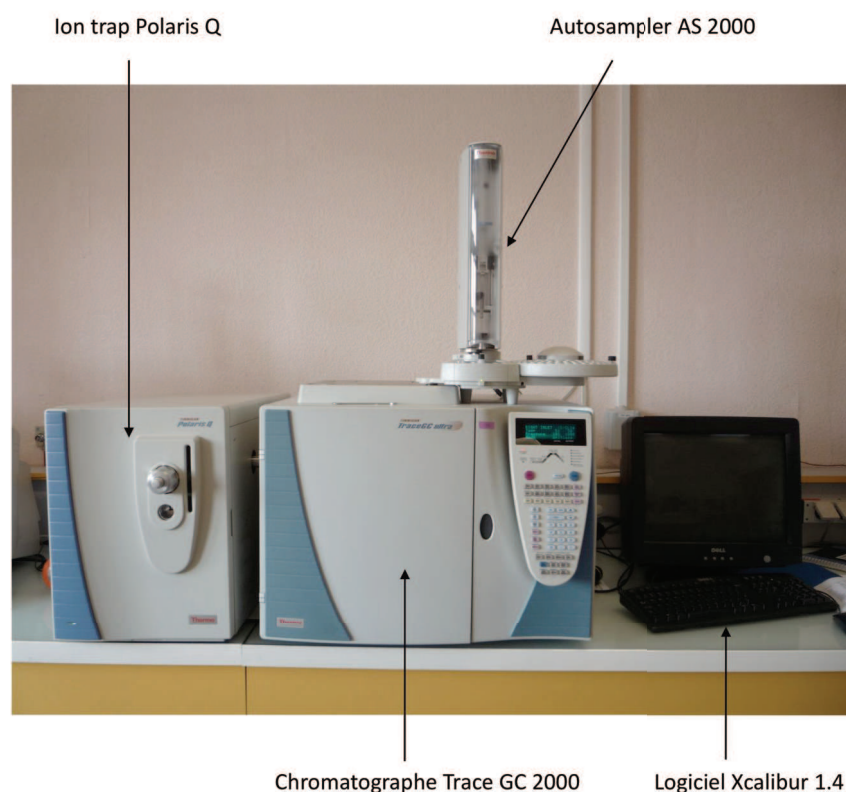


Figure 36: GC/MS du laboratoire Venin et Activités Biologiques (VacBio).

Références et conditions d'analyse du contenu de la glande de Dufour par GC-MS :

### Au niveau de l'injection

- ⇒ solvant d'injection : hexane
- ⇒ volume injecté : 1  $\mu$ L
- ⇒ conditions d'injection : mode splitless
- ⇒ température de l'injecteur : 280°C

### La séparation

- ⇒ colonne capillaire : RTX5-MS (5% diphenyl: 95% dimethylpolysiloxane) de dimensions 30 m L  $\times$  0,25 mm  $\varnothing$ i et 0,25  $\mu$ m d'épaisseur de film de la marque RESTEK
- ⇒ gaz vecteur : hélium (alphagaz 2; Air Liquide, Labège, France)
- ⇒ débit de gaz vecteur : 1 mL/min
- ⇒ gradient de température : 120°C ; montée à 280°C (rampe de 5°C.min<sup>-1</sup>), isotherme 5 min

### Conditions source

2 modes d'ionisation, l'impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC).

En EI :

- ⇒ température de la source = 220°C
- ⇒ température de la ligne de transfert = 200°C
- ⇒ énergie d'ionisation = 70 eV

En CI :

- ⇒ température de la source = 180°C
- ⇒ température de la ligne de transfert = 200°C
- ⇒ énergie d'ionisation = 120 eV
- ⇒ gaz réactant et débit : ammoniac ou méthane, 1,2 mL/min

### Acquisition

Démarrage de l'acquisition 4 min après injection.

Mode « Full scan », balayage entre les masses m/z 60 et 500.

## 1.2 Analyse par LC-ESI-MS

Le contenu de 30 glandes de Dufour a été dilué dans 200  $\mu\text{L}$  de méthanol puis analysé à l'aide du système HPLC (Surveyor, ThermoFinnigan) couplé à un spectromètre de masse équipé d'une trappe ionique LCQ Advantage (ThermoFinnigan, Courtaboeuf, France) (Figure 37).

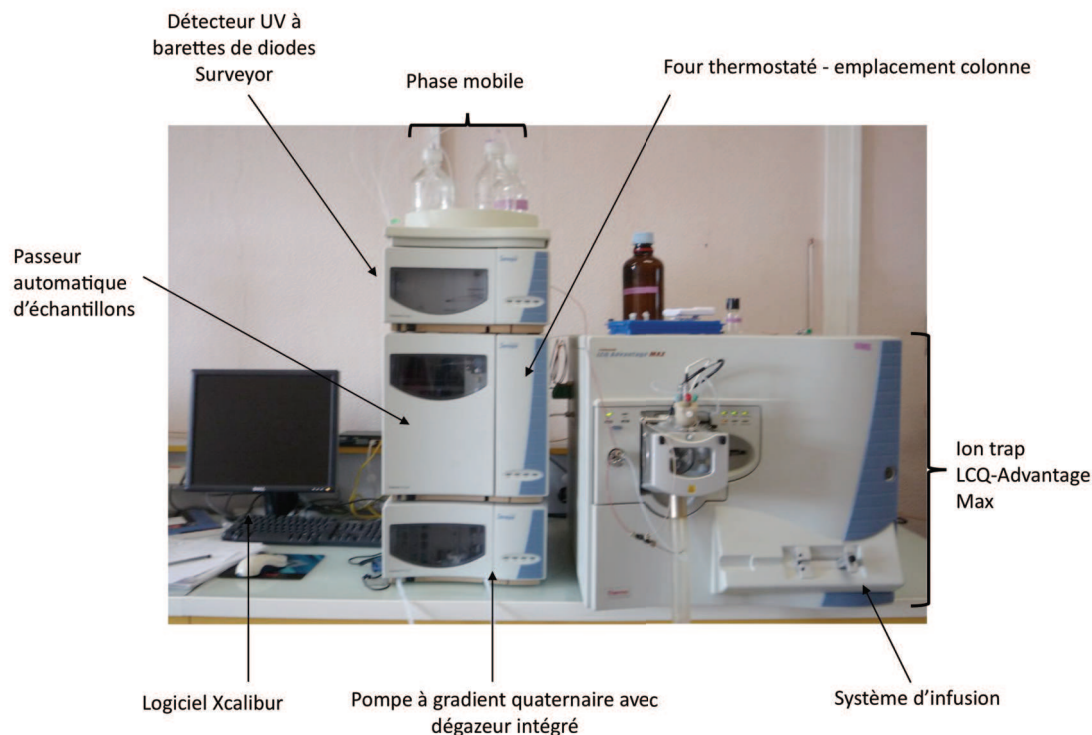


Figure 37: Système LC-ESI-MS du laboratoire Venin et Activités Biologiques (VacBio).

Le spectromètre de masse a été calibré à partir d'un mélange contenant de la caféine, du MRFA et de l'Ultramark 1621 dans de l'acétonitrile/méthanol/eau + 0,1% acide acétique selon le protocole du fabricant.

Nom	Charge (n)	$(M+nH)n^+$ mono isotopique
Caféine	+1	195
MRFA	+1	524.3
Ultramark 1621	+1	1621.9

### Conditions d'acquisition :

⇒ solvant d'injection : méthanol

⇒ volume d'injection : 20  $\mu\text{L}$



- colonne Luna2 C18 (150 X 2 mm, 5  $\mu$ m) Phenomenex
- débit = 200  $\mu$ L/min
- élution isocratique: 100% acétonitrile + 0,1% HCOOH pendant 60 min
- ⇒ mode d'ionisation : électrospray en mode positif (ESI (+))
- ⇒ tension du capillaire = 4 kV
- ⇒ gaz de nébulisation et gaz auxiliaire : azote avec une pression respective de 50 et 5 psi

L'acquisition MS/MS est effectuée en mode automatique « data dépendent » ce qui signifie qu'en fonction du spectre de masse obtenu, le logiciel sélectionne automatiquement les pics dont l'intensité répond à des critères prédéfinis. Ces ions sont ensuite soumis à une analyse MS/MS.

## 2 Etude du venin de *Tetramorium bicarinatum*

L'étude du venin de *Tetramorium bicarinatum* représente une majeure partie du travail de thèse (voir le schéma expérimental Figure 29).

### 2.1 Recherche de protéines par électrophorèse SDS-PAGE

#### 2.1.1 Précipitation des protéines au TCA

Un volume d'acide trichloroacétique 100% (w/v) est ajouté à la solution de venin brut pour obtenir une concentration finale de 25% (v/v). Le mélange est incubé dans la glace pendant 20 min. puis centrifugé 5 min. à 13 000 g. Une fois le surnageant éliminé, ce culot est lavé deux fois à l'acétone glacée. Ce dernier est ensuite séché à l'évaporateur centrifuge (SpeedVac) puis analysé par SDS-PAGE et par LC/MS.

#### 2.1.2 Electrophorèse SDS-PAGE

##### ⇒ Analyse sur gel Tris-Tricine.

Le culot protéique ci-dessus et le résidu sec de venin brut sont repris dans du tampon échantillon Tricine (Tris-HCl 200 mM, pH = 6,8 ; SDS 2% (v/v) ; glycérol 40% (v/v) ; 0,04% Bleu de Coomassie G-250). Le  $\beta$ -mercaptoéthanol est ajouté au tampon pour obtenir une concentration finale de 2% (v/v). Les échantillons sont ensuite dénaturés par un chauffage de 5 min. à 95°C. Le  $\beta$ -mercaptoéthanol réduit les ponts disulfure entre les cystéines, alors que le SDS rompt les interactions inter et intra protéiques en chargeant les protéines négativement. De ce fait, leur charge propre devient négligeable

et la séparation s'effectue sur la différence de poids moléculaire. Les fractions dénaturées sont ensuite déposées sur un gel de polyacrylamide 16% pour la séparation de polypeptides entre 1 et 30 KDa. Les compositions du gel de séparation et du gel de concentration sont données dans le Tableau 19:

	<b>Gel de séparation 16% (pH 8,8)</b>	<b>Gel de concentration 5% (pH 6,8)</b>
Acrylamide/bis acrylamide (30%)	2,65 mL	340 µL
H <sub>2</sub> O	1,2 mL	1,4 mL
Tris (1,5M) pH 8,8	1,3 mL	-
Tris (0,5M) pH 6,8	-	250 µL
SDS 20%	25 µL	10 µL
TEMED	2 µL	2 µL
APS 10%	50 µL	20 µL
<b>Volume total</b>	<b>5,23 mL</b>	<b>2,02 mL</b>

**Tableau 19 : Compositions du gel de séparation et du gel de concentration.**

Le gel préparé a pour dimension : L 9 cm x l 10cm et une épaisseur de 0,75 mm. Le gel de séparation à 16% est surmonté du gel de concentration à 5%. Ce système est discontinu dans la composition du tampon et du pH ce qui permet, dans un premier temps, de concentrer l'échantillon dans la zone du gel de concentration avant d'être séparé dans le gel de séparation présentant une plus faible porosité.

Les protéines et peptides chargés par le SDS, migrent dans le gel sous un voltage constant de 200 volts pendant 45 min. dans le tampon de migration Tris/Tricine/SDS 1X. Les marqueurs de poids moléculaire utilisés sont, pour le premier, un « cocktail » de polypeptides standard de la marque Bio-rad allant de 1,42 à 26,62 KDa et pour le second, un mélange de protéines de masse moléculaire allant de 2kDa à 250 kDa.

Après migration, le gel est rincé 3 fois à l'eau distillée pendant 5 min. puis coloré pendant 1h dans une solution de bleu de Coomassie. La décoloration du gel s'effectue dans un bain de méthanol (40%, v/v) et d'acide acétique (10%, v/v) pendant 30 min.

## 2.2 Fractionnement du venin

Afin d'isoler et d'identifier la ou les molécules responsables de l'activité du venin de *Tetramorium bicarinatum*, il a fallu procéder à son fractionnement progressif.

### 2.2.1 Le Système AMICON®

La première étape a consisté à utiliser des filtres AMICON® (millipore, France) pour trier grossièrement les différents composés du venin selon leur poids moléculaire et les concentrer au maximum.

Ainsi le venin brut a été fractionné en trois lots à l'aide de deux types de filtres à centrifuger présentant des cut-off différents (poids moléculaire maximal au dessus duquel une membrane ne se laisse pas traverser). Les filtres utilisés possèdent des cut-off de 10 kDa et de 3 kDa. Le protocole expérimental est schématisé dans la Figure 38 :

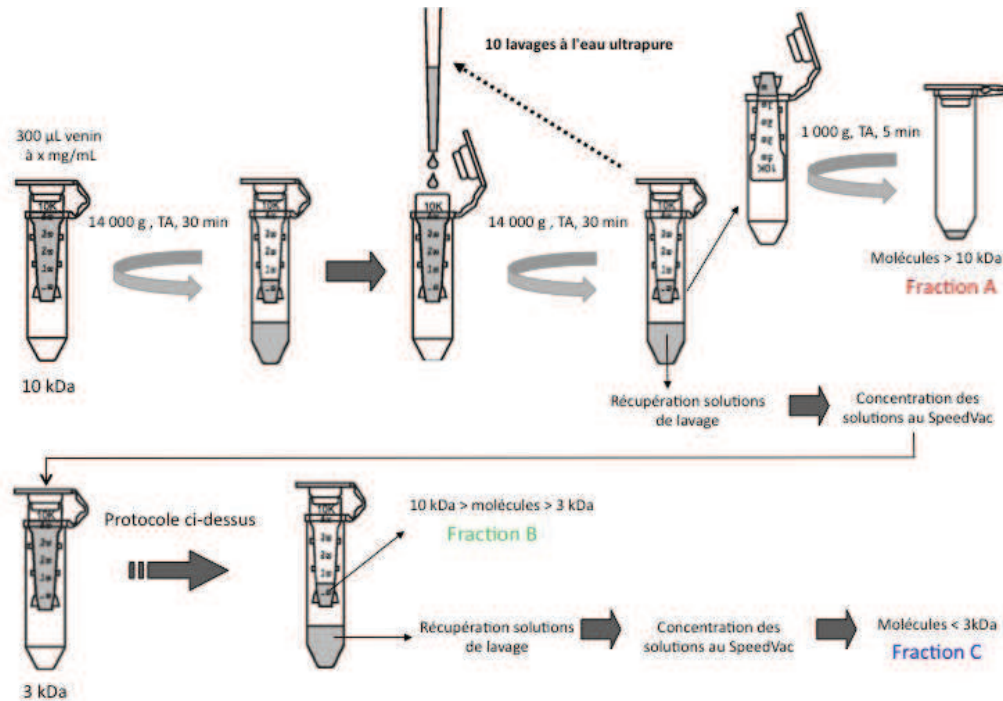


Figure 38: Obtention des trois fractions peptidiques.

En résumé, la solution de venin brut est versée dans un premier filtre à centrifuger d'un cut-off élevé (10 kDa). Après une série de lavages à l'eau ultrapure et de centrifugations, le liquide résiduel dans le filtre, intitulé « Fraction A » est stocké. Cette fraction contient les molécules du venin ayant un poids moléculaire supérieur à 10 kDa. La solution de lavages issue de cette étape est concentrée au Speedvac puis versée dans le second filtre possédant un cut-off plus faible (3 kDa). On réalise également une série de lavages et de centrifugations après lesquelles le résidu obtenu constitue la « Fraction B » contenant les molécules de poids intermédiaire, inférieur à 10 kDa et supérieur à 3 kDa. La solution de lavages est évaporée à sec au Speedvac et reprise dans de l'eau ultrapure. Cette dernière fraction, la « Fraction C », contient toutes les petites molécules (< 3 kDa) du venin brut. Ces trois fractions seront analysées en LC-MS puis testées sur les deux staphylocoques de terrain.

### 2.2.2 Fractionnement par RP-HPLC

L'appareil de chromatographie liquide haute performance (HPLC, Finnigan™SpectraSYSTEM™) est équipé d'une colonne Luna2 C18 de dimensions 150 x 4,60 mm, 5 µm (Phenomenex). La Fraction C, issue du tamisage à L'AMICON®, est injectée dans une boucle d'injection de 100 µL (conditions préparatives). La phase éluante est composée d'eau acidifiée au TFA 0,1% (solvant A) et d'un mélange eau/acétonitrile acidifiée au TFA 0,1% (solvant B). La séparation des composés de cette fraction est réalisée avec le gradient linéaire d'éluion suivant : passage de 10% à 80% de solvant B en 45 minutes. Le débit appliqué est de 1 mL/min.

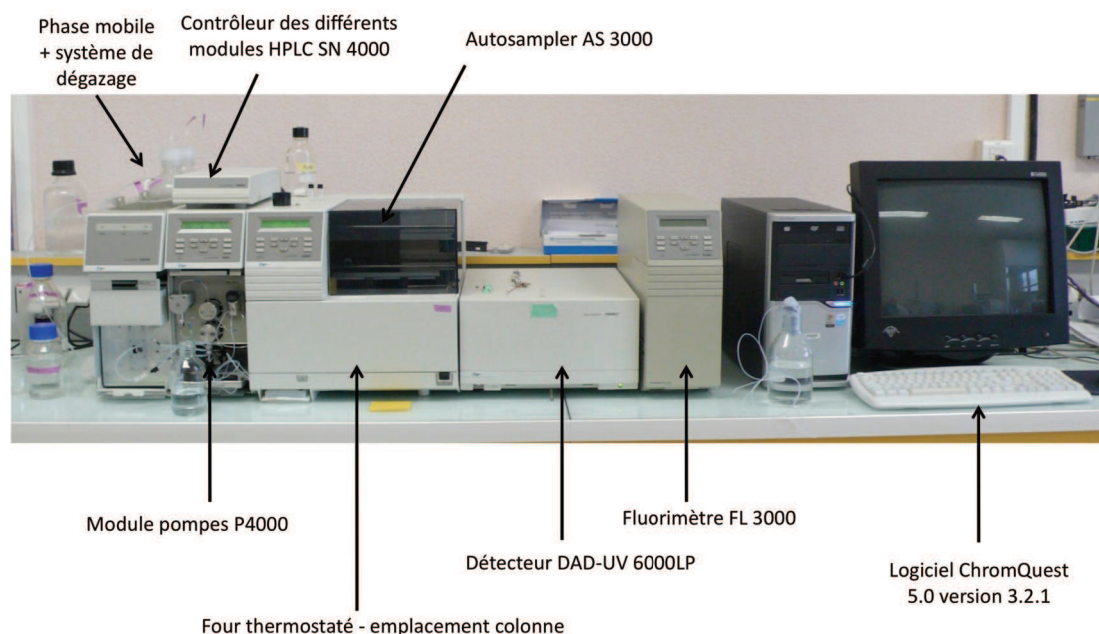


Figure 39 : Chaîne HPLC SpectraSYSTEM (ThermoFinnigan).

L'HPLC est munie d'un détecteur UV à barrette de diodes (DAD-UV 6000LP, ThermoFinnigan, Courtaboeuf, France) balayant des longueurs d'ondes comprises entre 200 et 300 nm. Sur la base d'un premier chromatogramme, nous avons récolté les sous fractions pic par pic correspondant à chaque signal UV ou toutes les deux minutes en cas d'absence de signal. Les différentes sous fractions obtenues ont été concentrées au Speedvac pour être ensuite testées sur les différentes souches bactériennes.

### 2.2.3 Analyse par LC-ESI-MS

A partir de la même colonne, un fractionnement est réalisé sur le système LC-ESI-MS vu précédemment.

---

Avec une élution à 1 mL/min, un système de division sous la forme d'un « T » a permis d'injecter 200 µL/min dans le spectromètre de masse et de récupérer et fractionner les 800 µL issus de la dérivation. Seule l'acidification des phases mobiles diffère : l'acide formique à 0,1% (v/v) est utilisé en remplacement du TFA.

---

## 2.3 Séquençage *de novo* des peptides isolés

---

### 2.3.1 Analyse MS/MS sur l'ion trap LCQ Advantage

La fraction d'intérêt est reprise dans un mélange eau-acétonitrile acidifié par de l'acide formique 0,1% (v/v) puis directement introduite par infusion dans la source d'ionisation du spectromètre de masse avec un débit de 5 µL/min. L'ionisation des composés est réalisée par électrospray en mode positif, les paramètres de la source sont les mêmes que ceux exposés précédemment pour les analyses en LC/MS. Après isolement, les ions précurseurs subissent une fragmentation MS/MS sous une énergie de collision optimisée à 35%.

L'interprétation des spectres MS<sup>2</sup>, la recherche des fragments caractéristiques « y » et « b » ainsi que la reconstitution de la séquence peptidique ont été menés manuellement.

### 2.3.2 Analyse MS/MS sur LTQ-Orbitrap Velos

Un échantillon de venin brut équivalent à 200 réservoirs à venin a été directement injecté au sein du LTQ-Orbitrap Velos sous un débit de 5 µL/min.

Les composés sont ionisés par électrospray en mode positif et les conditions source sont :

- capillaire : 4 kV
- une température : 275°C
- gaz de nébulisation : 20 psi.

La résolution maximale de cet appareil est supérieure à 100 000 à la masse m/z 400.

La fragmentation des ions précurseurs est réalisée avec une énergie de collision HCD (Higher energy Collisional Dissociation) de 25%. Le mode de fragmentation HCD est une méthode alternative sur le LTQ-Orbitrap en complément de la CID classique dans la trappe à ion linéaire. Il présente les avantages suivants :

- Aucun cut-off au niveau des basses masses ce qui permet d'obtenir une fragmentation, sans perte des fragments de basses masses, sensible et reproductible. Possibilité de visualiser les ions immonium.

- Second mode de fragmentation disponible en plus de la fragmentation résonnante utilisée dans le LTQ.

## Chapitre 5 : Synthèse des peptides en phase solide

### 1 Principe de la synthèse peptidique sur support solide

Cette technique, mise au point dans les années 60 grâce aux travaux de Robert Bruce Merrifield (Prix Nobel en 1984), a permis de produire des peptides en grande quantité répondant ainsi aux besoins croissants des études pharmacologiques. Le principe de cette technique réside dans l'utilisation d'une résine, insoluble dans la plupart des solvants, sur laquelle est greffé, un premier acide aminé qui sera greffé, à son tour, par les différents acides aminés qui composent le peptide à synthétiser. Contrairement à la synthèse ribosomique, la synthèse en phase solide s'effectue à partir de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. Les différentes étapes de synthèse sont schématisées dans la Figure 40.

Dans la stratégie dite « Fmoc », la fonction  $-NH_2$  de l'acide aminé C-terminal fixé à la résine est protégée par un groupement Fmoc (N-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)). Cette protection du groupe amino doit être à la fois facile à enlever pour la création de la liaison peptidique et suffisamment stable pour subir les conditions des autres réactions. Le groupement protecteur Fmoc, labile dans des conditions basiques douces, est éliminé à l'aide d'un court traitement avec 20% de pipéridine dans du diméthylformamide (DMF). Pour le couplage du second acide aminé sur l'acide aminé fixé, la fonction carboxy de l'acide aminé à introduire est activée pour faciliter la réaction d'amidation. Cette activation est rendue possible par l'utilisation de réactifs de couplage (TBTU ou HBTU). Lors de cette étape l'acide aminé additionné est introduit en excès ce qui implique un excès de réactif pour assurer une diffusion efficace. Après le couplage, l'excès de réactif est éliminé par une série de lavages puis les groupements protecteurs de l'extrémité N-terminale du dipeptide sont éliminés à leur tour, afin de permettre le greffage d'un troisième acide aminé. Ce processus sera répété jusqu'à obtention de la séquence peptidique désirée. L'acide trifluoroacétique (TFA) concentré est utilisé pour cliver le peptide formé, de la résine et pour éliminer les groupements protecteurs des chaînes latérales.



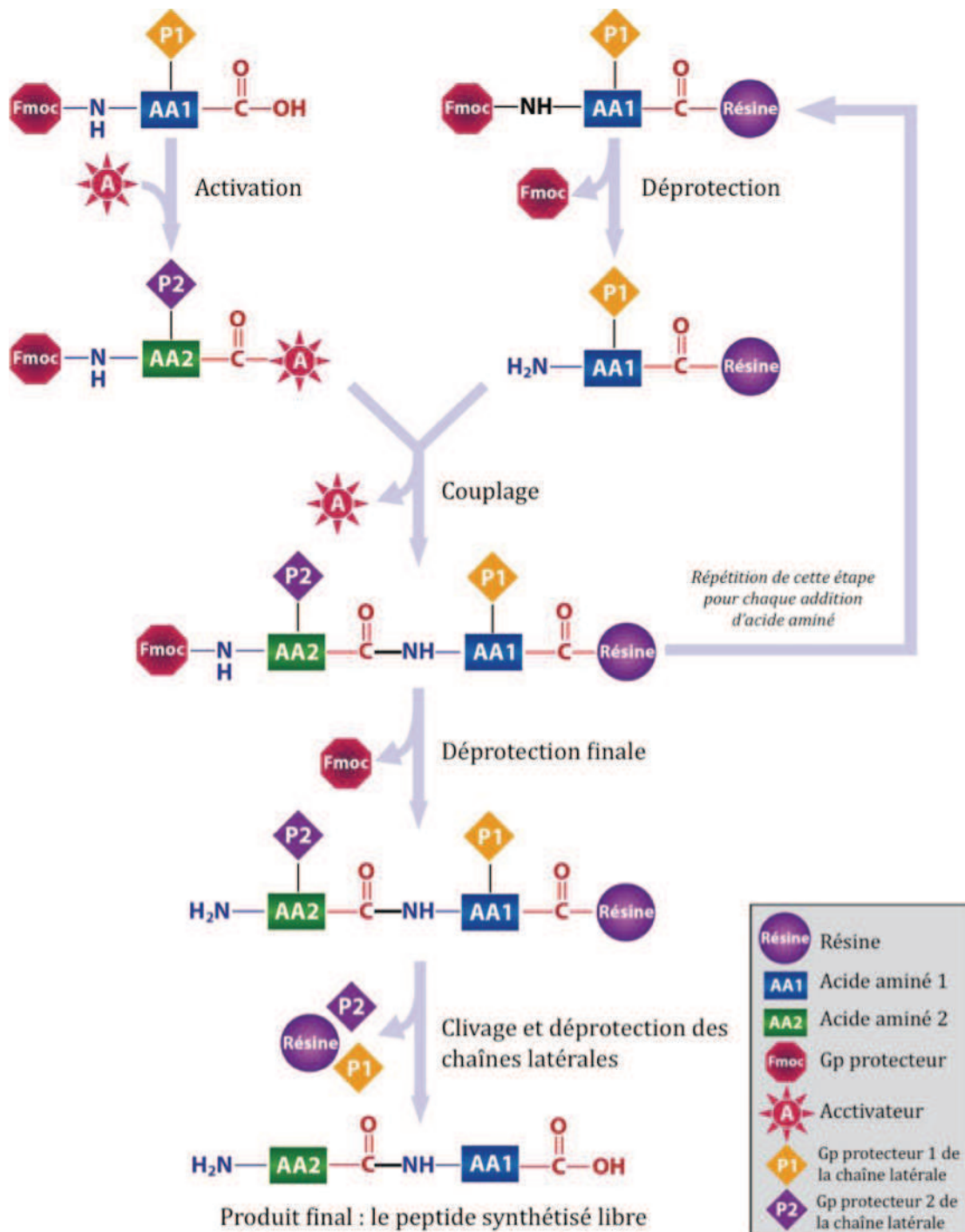


Figure 40 : Schéma général de synthèse de peptides (stratégie Fmoc). Schéma issu et traduit du site de Sigma-Aldrich.

## 2 Protocole expérimental

Les peptides du venin de *T. bicarinatum* ont été synthétisés, dans le cadre d'une collaboration, à l'Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides



(IFRMP 23) de l'Université de Rouen (Mont-Saint-Aignan) sous la direction du Dr Jérôme Leprince.

La synthèse des peptides « LFKEILEKIKAKL » et « KIKIPWGKVKDFLVGGMKAV », sous leur forme C-terminale libre et amidée, a été effectuée à l'aide d'un synthétiseur automatique à micro-ondes Liberty (CEM, Saclay, France) selon le schéma général décrit précédemment. (Figure 41).

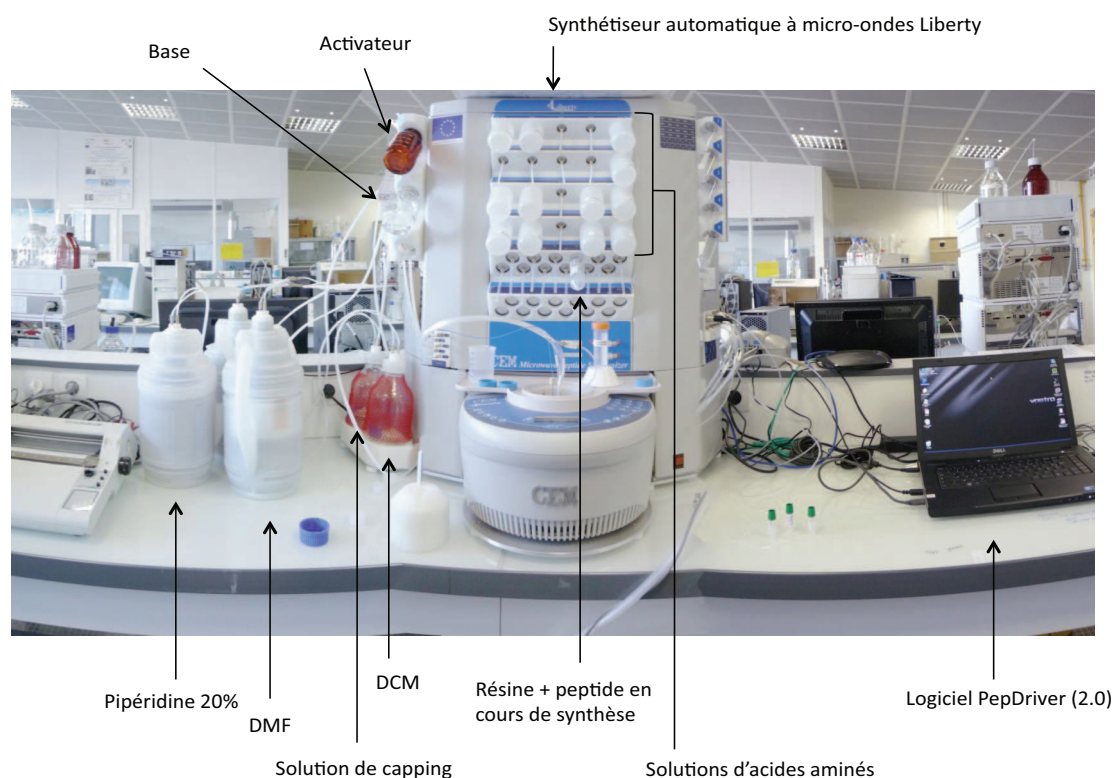


Figure 41 : Vue du synthétiseur automatique à micro-ondes Liberty.

Les résines utilisées pour la synthèse des peptides sous leur forme libre et amidée diffèrent :

- pour produire les peptides possédant une extrémité C-terminale libre nous avons utilisé une résine HMP (4 hydroxymethylphenoxyethyl-copolystyrène 1% divinylbenzène).
- Pour la production de peptides amidés en position C-terminal, nous avons utilisé une résine Rink-amide MBHA (4-méthylbenzhydramine).

Les étapes qui suivent sont identiques pour les deux types de peptides synthétisés.

Une fois la synthèse peptidique terminée, le produit final (peptide + résine) est filtré sous pression réduite. Le résidu est ensuite rincé avec une solution de NMP (N-méthyl-2-pyrrolidone) et de DCM (Dichlorométhane). Après un dernier lavage au dichlorométhane, le complexe résine-peptide est séché 10 minutes sous vide, puis 20 min à température ambiante sous une sorbonne. Une fois sec, ce dernier est pesé puis stocké dans un cryovial. Pour des raisons de conservation et de stockage, seule la moitié du complexe subira l'étape de clivage, l'autre moitié restant disponible pour une utilisation future.

## 2.1 Etape de clivage

Elle est réalisée sous agitation, dans un ballon d'évaporation avec une solution de TFA et 2,5% de TIS (Triisopropylsilane). La solution peptidique, libérée de la résine, est récupérée par filtration. Elle subit ensuite une extraction liquide-liquide au TBME (Tert-butylmethylether) et une série de centrifugations pour donner le « brut de clivage » (BDC) qui n'est autre que le peptide non purifié.

## 2.2 Purification

La purification du BDC est effectuée sur une chaîne HPLC Gilson, sur une colonne semi préparative Vydac™ C18 218TP1022 (2,2 x 25 cm). La phase mobile est constituée d'eau-TFA 0,1% (v/v) (solvant A) et d'acétonitrile-TFA 0,1% (v/v) (solvant B).



Figure 42 : Appareil modulaire HPLC Gilson

## 2.3 Analyses

L'analyse des différents BDC, l'identification des peptides obtenus et l'évaluation de leur pureté se fait par chromatographie liquide haute performance et par spectrométrie de masse.

### 2.3.1 Analyse par RP-HPLC

L'analyse des peptides « LFKEILEKIKAKL » et « KIKIPWGKVKDFLVGGMKAV » et de leurs formes C-terminales amidées est effectuée sur une colonne Vydac™ C18 218TP54 (0,46 x 25 cm). Les peptides sont élués par un gradient d'eau-TFA 0,1% (v/v) (A) et d'acétonitrile (B) (de 10 % à 60% de B en 25 min), avec un débit de 1mL/min et une détection par absorbance à 215 et 280 nm.

### 2.3.2 Analyse par Spectrométrie de masse

La masse de chaque peptide synthétisé a été contrôlée à l'aide d'un spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Figure 43).

La matrice MALDI est de l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique à 10 mg/mL. Les peptides sont dilués dans un mélange 50/50 (H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA / CH<sub>3</sub>CN + 0,1% TFA). On ajoute 1  $\mu$ L de la solution peptidique sur la cible MALDI puis 1  $\mu$ L de matrice, le mélange est ensuite séché 3 min à température ambiante.



Figure 43 : Spectromètre MALDI-TOF Voyager DE-PRO (Applied Biosystems™).

Le spectromètre est piloté par le logiciel Voyager Control Panel (version 5.1).

La calibration du spectromètre est réalisée à partir d'un mélange dont la composition est donnée dans le Tableau 20:

Nom	Charge (n)	(M+nH) <sup>n+</sup> moyenne	(M+nH) <sup>n+</sup> mono isotopique
Des-Arg <sup>1</sup> -Bradykinine	+1	905,05	904,4681
Angiotensine I	+1	1297,51	1296,6853
Glu1-Fibrinopeptide B	+1	1571,61	1570,6774
Neurotensine	+1	1673,96	1672,9175

Tableau 20: Molécules entrant dans la composition du calibrant MALDI-TOF.

Une fois les contrôles de pureté effectués, les solutions de peptides sont lyophilisées pendant 2 jours.

Les micro-pesées, nécessaires pour les tests ultérieurs, ont été effectuées à l'aide d'une microbalance à haute précision.

## Chapitre 6 : Etudes de dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (DC) est une méthode d'analyse de composés optiquement actifs possédant un ou plusieurs chromophores, capables d'absorber de façon inégale la lumière polarisée circulairement à droite de la lumière polarisée circulairement à gauche.

### 1 Protocole expérimental

Les analyses de DC ont été menées au sein de l'équipe « Analyse et Modélisation » de l'UMR 6014 CNRS à l'Institut de Recherche en Chimie Organique Fine (IRCOF, Rouen) sous la direction de Laure Guilhaudis (MCF).

Le laboratoire dispose d'un dichrographe de type CD6 (Jobin-Yvon, France) avec une cellule en quartz de parcours optique égal à 0,5 mm (Figure 44).



Figure 44 : (A) Dichrographe CD6 Jobin-Yvon et sa cellule en quartz. (B) vue de face et profil (C).

Préparation des solutions peptidiques dans les différents tampons :



---

Pour les analyses, la concentration en peptide au sein de la cellule en quartz doit être de l'ordre de 0,5 mg/mL.

Les solutions mères des deux peptides ont été préparées dans l'eau ultrapure à partir des micro-pesées effectuées au laboratoire de Différentiation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N, Université de Rouen). Leurs concentrations respectives sont de 5,2 mg/mL et 5,1 mg/mL.

La structuration de ces peptides est étudiée dans trois environnements différents :

- dans l'eau ultrapure
- dans du TFE (2,2,2-Trifluoroéthanol) à 10 ; 25 et 50 % (v/v)
- dans du SDS à 2 ; 8 et 16 mM

Chaque spectre DC correspond à la moyenne de trois mesures consécutives et sont corrigés de la ligne de base à l'aide des blancs (tampon sans peptides). Les données brutes sont transformées et intégrées dans le logiciel CDmax (Jobin-Yvon).

Le calcul des pourcentages de chacune des structures secondaires présentes dans les peptides est basé sur la formule de Forood *et al*, 1993 :

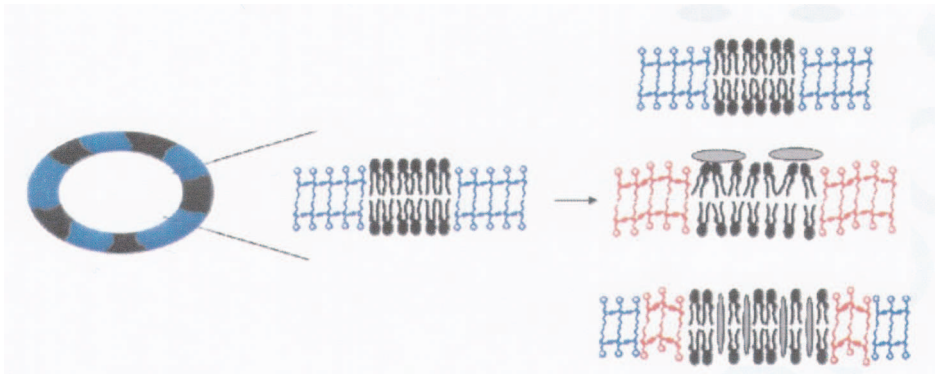
$$100 \times ([\theta]_{222} / \max[\theta]_{222})$$

$$\max[\theta]_{222} = -40,000 [1 - (2,5/n)], \text{ où } n = \text{nombre d'acides aminés}$$

## Chapitre 7 : Test colorimétrique vésicules Lipides/PDA

### 1 Principe

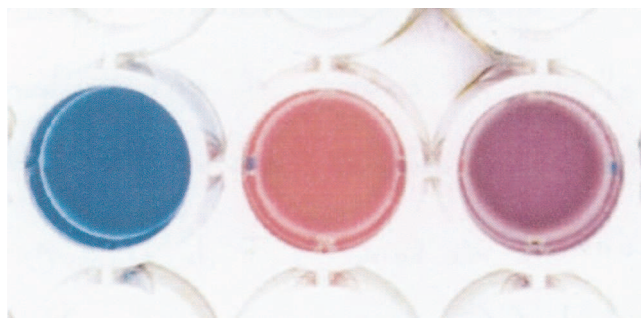
Son principe repose sur l'insertion d'un polymère, le polydiacétylène (PDA) au sein d'une bicouche lipidique synthétique. Ce polymère, formé à partir de monomères diacétyléniques (acide 10,12-tricosadiynoïque) assemblés sous irradiation UV, exhibe une couleur bleue intense après polymérisation. L'intérêt d'insérer ce réactif dans un liposome réside dans sa capacité à changer de couleur à la moindre variation structurale : le PDA passe rapidement du bleu au rouge en fonction des changements de température, de pH et de pression de surface. La Figure 45 illustre la réaction d'une vésicule phospholipides/PDA suite à diverses interactions avec des molécules.



**Figure 45 : Exemple de vésicule Lipides/PDA.**

*Des composés (ovales gris), comme les PAMs, vont interagir avec les phospholipides de la vésicule (éléments en noir) et induire des perturbations structurales qui provoqueront à leur tour le changement de couleur du PDA (bleu) en un polymère rouge (Jelinek et Kolusheva, 2007).*

Plusieurs études menées sur les peptides antimicrobiens ont employé ce type de vésicules afin de démontrer leur interaction avec la membrane plasmique (Kolusheva et al., 2008). Ces études ont également montré l'impact des différents mécanismes d'ancrage des peptides antimicrobiens sur la bicouche lipidique des vésicules et leur degré de pénétration, sur les transitions colorimétriques des systèmes lipidiques/PDA (Figure 46).



**Figure 46 : Différentes transitions de couleur obtenues après association entre des PAMs et la membrane des vésicules.**

*Puit 1 : solution de vésicules PDA témoin ; puit 2 : vésicules PDA+ cryptdine-4 ; puit 3 : vésicules PDA + mellitine. La concentration de chaque peptide est de 0,1 mM (Jelinek et Kolusheva, 2007).*

Dans cet exemple, la différence de couleur des puits est une indication sur le type d'interaction entre les peptides testés avec les membranes synthétiques : la couleur rouge prononcé du puit 2 résulte d'une importante perturbation au niveau de la surface lipidique des vésicules lipides/PDA provoquée par la cryptdine-4 (défensine intestinale chez la souris), peptide positivement chargé et structuré en feuillet- $\beta$ . Dans le cas de la mellitine on assiste à un changement de couleur plus modéré. Ce peptide au contact de la membrane se structure en hélice  $\alpha$  puis s'insère dans la bicouche lipidique. Cette insertion ne semble pas engendrer une importante déstructuration de la membrane ce qui expliquerait le manque d'intensité de la couleur du puit.

Les vésicules lipides/PDA sont présentées comme un outil idéal pour évaluer l'impact de la nature des phospholipides et des modifications au niveau de certains acides aminés sur l'adsorption et la pénétration des PAMs (Halevy et al., 2003 ; Katz et al., 2003 ; Satchell et al., 2003).

## **2 Construction des vésicules Lipides/PDA**

### **2.1 Solutions mères de phospholipides et de PDA**

Les phospholipides qui ont servi à la construction des liposomes sont les suivants :

- DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)
- DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)
- DMPE (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine)
- DMPG (1,2- dimyristoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)])



Lipides	Masse molaire en g/mol	Solvant de solubilisation	Concentration finale en mM
DMPC	677,94	CHCl <sub>3</sub>	10
DPPC	734,05		10
DMPE	635,86	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (1/1)	10
DMPG	688,85		10
<b>Réactif</b>			
PDA	346,26	CHCl <sub>3</sub>	10

Tableau 21 : Concentrations des solutions mères des phospholipides et du PDA.

## 2.2 Préparation des vésicules

Les vésicules ont été préparées dans des ballons d'évaporation en verre et les différentes solutions de phospholipides ont été prélevées à l'aide d'une seringue en verre de 1 mL.

Types de vésicules préparées :

- DMPE/DMPG/PDA (1/1/3)

Lipide	C <sub>i</sub> (mM)	V <sub>initial</sub> (μL)	C <sub>final</sub> (mM)	C <sub>f. lipides</sub> (mM)
DMPE	10	50	0.5	<b>1</b>
DMPG	10	50	0.5	
PDA	10	150	1.5	-

- DPPC/PDA (4/6)

Lipide	C <sub>i</sub> (mM)	V <sub>initial</sub> (μL)	C <sub>final</sub> (mM)	C <sub>f. lipides</sub> (mM)
DPPC	10	100	1	<b>1</b>
PDA	10	150	1.5	-

- DMPC/PDA (2/3)

Lipide	C <sub>i</sub> (mM)	V <sub>initial</sub> (μL)	C <sub>final</sub> (mM)	C <sub>f. lipides</sub> (mM)
DPPC	10	100	1	<b>1</b>
PDA	10	150	1.5	-

Lors des essais permettant d'améliorer le protocole de construction des vésicules, nous avons préparé des volumes de solutions lipidiques plus importants afin d'obtenir plusieurs échantillons de vésicule de même nature. Ainsi nous avons pu faire varier plusieurs paramètres (température, solution de réhydratation) en parallèle.

Protocole :

---

Pour les essais avec les peptides, la concentration totale des phospholipides est de 1 mM.

- 1- Les phospholipides sont disposés dans un ballon puis le mélange est homogénéisé sous agitation.
- 2- Le solvant de solubilisation des phospholipides ( $\text{CHCl}_3$  ou  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) est ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le ballon contenant le film lipidique est ensuite placé dans une étuve à  $37^\circ\text{C}$  pendant 1h afin d'éliminer toute trace de chloroforme.
- 3- Le film lipidique est ensuite réhydraté avec 2,5 mL de tampon Tris à 50 mM à pH=8. Cette étape de réhydratation s'effectue sous agitation à 200 rpm et à  $60^\circ\text{C}$ .
- 4- Les solutions de phospholipides sont placées dans un bain à ultrasons à  $70^\circ\text{C}$  pendant 15 min.
- 5- La filtration des vésicules est réalisée à chaud sur un filtre avec une membrane en polycarbonate de  $0,8\ \mu\text{m}$ .
- 6- Les solutions filtrées sont placées toute une nuit à l'abri de la lumière à  $4^\circ\text{C}$ .
- 7- La polymérisation des vésicules s'effectue en plaque 96-puits sous irradiation UV à une longueur d'onde de 254 nm pendant quelques secondes, le temps d'obtenir une coloration bleue des solutions de vésicules.

Les transitions colorimétriques de ce type de vésicules peuvent être quantifiées en mesurant les intensités relatives des complexes « bleus » et « rouges ». Le paramètre utilisé pour mesurer ce changement de couleur est le pourcentage de réponse colorimétrique (RC), il est défini par la formule suivante :

$$\text{RC} = (\text{PB}_0 - \text{PBI}) / \text{PB}_0 \times 100\%$$

$$\text{Où PB} = A_{\text{bleu}} / (A_{\text{bleu}} + A_{\text{rouge}})$$

Avec A, l'absorbance sous UV-Visible des composés bleu (640 nm) et rouge (550 nm).

$\text{PB}_0$  est le ratio rouge/bleu de l'échantillon témoin bleu et PBI est la valeur obtenue après la transition de couleur bleu au rouge.

## Résultats et Discussion

Cette partie s'articule autour de deux chapitres correspondant respectivement aux travaux menés sur les deux espèces de fourmis *C. striatula* et *T. bicarinatum*. Le premier chapitre traite des activités biologiques du liquide de la glande de Dufour de *C. striatula* observées *in vivo* sur des termites et *in vitro* sur des hématies.

Le deuxième chapitre est consacré à l'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude du venin de *T. bicarinatum*.

## Chapitre 1 : *Crematogaster striatula*

### 1 Introduction

Les *Crematogaster* sont des fourmis arboricoles qui dominent les plantations de coco et les canopées de l'Afrique centrale et de l'ouest. Leur spécificité évoquée précédemment (cf. synthèse bibliographique) est de pulvériser leurs sécrétions venimeuses (liquide de la glande de Dufour et venin) sur leurs proies et sur des espèces de fourmis concurrentes afin de les éloigner d'une source de nourriture.

L'agressivité de *Crematogaster striatula* ainsi que le pouvoir répulsif du contenu de la glande de Dufour vis à vis d'autres fourmis ont été démontrés par une étude comportementale menée sous la direction du Professeur Alain Dejean. L'évaluation du pouvoir insecticide du contenu de la glande de Dufour sur des termites a été réalisée au laboratoire.

Ensuite, l'extrait de cette glande de Dufour a été analysé par chromatographies gazeuse et liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue PlosOne (Rifflet et al., 2011 ; Annexe I).

---

## 2 Etude comportementale

Cette partie se structure comme suit :

- l'évaluation du comportement de prédation des *C. striatula* envers leur proie : des termites (*Macrotermes bellicosus* ; ouvriers et soldats).
- l'évaluation de l'agressivité de ces fourmis et du pouvoir répulsif de leurs sécrétions venimeuses sur trois autres espèces de fourmis (*Camponotus brutus* ; *Oecophylla longinoda* et *Tetramorium aculeatum*).

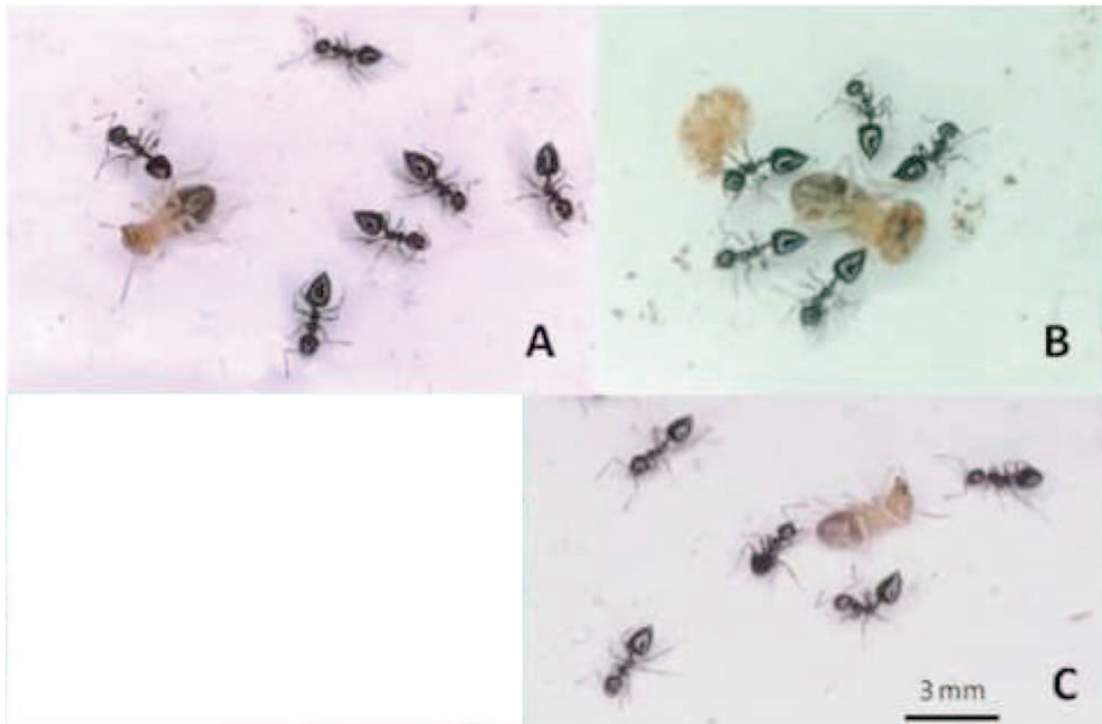
---

### 2.1 La prédation

Lorsqu'une ouvrière au sein d'un groupe d'éclaireuses détecte la présence de proies sur une courte distance (3-6 mm), elle adopte automatiquement une posture d'alarme caractéristique des fourmis *Crematogaster*. En effet, elle relève son gastre à la verticale et maintient constamment son aiguillon vers l'extérieur.

En moins de 30 secondes, un peu plus d'une quinzaine d'ouvrières dont certaines sont arrivées en renfort, encerclent les termites tout en orientant leur gastre vers leur proie. Dix minutes après, les termites présentent des tremblements et finissent par basculer sur le dos, seules leurs pattes continuent de s'agiter de façon saccadée (Figure 47). Aucun contact physique entre les deux espèces n'a été observé durant l'attaque. Une fois les termites totalement immobilisés, un groupe d'ouvrières se charge de les rapatrier au sein du nid.

Ce scénario est identique à chaque rencontre entre les ouvrières *C. striatula* et les termites.



**Figure 47 : Capture d'un ouvrier termite par des *C. striatula*.**

Six *Crematogaster* encerclent le termite tout en maintenant une distance de 5-10 mm. Leur gastre est orienté vers la proie et leurs antennes sont positionnées de manière à capter le moindre mouvement de celle-ci.

A : Dix minutes après isolement, le termite bascule sur le dos, une des ouvrières s'en approche avec précaution ;  
 B : Les fourmis se rapprochent du termite en gardant leur posture d'alerte lorsque celui-ci est devenu parfaitement immobile ;  
 C : Deux ouvrières se préparent à transporter le termite jusqu'au nid, les trois autres restent en état d'alerte.

Comme l'indique le Tableau 22, seul le nombre d'ouvrières nécessaire à la capture varie en fonction du type de proie. En effet, la capture de simples termites ouvriers requiert au maximum la présence de six ouvrières alors que celle de soldats nécessite le double d'individus.

	termites	
	ouvriers	soldats
Nb d'ouvrières <i>C. striatula</i> recrutées	5,11 ± 0,1 (α)	11,85 ± 0,48 (α)
Nb d'ouvrières <i>C. striatula</i> pour le transport	1,6 ± 0,1 (β)	4,05 ± 0,15 (β)
(α) test de Student, degrés de liberté =53 ; t= 17,7 ; p<0,0001		
(β) test de Student, degrés de liberté =53 ; t= 13,8 ; p<0,0001		

**Tableau 22 : Nombres d'individus de *C.striatula* recrutés pour la capture de termite.**

## 2.2 Comportement face à des espèces concurrentes

Les ouvrières *C. striatula* adoptent la même posture d'alerte (Figure 48) lorsqu'elles rencontrent sur leur territoire, des fourmis de l'espèce *C. brutus* qui se repaissent de miel. Un seul individu *C. striatula* peut s'opposer à plusieurs ouvrières de *C. brutus* pour protéger ou acquérir cette source de nourriture. Lors de chaque face à face (24 évènements au total), les individus *C. brutus* ont renoncé à la source de nourriture au profit des ouvrières *C. striatula* et ce sans montrer la moindre agressivité envers ces dernières.



**Figure 48 : Concurrence interspécifique entre une ouvrière *C. striatula* et des ouvrières *C. brutus* pour l'accès à une goutte de miel.**

Une ouvrière *C. striatula* a surpris des *C. brutus* en train de se nourrir sur son territoire. Sa réaction est de s'approcher doucement de ces individus jusqu'au niveau de la goutte de miel en pointant son gastre vers eux. Les *C. brutus*, antennes et mandibules déployées, renoncent petit à petit à cette source de nourriture. Aucun contact entre les protagonistes n'a été observé.

Ces observations ont également révélé qu'à chaque confrontation, d'autres ouvrières de *C. striatula* étaient recrutées dans un court délai pour participer à l'expulsion des *Camponotus* sur leur territoire. La technique d'intimidation reste inchangée: les *Crematogaster* s'approchent à quelques millimètres des intrus tout en orientant leur gastre vers eux. Une fois seules, elles se regroupent autour du miel pour se nourrir.

Malgré leur petite taille, les ouvrières de *Crematogaster striatula* ont réussi à chasser d'autres espèces compétitrices des sources de nourriture comme les *Oecophylla longinoda* et les *Tetramorium aculeatum*.

## 3 Propriété insecticide du contenu de la glande de Dufour

Le contenu de la glande de Dufour a été testé sur le termite *Reticulitermes grassei*. Le Tableau 23 présente les résultats obtenus avec trois dilutions de liquide de la glande de

Dufour (trois concentrations différentes correspondant à 1, 3 ou 6 glandes par exposition). Les termites exposés (10 termites par test) sont observés durant 24h.

	5 min		30 min		1h		2h		4h		6h		8h		12h		24h	
Témoins	N	90	N	89	N	89	N	89	N	88	N	87	N	87	N	87	N	87
	P	-	P	1	P	1	P	-	P	1	P	2	P	1	P	-	P	-
	M	-	M	-	M	-	M	1	M	1	M	1	M	2	M	3	M	3
1 glande 90 µg/µL	N	85	N	82	N	79	N	72	N	58	N	33	N	27	N	17	N	-
	P	4	P	7	P	7	P	14	P	28	P	33	P	25	P	14	P	2
	M	1	M	1	M	4	M	4	M	4	M	24	M	38	M	59	M	88
3 glandes 270 µg/µL	N	81	N	78	N	69	N	63	N	51	N	36	N	12	N	3	N	-
	P	6	P	9	P	18	P	21	P	33	P	39	P	6	P	3	P	-
	M	3	M	3	M	3	M	6	M	6	M	15	M	72	M	84	M	90
6 glandes 540 µg/µL	N	75	N	66	N	58	N	50	N	45	N	37	N	21	N	4	N	-
	P	14	P	20	P	28	P	35	P	40	P	33	P	22	P	10	P	-
	M	1	M	4	M	4	M	5	M	5	M	20	M	47	M	76	M	90

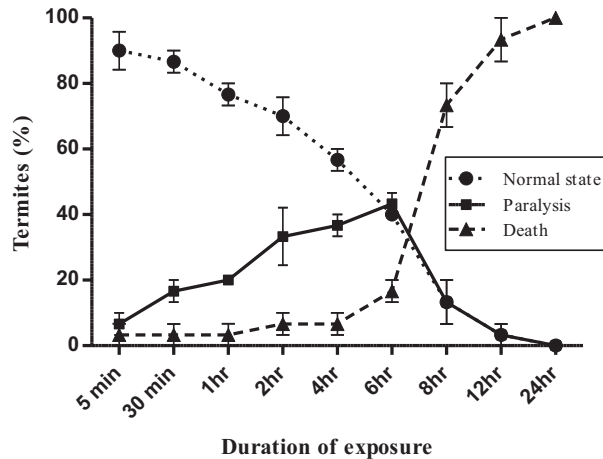
**Tableau 23 : Comparaison des effets doses/temps d'exposition du contenu de la glande de Dufour appliqué localement sur l'abdomen de termites.**

Les doses correspondent au contenu d'une, trois ou six glandes de Dufour. N : nombre de termites présentant une activité normale ; P : nombre de termites paralysés; M : nombre de termites morts.

Afin de confirmer l'innocuité du solvant de préparation, le dichlorométhane (0,5 µL/termite) a été appliqué sur un lot de dix termites servant de témoins. Au bout de 24h d'exposition, 96,7 % de cette population témoin présente une activité normale. Ce résultat montre l'innocuité de ce solvant lors des tests. En revanche, pour les individus exposés au contenu de la glande de Dufour, nous avons remarqué que le taux de paralysie ainsi que le taux de mortalité augmentaient en fonction de la dose et du temps d'exposition. Par exemple, 10% des termites intoxiqués par du contenu de la glande de Dufour à une concentration de 270 µg/µL souffrent de paralysie 30 minutes après exposition à la substance venimeuse.

La Figure 49 présente l'effet dose/temps du liquide de la glande de Dufour, correspondant à trois glandes par termite, selon trois critères : l'absence de symptômes, la paralysie et la mort.





**Figure 49 : Effet dose/temps d'une solution équivalente à 3 glandes/termite sur des termites.**

Etat normal (N), Paralysie (P) et Mort (D) des termites exposés au liquide de la glande de Dufour (3 glandes/termite) entre 5 min et 24 h. Les valeurs résultent de trois expériences indépendantes (triplicat).

#### 4 Discussion de l'étude comportementale et de l'activité insecticide du contenu de la glande de Dufour des *C. striatula*

Trois principales fonctions du liquide de la glande de Dufour des *Crematogaster* se distinguent lors de ces travaux. La première consiste à recruter des renforts, dans les plus brefs délais (moins de 30 sec), du renfort lorsque des ouvrières de *C. striatula* sont confrontées à des intrus appartenant à d'autres espèces de fourmis ou des proies. Les composés volatils du liquide de Dufour tiennent ici le rôle de phéromones d'alarme suffisamment puissantes pour appeler d'autres ouvrières en renfort sans retour au nid.

Le liquide de la glande de Dufour est également un puissant répulsif qui, une fois émis, induit le retrait immédiat des fourmis étrangères à la colonie. Cette capacité permet également de préserver les *Crematogaster* de tout contact avec ses adversaires. Des composés aux propriétés similaires sont sécrétés par les glandes mandibulaires des fourmis ponerines *Platythyrea conradti* (Dejean, 2011).

Contrairement aux *Camponotus*, les termites soldats résistent aux *C. striatula* qui les menacent. Cette absence de repli est due à leur instinct de défense qui les conduit à défendre leur nid et leur population quel que soit le danger. Cet instinct les amène généralement à se sacrifier face à leurs agresseurs.

De précédentes études menées sur les *Crematogaster* ont démontré que certaines espèces appliquaient directement leur venin sur leurs proies. Ce venin est une émulsion qui est sécrétée à l'extrémité de l'aiguillon dont la forme en spatule facilite l'application sur le tégument des ennemis (Marlier *et al.*, 2004). Le venin de *C. scutellaris* tient

essentiellement un rôle défensif, en effet il n'est pas utilisé pour la capture des proies mais uniquement lors de rencontres interspécifiques (Marlier *et al.*, 2004 ; Heredia *et al.*, 2005).

Nous avons démontré que le liquide de Dufour pouvait également être une arme biologique utile pour la capture de proies.

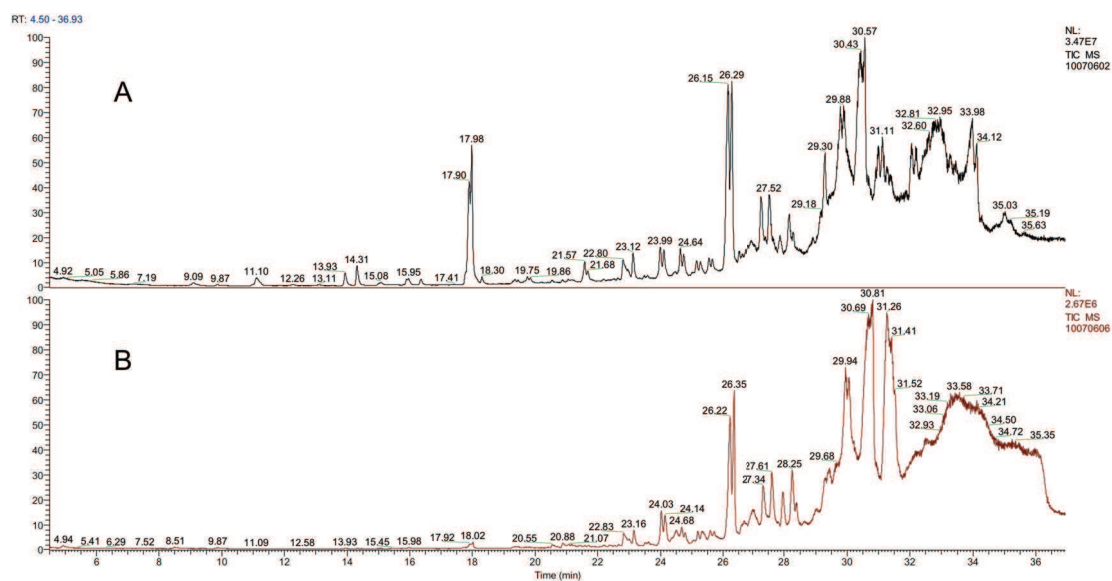
Une fois appliqué sur l'abdomen des termites, le contenu de la glande de Dufour paralyse rapidement les termites et de manière irréversible. La mort n'interviendra que quelques heures plus tard, ce qui indique que la fonction principale du liquide de Dufour est d'immobiliser les proies afin de faciliter leur capture. La plupart des termites ont une taille nettement supérieure à celle des ouvrières *C. striatula* (7 mm contre 3,5 mm de longueur), un affrontement direct présenterait un risque important pour ces fourmis de petite taille. C'est pourquoi lors d'une attaque à distance, les toxines présentes dans les sécrétions abdominales doivent être suffisamment efficaces pour neutraliser la proie au plus vite. L'isolement du seul liquide de la glande de Dufour et les résultats obtenus montrent que la synergie avec le venin n'est pas obligatoire pour induire la paralysie des proies. Cela va à l'encontre de l'hypothèse de Dalozé qui suggérait que les composés présents dans la glande de Dufour devenaient biologiquement actifs après hydrolyse par les enzymes du venin.

## 5 Analyse du contenu de la glande de Dufour

### 5.1 Analyse par GC-MS

L'extrait hexanique de la glande de Dufour de *Crematogaster striatula*, a été analysé par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse. La Figure 50 montre les chromatogrammes de masse obtenus avec deux modes d'ionisation complémentaires : le premier (A) par impact électronique et le second (B) par ionisation chimique. Plus sensible et moins sélectif, l'impact électronique fournit une représentation fidèle des composés présents dans le liquide de la glande de Dufour. Il donne également une fragmentation des composés qui est très utile pour l'identification de certaines familles chimiques. L'ionisation chimique ne fractionne pas et favorise, en présence d'un hétéroatome, la formation des molécules protonées  $MH^+$  ou des adduits  $MNH_4^+$  avec de l'ammoniac comme gaz réactant.

Le chromatogramme de masse de la Figure 50B a été obtenu par ionisation chimique à l'ammoniac.



**Figure 50 : Chromatogrammes de l'extrait hexanique du liquide de la glande de Dufour en GC-MS.**

*A/ analyse en impact électronique ; B/ analyse en ionisation chimique (NH<sub>3</sub>).*

De l'analyse complète des chromatogrammes, il ressort 27 composés dont la masse varie de 238 à 348 daltons (Tableau 24). Bien que la spectrométrie de masse seule, ne permette pas de définir avec précision la nature exacte des composés observés, la plupart des masses molaires correspondent à celles citées par Daloze (Daloze *et al.*, 1986, 1987 et 1991) et Detrain (Detrain *et al.* 1997) chez les *Crematogaster*. Il s'agit de molécules à chaînes longues, polyinsaturées, portant ou non des fonctions ester, acétate, alcool ou aldéhyde. La plupart diffèrent les unes des autres par le degré d'insaturation et (ou) la position d'une double liaison.

Temps de rétention (min.)	Formule brute des composés	Ions identifiés (m/z)		Masse en Da
		En EI	En CI	
13,93	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O	55, 67, 81	239, 267	238
14,31	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O	55, 67, 81	241, 269	240
15,9	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O	55, 67, 79, 93, 121, 135, 149	265, 282	264
15,95	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O	55, 67, 79, 93, 121, 135, 149	265, 282	264
17,9	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O	55, 67, 81, 121, 135, 149	249, 267, 284	266
17,98	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O	55, 67, 81, 121, 135, 149	249, 267, 284	266
21,57	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O	67, 79, 97	261, 279, 296	278
21,68	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O	67, 79, 97	279	278
22,8	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O	79, 94, 121, 302	285, 303	302
23,12	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O	94, 107, 304	305	304
23,99	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	67, 79	289, 307, 324	306
24,64	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	67, 79	289, 307, 324	306
24,70	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	67, 81, 94	331	330
25,55	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	67, 79, 94	319, 331	330
25,66	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	67, 79, 94	301, 319, 331	330
26,15	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	67, 79, 94, 107, 330	331	330
26,29	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	67, 79, 94, 107, 330	331	330
27,26	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	67, 79, 95, 121	285, 303, 321, 338	320
27,52	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub>	67, 83, 95, 121	323, 340	322
27,88	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	67, 77, 91, 105, 133	273, 283, 301, 319, 336	318
28,17	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	67, 79, 95, 110, 123	333, 350	332
29,30	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	67, 79, 95, 110, 123	315, 333	332
29,90	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	67, 79, 95, 110, 123	315, 333	332
30,4	C <sub>23</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	350, 331, 121, 95, 79, 67	313, 331, 349, 366	348
30,57	C <sub>23</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	350, 331, 121, 95, 79, 67	313, 331, 349, 366	348
31	C <sub>23</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	346, 331, 305, 151, 79/81, 67	305, 329, 347, 364	346
31,11	C <sub>23</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	346, 331, 305, 151, 79/81, 67	305, 329, 347, 364	346

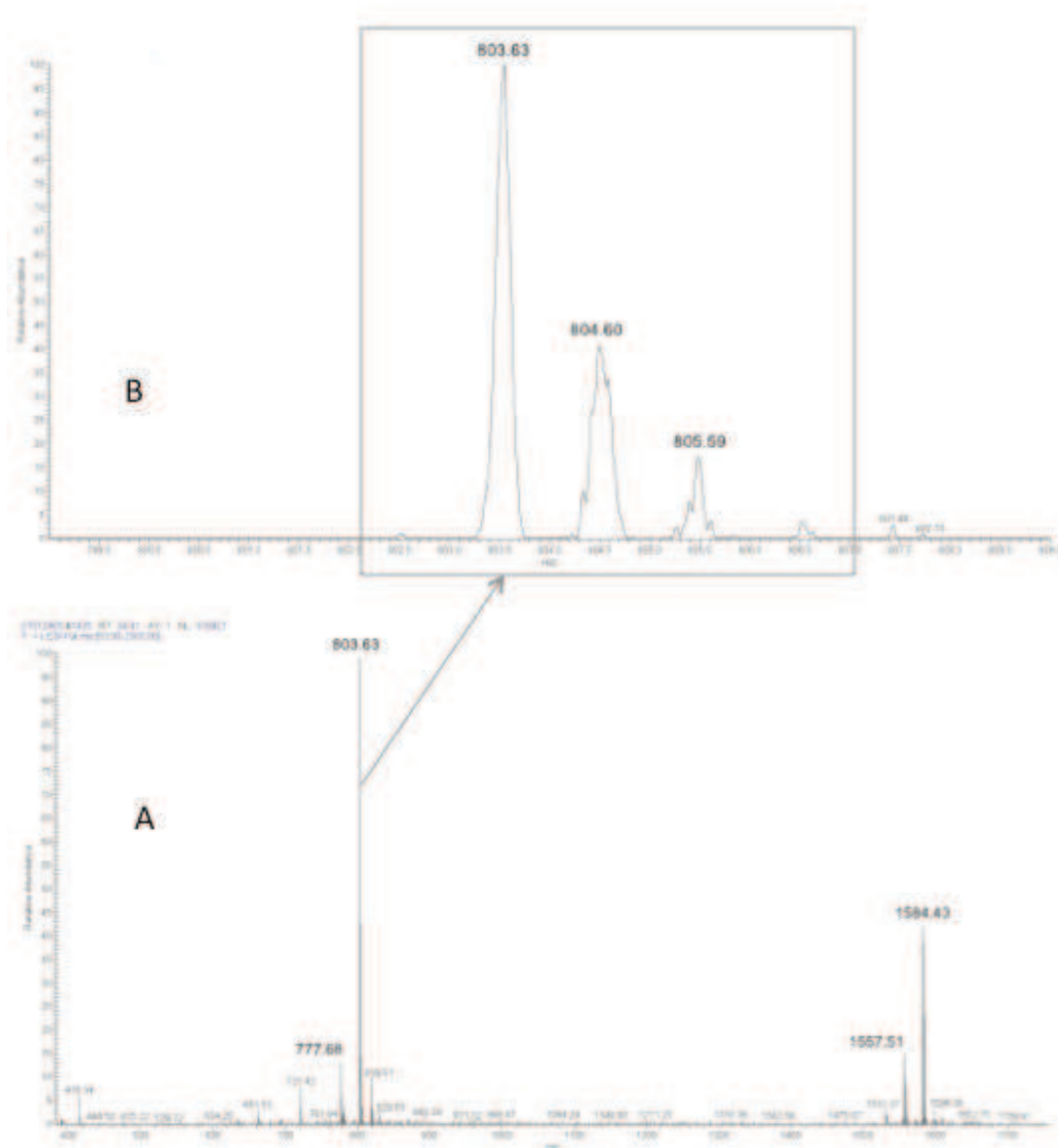
Tableau 24 : Proposition de formules brutes pour les pics de la figure 67 basée sur leur masse et les travaux de Daloze et Detrain.

Le Tableau 24 montre différentes familles de composés à longues chaînes : deux C<sub>16</sub>, quatre C<sub>18</sub>, quatre C<sub>19</sub>, douze C<sub>21</sub> et quatre C<sub>23</sub>. Le dédoublement des pics suppose qu'il s'agit d'isomères de position ou de configuration. Leur structure précise pourrait être établie par résonance magnétique nucléaire, à condition d'extraire une quantité suffisante et de purifier chaque constituant.

Afin d'élargir l'étude au-delà des limites de la GC-MS, qui ne peut dépasser la masse des 1000 daltons, nous avons examiné le contenu de la glande de Dufour par ESI-MS en mode positif.

## 5.2 Analyse par ESI-MS

Trente glandes de Dufour ont été diluées dans 200  $\mu$ L de méthanol et la solution a été analysée par spectrométrie de masse.



**Figure 51 : Spectre MS obtenu par LC-ESI-MS du liquide de la glande de Dufour.**

*A/ Ions majeurs de l'extrait m/z 803,63 et 1584,43. B/ Zoom scan sur l'ion m/z 803,63.*

Le spectre obtenu par LC/MS (Figure 51A) révèle la présence d'ions  $MH^+$  dont la masse est comprise entre 400 et 1600 Da. Certains ions observés en GC-MS apparaissent également dans le spectre d'infusion (Figure 52). C'est le cas des  $m/z$  303,24 et 331,27 qui correspondent respectivement des masses moléculaires de 302 et 330 Da.

On note également la présence des ions de masse  $m/z$  de 803,63 et 1584,43. L'examen des massifs isotopiques en mode zoom scan (Figure 51B) montre qu'il s'agit d'ions monochargés.

La MS/MS sur ces ions (Figure 52 a et b) ne met pas en évidence les pertes correspondant à des acides aminés, ce qui nous permet d'exclure l'hypothèse peptidique des composés et de s'orienter plutôt vers d'autres types de molécules.

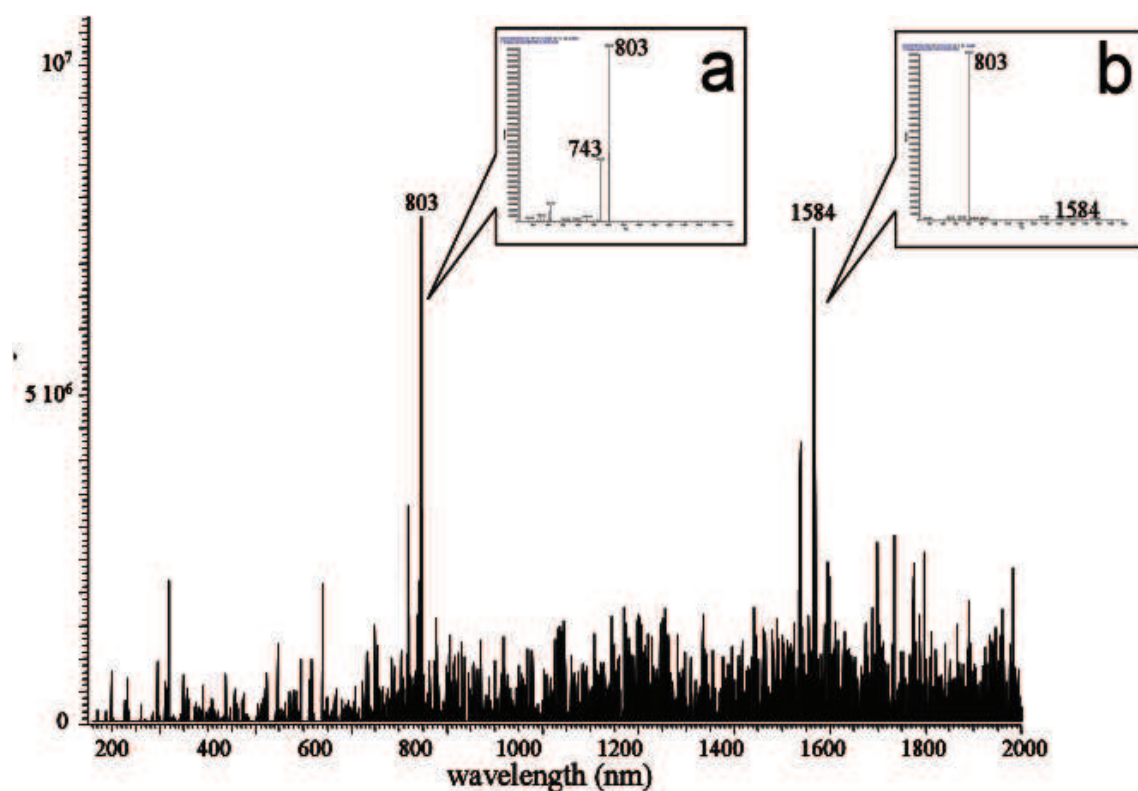


Figure 52 : Spectre d'infusion ESI-MS et spectres MS/MS des ions  $m/z$  803,63 (a) et  $m/z$  1584,43 (b).

La fragmentation de l'ion  $m/z$  803,63 (Figure 53) conduit à la formation de l'ion  $m/z$  743,51 correspondant à la perte d'un groupement acétate  $CH_3COOH$  (de 60 u) :  $803,45 - 743,51 = 59,94 \approx 60$ .

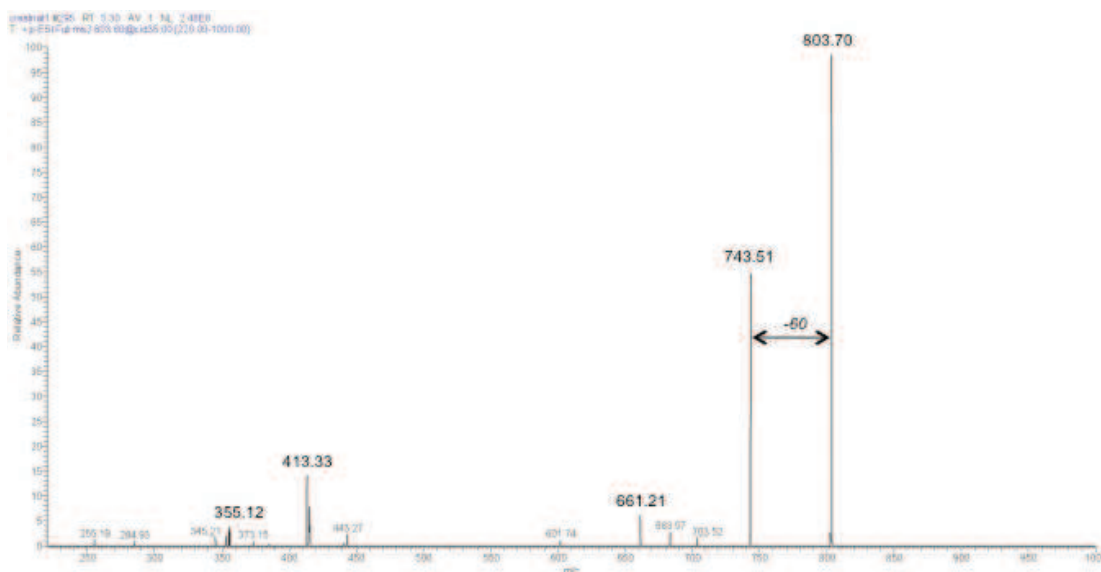


Figure 53 : Spectre MS/MS de l'ion  $m/z$  803,70.

L'énergie de collision est de 35%.

Malgré une énergie de collision élevée, l'analyse MS/MS de l'ion fils majoritaire  $m/z$  743,51 ne provoque aucune fragmentation. Sa stabilité conduit à envisager une molécule cyclique, généralement plus résistante à la fragmentation.

De même, l'analyse MS/MS de l'ion  $m/z$  1584,43 fournit uniquement l'ion fils  $m/z$  803,70. La synthèse de ces résultats montre que les ions  $m/z$  1584,43 et 803,70 correspondent à une seule grosse molécule azotée (masse impaire) et acétylée (perte de 60) de masse 1583,43 dont l'ion 803,70 serait un fragment.

Le liquide de Dufour n'a jamais été analysé par LC-MS et ce composé n'est pas mentionné dans la littérature. Aussi, afin d'approfondir sa structure, il sera indispensable de l'isoler en quantités suffisantes pour conduire des analyses par résonance magnétique nucléaire.

## 6 Discussion de l'analyse chimique

Suite aux résultats issus des essais comportementaux, évoqués dans le premier article (annexe I), nous avons confirmé la nature volatile de la majorité des composés de la glande de Dufour de *C. striatula*, ces derniers servant à la fois de phéromone d'alerte pour le recrutement d'ouvrières et de répulsifs face à d'autres espèces et cela en absence de contact. S'agissant de la composition chimique du liquide de Dufour, nos travaux d'analyse par GC-MS ont permis de proposer quelques formules brutes en accord avec la

littérature. Il s'agit essentiellement de dérivés aliphatiques, saturés ou insaturés, portant des fonctions chimiques telles que acétates, alcools, hydroxy ou oxo-acétates.

Les analyses effectuées en ESI-MS ont révélé la présence d'un composé non volatile d'une masse impaire égale à 1583 Da, ce qui pourrait indiquer la présence d'azote(s) et par conséquent nous guider sur la piste d'un alcaloïde.

Cependant, au regard de la littérature, les alcaloïdes dépassent rarement les 1000 Da. De plus l'absence d'espèces multichargées sur les spectres obtenus en ESI-MS et la résistance de ce composé à toute tentative de fragmentation par MS/MS nous indiquent que ce composé n'est pas un peptide.

La caractérisation précise des composés du liquide de la glande de Dufour s'imposera afin d'identifier clairement l'origine de la propriété paralysante de ce dernier.

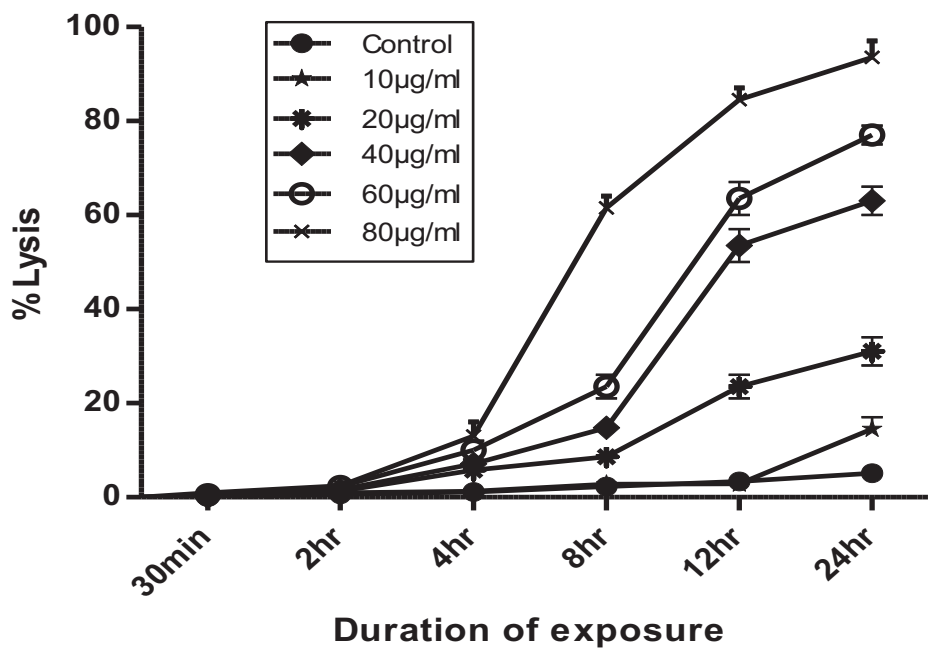


## 7 Propriété hémolytique du liquide de la glande de Dufour

Le venin de certaines espèces de fourmis possède des propriétés hémolytiques. C'est le cas les venins de *Pogonomyrmex barbatus* et de *P. badius* (Schmidt *et al.*, 1984a ; Bernheimer *et al.*, 1980). D'après les mêmes auteurs, les principales molécules responsables de cette activité sont de nature protéique.

Le but ici est de vérifier si le contenu de cette glande dont la composition est très éloignée de celle des glandes à venin est capable d'induire la destruction membranaire d'érythrocytes. Autrement dit, le seul liquide de la glande de Dufour présente-t-il les mêmes propriétés hémolytiques qu'un venin de fourmis dépourvues de cette glande ?

Les tests réalisés sur des érythrocytes humains en présence de liquide de la glande de Dufour de *C. striatula* mettent en évidence une activité hémolytique de ce dernier, corrélée au temps d'incubation et à la concentration testée (Figure 54).



**Figure 54 : Pourcentage de lyse d'érythrocytes humains exposés à différentes concentrations d'extrait de la glande de Dufour de *C. striatula*.**

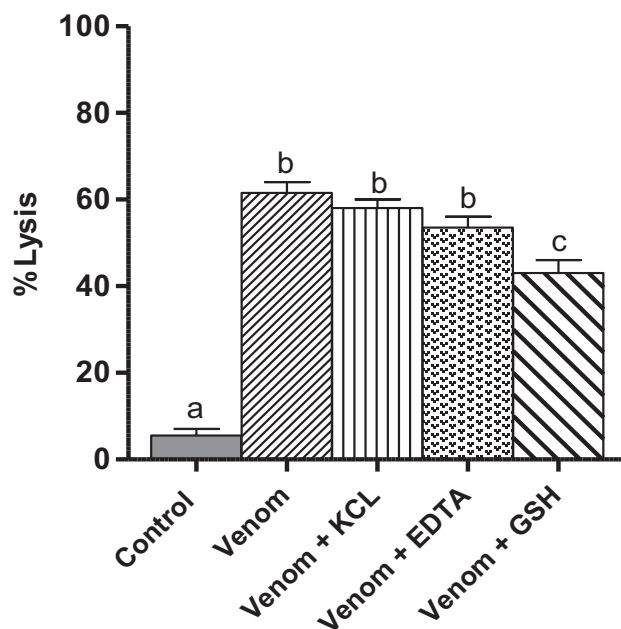
Les concentrations testées vont de 10 à 80 µg/mL et le temps d'exposition varie de 30 min à 24h. Les érythrocytes exposés au contenu de Dufour sont incubés à 37°C sous agitation douce. Le pourcentage de lyse est mesuré dans le surnageant de la solution d'érythrocytes par spectrophotométrie à 450 nm. Des triplicats ont été établis pour chaque concentration.

A une concentration de 80 µg/mL, ce mélange provoque une lyse totale des érythrocytes au bout de 24 h d'exposition (Figure 54).

Des phénomènes de peroxydation des lipides faisant suite à un stress oxydatif sont à l'origine de la toxicité de nombreux xénobiotiques (Rice-Evans, 1944). Des travaux ont montré que le stress oxydatif engendrait des changements dans la perméabilité ionique, ainsi qu'une augmentation des phénomènes de peroxydation lipidique dans les membranes d'érythrocytes (Maridonneau *et al.*, 1983 ; Tavazzi *et al.*, 2000). La formation de radicaux libres lors du processus de peroxydation engendre des dommages membranaires entraînant *in fine* la lyse cellulaire. Les antioxydants pourraient réduire ces effets délétères, c'est pourquoi, nous avons testé l'effet d'un antioxydant général, le glutathion réduit (GSH) sur l'activité hémolytique du liquide de la glande de Dufour.

En se référant à l'étude menée sur les propriétés hémolytiques des venins des Cnidaires (Marino *et al.*, 2008), nous avons également testé l'influence de certains ions et d'un agent chélateur tel que l'EDTA sur cette activité afin de connaître les différents facteurs capables d'interagir avec nos toxines et d'appréhender le mécanisme de cette activité.

Les résultats de cette expérience sont présentés dans la Figure 55:



**Figure 55 : Effets du chlorure de potassium (KCl 10 mM), de l'EDTA (10 mM) et du GSH (3 mM) sur l'activité hémolytique du liquide de la glande de Dufour (« venom ») de *C. striatula*.**

Dans ce cas précis, les érythrocytes sont exposés à une concentration de liquide de la glande de Dufour égale à 80 µg/mL durant 8 h. L'erreur type de la moyenne (+/- SEM) est représentée par une barre située au dessus de chaque histogramme. Les échantillons sont testés trois fois dans les mêmes conditions expérimentales. Les

lettres a, b, c indiquent les effets significatifs entre chaque condition. Le test statistique employé est une ANOVA à une voie suivie du test de Bonferroni.

Le chlorure de calcium évoqué dans la partie expérimentale a engendré dans les solutions d'érythrocytes témoins (sans liquide de la glande de Dufour) une légère dégradation des érythrocytes. Par conséquent aucun échantillon traité par cette solution ionique n'a pu être exploité. La présence de chlorure de potassium ainsi que d'EDTA dans le milieu d'incubation des érythrocytes en présence de liquide de Dufour a induit une légère diminution du pourcentage de lyse comparé à celui engendré par le liquide de Dufour. Cette diminution minime nous informe que les toxines responsables de l'activité hémolytique du liquide de Dufour ne sont pas influencées par la présence de cations.

L'adjonction de GSH atténue significativement l'hémolyse observée. La toxicité érythrocytaire du liquide de Dufour pourrait donc être, en partie, due à un stress oxydatif conduisant à une altération membranaire.

## 8 Discussion de l'activité hémolytique

Certains auteurs comme Daloz et Pasteels, insistent sur l'action synergique entre la glande de Dufour et la glande à venin. En d'autres termes, lors de l'émission du venin au niveau du canal déférent, les composés présents dans la glande de Dufour seraient transformés par les estérases et oxydases stockées dans la glande à venin et seuls les produits issus de ces réactions présenteraient une toxicité.

Les résultats obtenus suite au test *in vivo* sur les termites et sur les érythrocytes ont prouvé que les composés présents dans la glande de Dufour ont des propriétés insecticides et hémolytiques sans avoir à subir de transformations enzymatiques préalables.

Dans la littérature, l'influence de cations sur l'activité hémolytique de toxines a été démontrée. En effet, la  $\beta$ -phospholipase  $A_2$ , extraite du venin d'une anémone de mer *A. pallida*, en présence d'ions calcium gagne en efficacité (Ibarra-Alvarado *et al.*, 2007). Certaines phospholipases  $A_2$  de venins présentent un grand nombre de ponts disulfures au sein de leur structure et possèdent une activité calcium-dépendante. Un fort taux de calcium dans le milieu extracellulaire pourrait influencer leur activité en l'augmentant par exemple.

---

Le phénomène inverse existe également puisque des travaux ont montré que l'activité hémolytique des toxines de *Carybdea marsupialis* diminuait significativement en présence de ces mêmes ions (Rottini *et al.*, 1995). Deux hypothèses peuvent expliquer cette diminution. La première évoque l'influence des ions  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaires sur l'élimination des toxines interagissant avec les membranes cellulaires. En effet, Iwase et ses collaborateurs (1990) émettent l'hypothèse qu'une forte concentration en calcium dans le milieu extracellulaire va entraîner un afflux de ces ions dans la cellule. L'augmentation du calcium intracellulaire induira, à son tour, l'endocytose des toxines ancrées dans la membrane facilitant ainsi leur élimination. L'endocytose est couramment utilisée par les cellules pour réparer des composants de la membrane plasmique. La seconde hypothèse est basée sur l'influence de ces ions calcium sur la fluidité membranaire perturbant la polymérisation des monomères d'une toxine au niveau de la membrane. La plupart des toxines polymérisent pour former un pore dans la membrane plasmique de la cellule. En empêchant cette polymérisation, l'action des ions calcium préserve l'intégrité de la membrane plasmique.

Lors de nos expériences, aucune influence de cations sur l'activité hémolytique de l'extrait de Dufour n'a été observée. La concentration ionique du milieu extracellulaire ne perturbe donc pas les molécules responsables de cette activité.

Ce résultat coïncide avec la composition du contenu de Dufour puisque aucune molécule susceptible d'interagir avec les cations comme les enzymes ou les peptides, n'a été identifiée.

Les résultats obtenus avec le glutathion réduit nous conduisent sur la piste du stress oxydant. Soumise à des produits oxydants, la membrane des érythrocytes peut être détruite suite à une lipoperoxydation de ses composés. Certaines molécules de la glande de Dufour pourraient induire indirectement une hémolyse.

Privilégiant l'étude du venin de *T. bicarinatum*, nous avons provisoirement suspendu les investigations sur l'espèce *C. striatula*.

## Chapitre 2 : *Tetramorium bicarinatum*

L'analyse du venin de *Tetramorium bicarinatum* représente l'essentiel de ce travail. Dans un premier temps, nous avons évalué l'activité antibactérienne du venin brut afin de déterminer son spectre d'action sur différents microorganismes Gram+ et Gram-. Puis à la suite du fractionnement du venin brut nous avons isolé les fractions actives et identifié les molécules responsables de l'activité. Celles-ci ont été synthétisées et testées en priorité sur des souches de staphylocoques référencées et de terrain dans le but de valider les résultats obtenus lors des tests avec le venin brut.

### 1 Evaluation du pouvoir antimicrobien du venin brut

#### 1.1 Contrôle des souches de terrain

Les premières évaluations de l'activité antibactérienne ont été menées sur un lot de souches de terrain ainsi que sur deux Mycobacteries référencées (*Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 (ATCC 700084) et *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv). Deux souches de staphylocoques, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus xylosus* sont présentes parmi les souches de terrain. Afin de vérifier que la souche *S. aureus* est bien coagulase positive, nous avons ensemencé nos souches sur géloses Baird-Parker contenant du plasma de lapin et du fibrinogène (RPF). Dans le même temps l'activité lecithinase et protéinase de cette souche a été vérifiée par isolement sur milieu gélosé Baird Parker classique.

Sur ce milieu spécifique, *S. aureus* forme des colonies noires (réduction du tellurite de potassium en tellure métallique) de 1 à 1,5 mm de diamètre, brillantes, convexes et produisant sur le milieu opaque :

~ un **halo clair** (2 à 5 mm de diam.) autour de la colonie, correspondant à une zone de protéolyse (probablement due à une **lipo-protéinase**)

~ des **zones opaques**, dues à l'action d'une **lécithinase**, apparaissant parfois tardivement (48 h) dans le halo clair.

La Figure 56 montre le résultat après 48h d'incubation à 37°C :

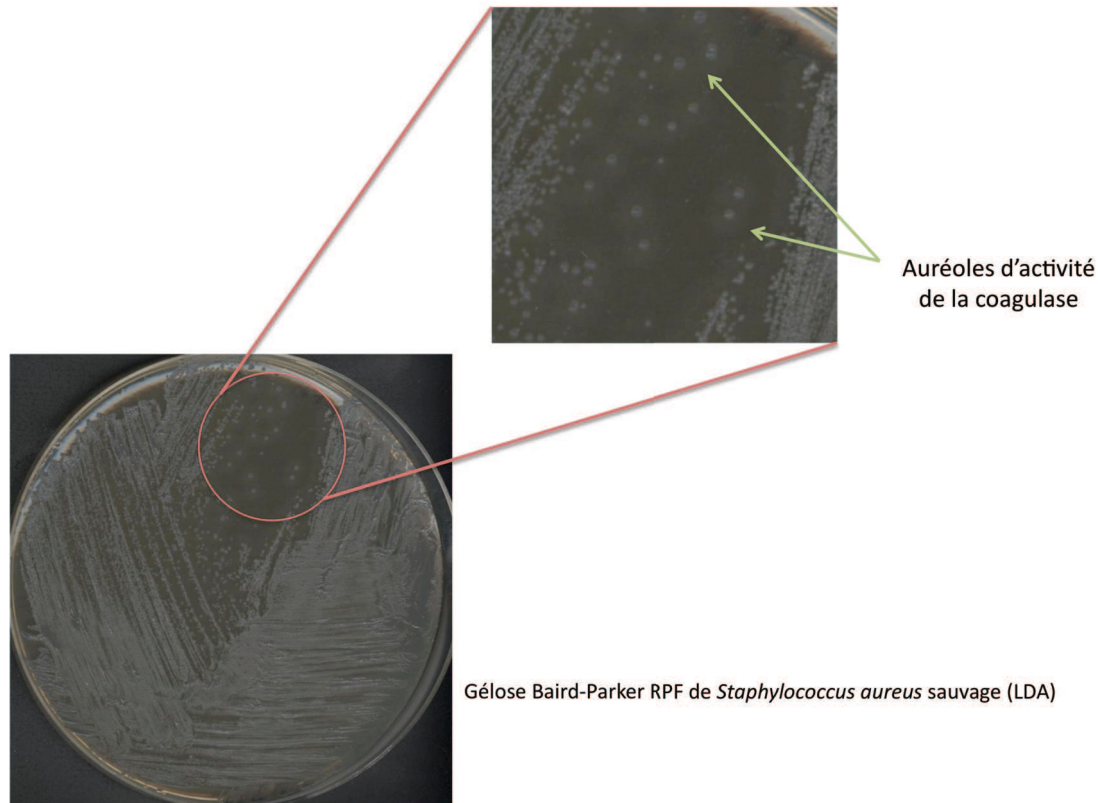


Figure 56 : Etalement de *S. aureus* sauvage (LDA) sur agar Baird-Parker RPF.

Les staphylocoques à coagulase positive sont caractérisés par la formation de colonies noires ou grises, entourées d'un halo opaque de fibrine, bien visible et stable dans le temps. La souche *S. aureus* sauvage présente ces caractéristiques après 48 h d'incubation sur gélose Baird Parker RPF (Figure 56). Sur les géloses Baird Parker simple, aucun halo clair ou opaque n'a été observé après 48h d'incubation. La caractérisation de cette souche est résumée dans le Tableau 25:

<i>Staphylococcus aureus</i>	Milieu sélectif	
	Géloses BP	Géloses BP+ RPF
Sauvage (LDA)	colonies noires pas de halo clair aucune zone opaque	colonies grises halo clair
	<b>lipoprotéinase (-)</b> <b>lécithinase (-)</b>	<b>coagulase (+)</b>

Tableau 25 : Caractérisation de la souche sauvage de *S. aureus* provenant du Laboratoire Départemental d'Analyses.

Ces résultats confirment que le staphylocoque doré sauvage fourni par le Laboratoire Départemental d'Analyses du Tarn est coagulase positif.

<i>Staphylococcus aureus</i>	Milieu sélectif	
	Gélose BP	Gélose BP+RPF
CIP 53156	colonies noires halo clair aucune zone opaque	colonies grises halo clair
	<b>lipoprotéinase (+)</b> <b>lécithinase (-)</b>	<b>coagulase (+)</b>
Sauvage (ENFA)	colonies noires halo clair aucune zone opaque	colonies grises halo clair
	<b>lipoprotéinase (+)</b> <b>lécithinase (-)</b>	<b>coagulase (+)</b>

Tableau 26 : Activités enzymatiques des souches référencée et sauvage de *S. aureus*.

Contrairement à la souche sauvage fournie par le LDA, les staphylocoques dorés issus de l'institut Pasteur et de l'ENFA produisent une lipoprotéinase active (Tableau 26).

Les trois souches de *S. aureus* sont coagulase positives.

## 1.2 Application du test MTT sur bactéries

### 1.2.1 Préparation du venin

Des réservoirs à venin (400 environ) sont isolés par microdissection pour constituer la solution à tester après solubilisation dans une solution de PBS 1X stérile. Une solution d'endopeptidase K, appelée aussi Protéinase K, est préparée en parallèle pour tester l'activité biologique du venin après digestion enzymatique des peptides. La protéinase K est une sérine protéase, isolée du champignon *Tritirachium album*, qui dégrade de nombreuses de protéines.

L'hypothèse que le venin de *Tetramorium bicarinatum* est un venin essentiellement peptidique s'appuie sur une étude datant de la fin des années 80 (Von Sicard *et al.*, 1989). Cette dernière a révélé que le venin d'une autre espèce du genre *Tetramorium* (*T. caespitum*) contenait essentiellement des peptides ainsi que des acides aminés libres.

#### ⇒ Souches de terrain

Les souches de terrain testées sont : une enterobacter (*E. coli* K99), deux staphylocoques (*S. aureus* et *S. xylosus*) ainsi qu'une listeria (*L. monocytogenes*). La Figure 57 montre un exemple de plaques 96 puits obtenues après le test MTT :



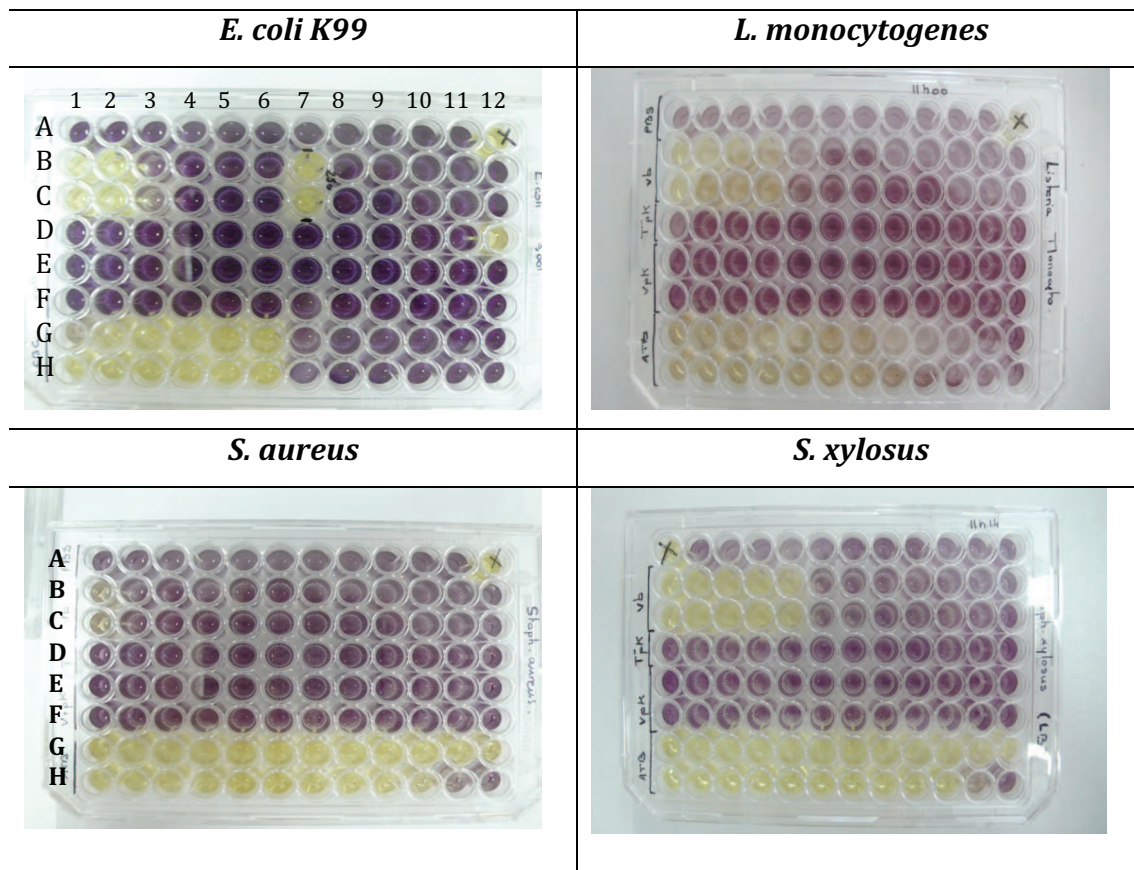


Figure 57 : Plaques 96-puits après le test MTT sur les souches de terrains.

A : Témoin négatif (tampon PBS) ; B-C : venin brut de 500 à 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (colonne 1 à 12), colonne 7 ligne B et C de la plaque *E. coli* K99 : [venin] = 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , point de gamme testé de nouveau; D : témoin protéinase K ; E-F : venin traité protéinase K; G-H : témoins positifs (pénicilline/streptomycine). Lignes A à H préparées par dilutions sériées.



Détermination des  $CI_{50}$  du venin brut

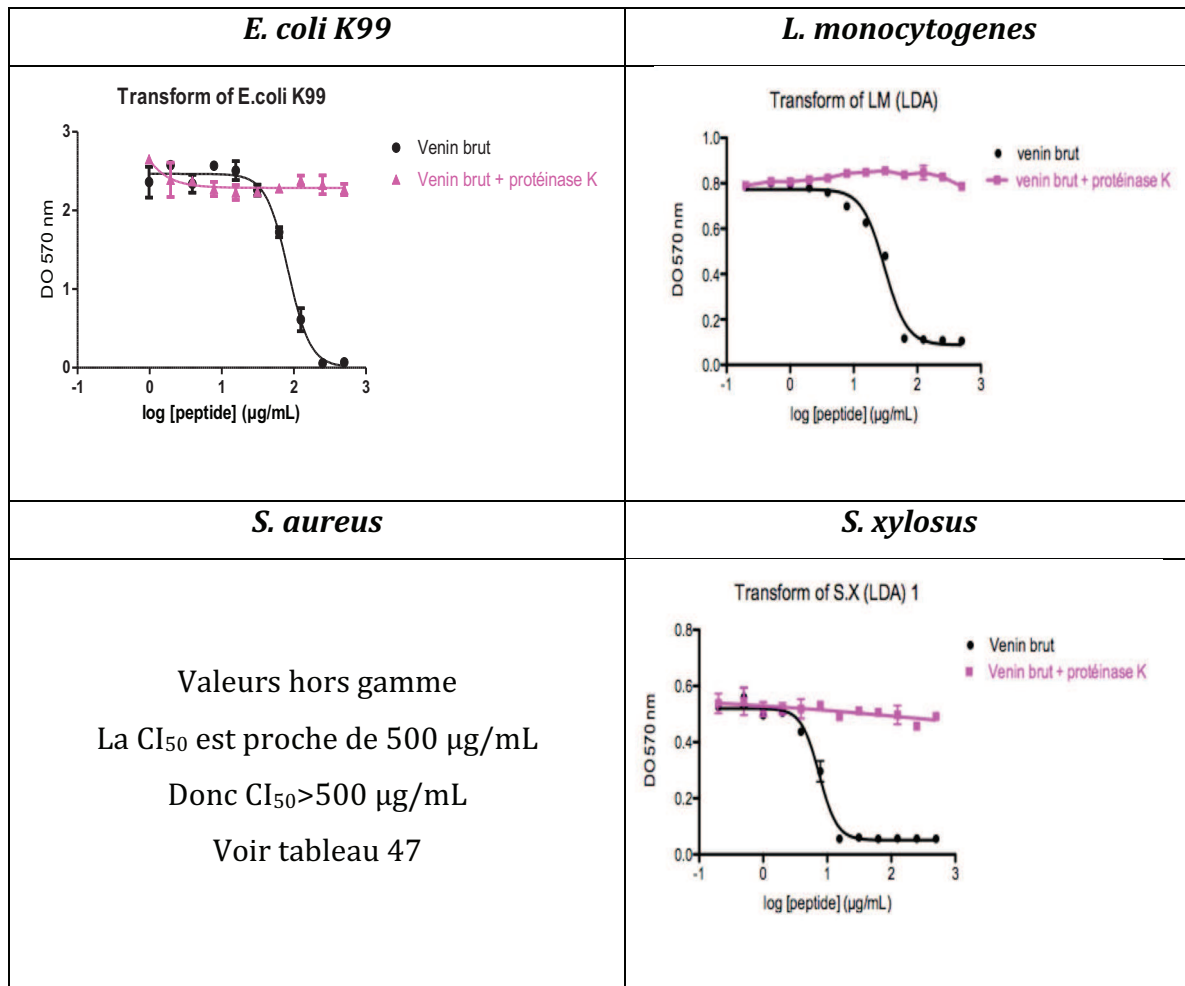


Figure 58 : Courbes "dose-effet" du venin brut et du venin en présence de protéinase K sur des souches sauvages.

L'effet de la protéinase K annule l'activité antibactérienne chez les quatre micro-organismes testés.

La protéinase K seule n'interfère pas dans la croissance bactérienne comme le montrent les puits témoins « Protéinase K » sur les plaques 96 puits. L'action de cette enzyme sur le venin brut induit cependant une perte d'activité de ce dernier sur nos quatre souches. Les composés responsables de l'activité antibactérienne du venin brut seraient donc de nature protéique. Le venin brut présente une faible activité antibactérienne sur la souche sauvage de *S. aureus* puisque sa  $CI_{50}$  est de 500 µg/mL.

*Staphylococcus xylosus* fait partie du groupe des staphylocoques à coagulase négatives qui sont connus pour être nettement plus sensibles aux antibiotiques que les staphylocoques dorés. Cette caractéristique est confirmée avec le venin brut. Les différentes  $CI_{50}$  calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (5.0) sont listées dans le Tableau 27:

			Composé testé
			Venin brut CI <sub>50</sub> en µg/mL
Souches de terrain testées	<i>E. coli</i> K99	Moyenne	<b>81,39</b>
		Ecart-type	2,67
	<i>L. monocytogenes</i>	Moyenne	<b>29,54</b>
		Ecart-type	1,32
	<i>S. aureus</i>	Moyenne	<b>&gt;500</b>
		Ecart-type	-
	<i>S. xylosus</i>	Moyenne	<b>8,94</b>
		Ecart-type	2,05

Tableau 27 : CI<sub>50</sub> du venin brut calculées pour chaque souche sauvage.

### 1.2.2 Souches référencées

Les témoins positifs choisis pour les mycobactéries et l'enterobactérie sont respectivement la ciproflaxine et la carbenicilline.

Détermination des CI<sub>50</sub> :

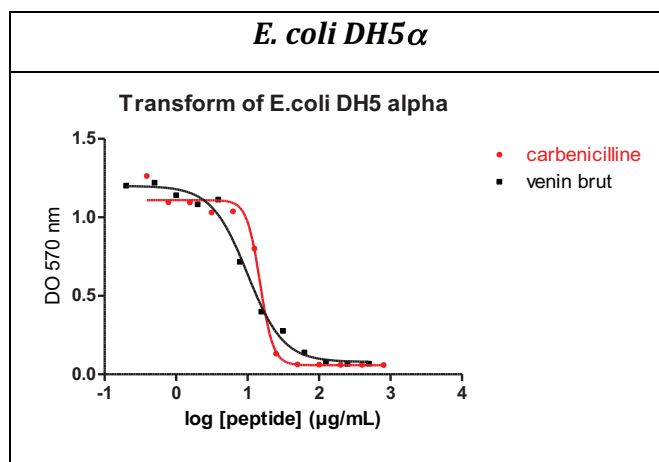


Figure 59 : Courbe « dose-effet » du venin brut et de la carbenicilline sur *E. coli* DH5 α.

La Figure 59 permet la comparaison des courbes « dose-effet » du venin brut (tracé noir) et de la carbenicilline (tracé rouge) sur *E. coli* DH5α. Elle montre une efficacité de la carbenicilline supérieure au venin puisqu'à plus faibles concentrations cette dernière inhibe 100% de la population bactérienne.

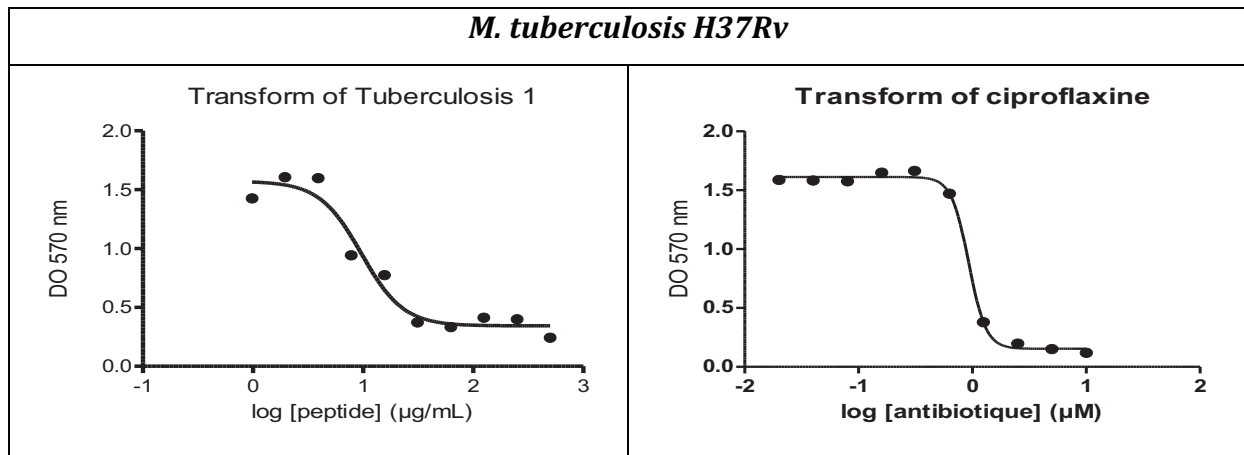


Figure 60 : Courbes "dose-effet" du venin brut et de la ciprofloxacine sur *M. tuberculosis* H37Rv.

Pour la souche *M. tuberculosis* H37Rv (Figure 60), le venin brut présente une activité antibactérienne assez faible par rapport à celle de l'antibiotique de référence : la ciprofloxacine. Dans le cas de *Mycobacterium smegmatis*, nous n'observons pas d'effet exploitable dans la gamme testée (Tableau 28).

		<b>Composé testé</b>	
		<b>Venin brut</b> <b>CI<sub>50</sub> en µg/mL</b>	
<b>Souches référéncées testées</b>	<b><i>M. smegmatis</i></b> <i>(mc<sup>2</sup> 155, ATCC 700084)</i>	Moyenne	<b>&gt;500</b>
		Ecart-type	-
	<b><i>M. tuberculosis</i></b> <i>(H37Rv)</i>	Moyenne	<b>8,78</b>
		Ecart-type	<i>1,22</i>
	<b><i>E. coli</i> DH5α</b>	Moyenne	<b>14,95</b>
		Ecart-type	<i>1,16</i>

Tableau 28 : CI<sub>50</sub> du venin brut calculées pour les souches bactériennes référéncées.

Les tableaux 40 et 41 résument les résultats obtenus avec le venin brut de *T. bicarinatum*. Ce dernier possède une activité antibactérienne plus ou moins importante sur une gamme ouverte de bactéries Gram+ et Gram-.

L'activité du venin brut ayant été démontrée sur différentes souches de microorganismes, nous avons déroulé toutes les étapes qui mènent à l'identification de la ou des molécule(s) responsable(s) de cette activité.

---

## 2 Identification des molécules d'intérêt

---

### 2.1 Analyse du venin de *T. bicarinatum* par LC-MS

---

Les premiers travaux de l'analyse du venin ont été de contrôler l'homogénéité et la reproductibilité des profils chromatographiques obtenus à partir de différents échantillonnages. Pour cela, nous avons réalisé un prélèvement de 60 glandes (3x20) d'ouvrières dans les trois nids de notre élevage. Cette opération a été conduite trois fois et les trois chromatogrammes de masse obtenus sont présentés dans la Figure 61.

Les deux premiers chromatogrammes sont superposables. La seule différence observée se trouve au niveau de l'intensité de certains pics. Dans le premier lot, le pic le plus intense se situe à 36,90 minutes alors que dans le deuxième lot, c'est celui à 23,72 minutes qui est le plus intense. En plus de la variabilité au niveau des intensités, le troisième lot met en évidence trois autres composés en fin de chromatogramme entre 38 et 40 minutes. Cette légère différence pourrait être liée à l'âge des ouvrières prélevées ; cette hypothèse reste à démontrer. Ainsi, nous avons identifié une trentaine de composés dont les masses varient de 615,27 à 4020,43 Da (Tableau 29).

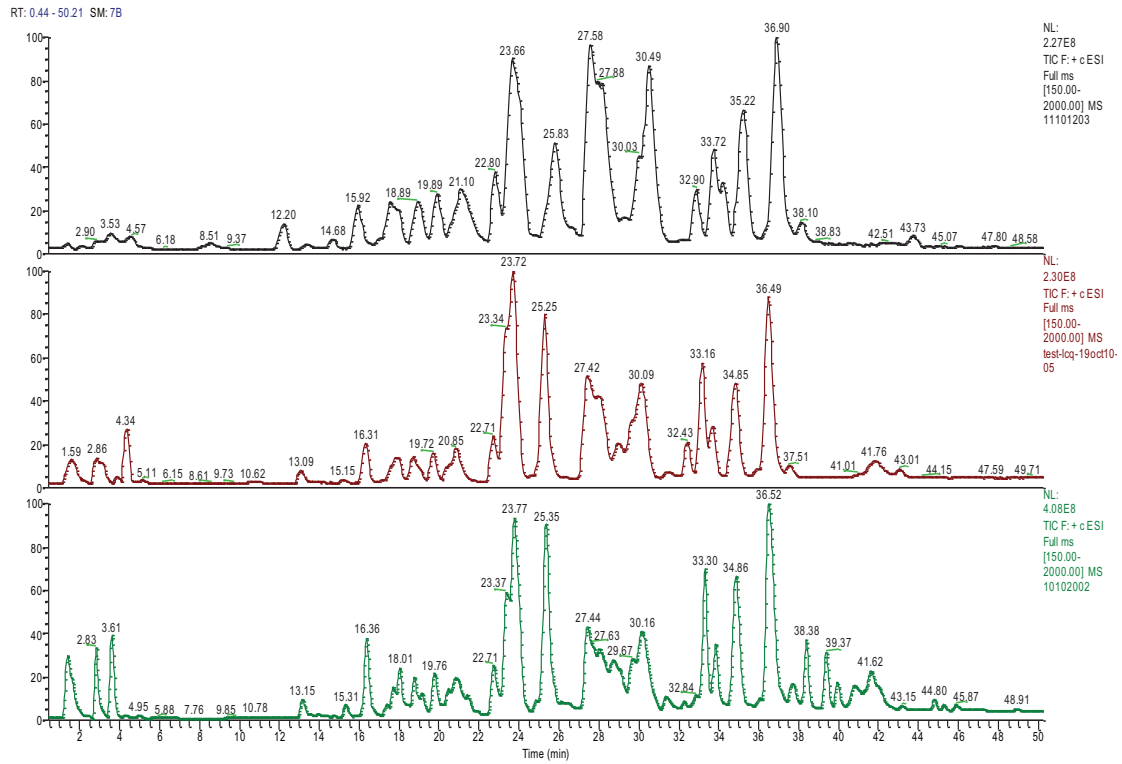


Figure 61 : Chromatogrammes réalisés en LC-MS des 3 prélèvements de venin brut de *Tetramorium bicarinatum*.

TR (min)	Venin brut de <i>T. bicarinatum</i> Prélèvements 1 et 2				Masse calculée	Venin brut de <i>T. bicarinatum</i> Prélèvement 3			
	Z=4	Z=3	Z=2	Z=1		Z=1	Z=2	Z=3	Z=4
1,36	-	-	779,35	1556,67	<b>1555,68</b>	-	779,03	-	-
2,81	-	891,79	1336,62	-	<b>2671,55</b>	-	1336,61	891,46	-
2,81	-	-	968,10	1934,88	<b>1933,99</b>	1934,88	968,1	-	-
3,65	-	-	-	616,25	<b>615,27</b>	616,29	-	-	-
12,14	798,18	1063,87	1595,87		<b>3189,01</b>		-		
14,68	-	568,06	851,54	-	<b>1715,56</b>	-	851,52	568,12	-
15,92	-	-	527,41	1053,39	<b>1052,60</b>	1053,39	527,41	-	-
15,92	-	-	858,88	1715,72	<b>1714,72</b>	1715,78	859,37	-	-
15,92	-	-	649,09	1296,75	<b>1295,96</b>	1296,75	649,09	-	-
17,41	-	-	810,29	1619,78	<b>1618,72</b>	1619,82	810,34	-	-
17,83	-	869,55	1303,62	-	<b>2605,57</b>	-	1303,65	869,69	-
18,83	-	926,00	1388,05	-	<b>2774,38</b>	-	1388,06	925,76	-
19,84	-	952,39	1427,67	-	<b>2853,72</b>	-	1427,70	952,32	-
21,15	1005,95	1341,06	-	-	<b>4020,43</b>	-	-	1341,13	1006,34
22,75	-	671,00	1005,53	-	<b>2009,42</b>	-	1005,61	670,80	-
23,46	554,22	738,80	1107,54	-	<b>2213,20</b>	-	1107,55	738,74	554,23
23,88	-	-	786,83	1571,96	<b>1571,30</b>	1571,96	786,80	-	-
25,83	-	-	-	940,43	<b>939,43</b>	940,44	-	-	-
27,73	831,95	1109,36	1663,19	-	<b>3324,66</b>	-	1663,22	1109,24	831,92
29,97	-	-	968,75	1936,20	<b>1935,35</b>	1936,22	968,56	-	-
29,97	-	-	646,05	1291,26	<b>1290,18</b>	1291,82	646,12	-	-
30,59	-	-	972,14	1942,87	<b>1941,90</b>	1942,15	972,15	-	-
30,59	-	-	648,88	1295,38	<b>1295,07</b>	1295,45	648,87	-	-
32,81	-	788,74	1182,41	-	<b>2363,02</b>	-	1181,40	788,72	-
33,71	-	-	826,76	1651,88	<b>1651,20</b>	1651,85	826,78	-	-
34,24	-	-	826,83	1651,79	<b>1651,21</b>	1651,78	826,81	-	-
35,22	660,31	880,15	1319,57	-	<b>2637,64</b>	-	1319,57	880,61	660,28
36,85	-	829,43	1243,34	-	<b>2485,29</b>	-	1243,43	829,78	-
<b>38,38</b>					<b>1206,58</b>	<b>1207,58</b>	<b>604,25</b>		
<b>39,37</b>					<b>1408,62</b>	<b>1409,62</b>	<b>705,66</b>		
<b>39,91</b>					<b>1408,59</b>	<b>1409,59</b>	<b>705,66</b>		

**Tableau 29 : masses m/z et masses moléculaires des composés présents dans les divers lots de venin brut de *T. bicarinatum*.**

TR est le temps de rétention ; les masses surlignées en bleu sont celles des molécules présentes uniquement dans le prélèvement 3 du venin brut.

La présence d'un grand nombre d'ions multichargés, conforte l'hypothèse de la nature peptidique du venin brut de *Tetramorium bicarinatum*.

Les limites de détection de la trappe à ions LCQ Advantage (masse m/z < 2000 Da) ne permettent pas de détecter les composés de masse élevée comme les protéines, susceptibles d'être présents dans le venin. Une analyse complémentaire du venin brut a donc été effectuée sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE.

## 2.2 Recherche de protéines dans le venin

Le venin brut, le venin traité avec la protéinase K et le culot protéique obtenu après précipitation au TCA ont été analysés sur un gel SDS-PAGE 16% (Figure 62).

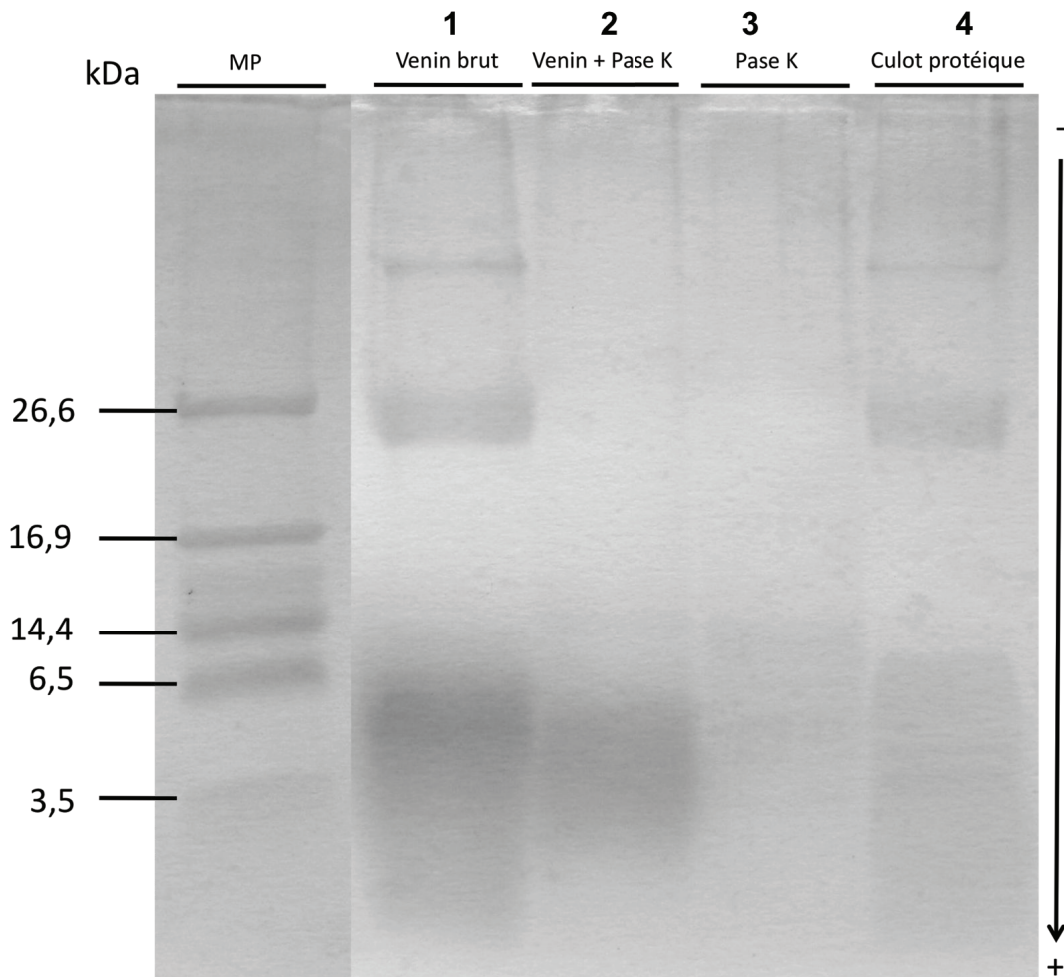


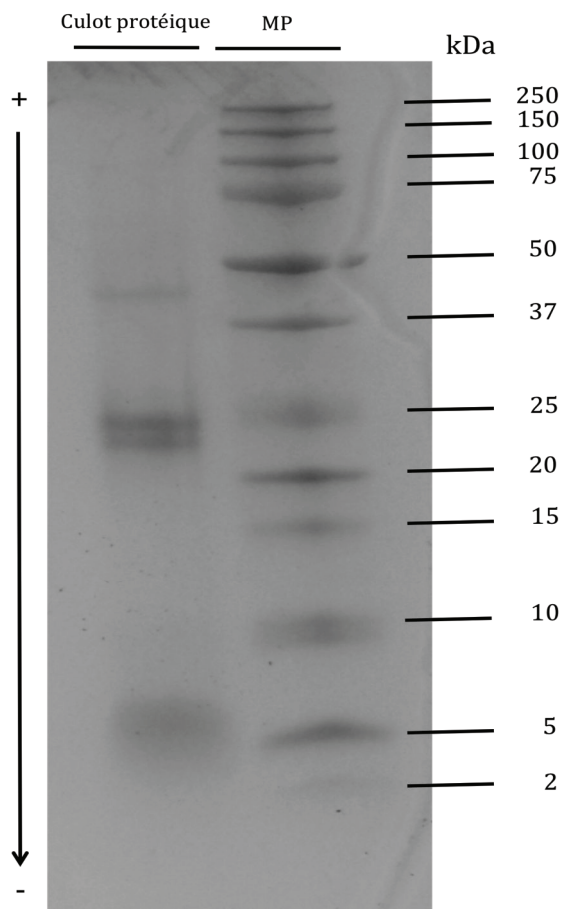
Figure 62 : Gel SDS-PAGE 16% du venin brut (1), du venin brut traité à la protéinase K (2), de la protéinase K (3), du culot protéique du venin (4) et du marqueur de taille (MP).

L'analyse SDS-PAGE du venin brut (piste 1) a révélé la présence de trois groupes de protéines :

- une protéine avec un poids moléculaire nettement supérieur à 26 kDa.
- deux protéines dont le poids moléculaire est compris entre 17 et 26 kDa.
- un ensemble de petits peptides dont la masse moléculaire est inférieure à 6,5 kDa.

La présence de « smear » persistant au niveau des faibles poids moléculaires (piste 2) peut être expliquée par la présence de sels ou autres biomolécules.

En comparant le profil électrophorétique du culot protéique (piste 4) avec celui du venin brut (piste 1), nous avons remarqué une atténuation du phénomène de « smear ». On pourrait conclure que la précipitation puis les lavages successifs lors de la préparation du culot protéique ont contribué à une meilleure lisibilité de l'électrophorogramme. De plus, le marqueur de taille utilisé ne couvrant pas toute la zone de masse du venin brut, nous avons refait une électrophorèse SDS-PAGE du culot protéique avec un marqueur de taille allant des faibles masses (2 kDa) aux masses plus élevées (250 kDa).



**Figure 63 : Gel SDS-PAGE 16% du culot protéique du venin brut.**

Le marqueur de poids moléculaire (MP) est du « Precision Plus Protein Dual Xtra standards » (BioRad).

Ainsi, nous obtenons une meilleure estimation de la masse moléculaire des protéines de petite taille et peptides présents dans le venin. Sur ce gel (Figure 63), nous retrouvons les trois groupes de protéines détectés sur le gel de la Figure 62. La protéine présentant une masse moléculaire supérieure à 26,6 kDa constitue le seul composé de haute masse moléculaire estimée environ à 45 kDa (Figure 63). Les deux protéines situées au niveau des masses intermédiaires ont une masse moléculaire d'environ 25 kDa.



---

Les petits composés, visibles sur le gel, présentent une masse moléculaire autour de 5 kDa. Le venin de *T. bicarinatum* comprend donc à la fois des petits peptides et des protéines de haut poids moléculaire (45 kDa maximum).

A l'aide des filtres AMICON, nous avons séparé ces composés en fonction de leur taille et testé l'activité antibactérienne de chaque groupe.

---

### 2.3 Fractionnement du venin par filtres AMICON

---

Suite aux résultats obtenus par SDS-PAGE, nous avons effectué un pré-fractionnement du venin brut par tamisage moléculaire à l'aide de filtres à centrifuger AMICON® (millipore) présentant un cut-off de 3 et 10 kDa. Cette première étape a permis d'isoler trois fractions A, B et C :

- La fraction A contient les molécules du venin dont le poids moléculaire est supérieur ou égal à 10 kDa.
- La fraction B regroupe les molécules du venin dont le poids moléculaire est compris entre 3 et 10 kDa.
- La fraction C contient les petites molécules du venin qui ont traversé le filtre de 3 kDa de cut-off.

⇒ **Analyse des fractions A, B et C par électrophorèse SDS-PAGE**

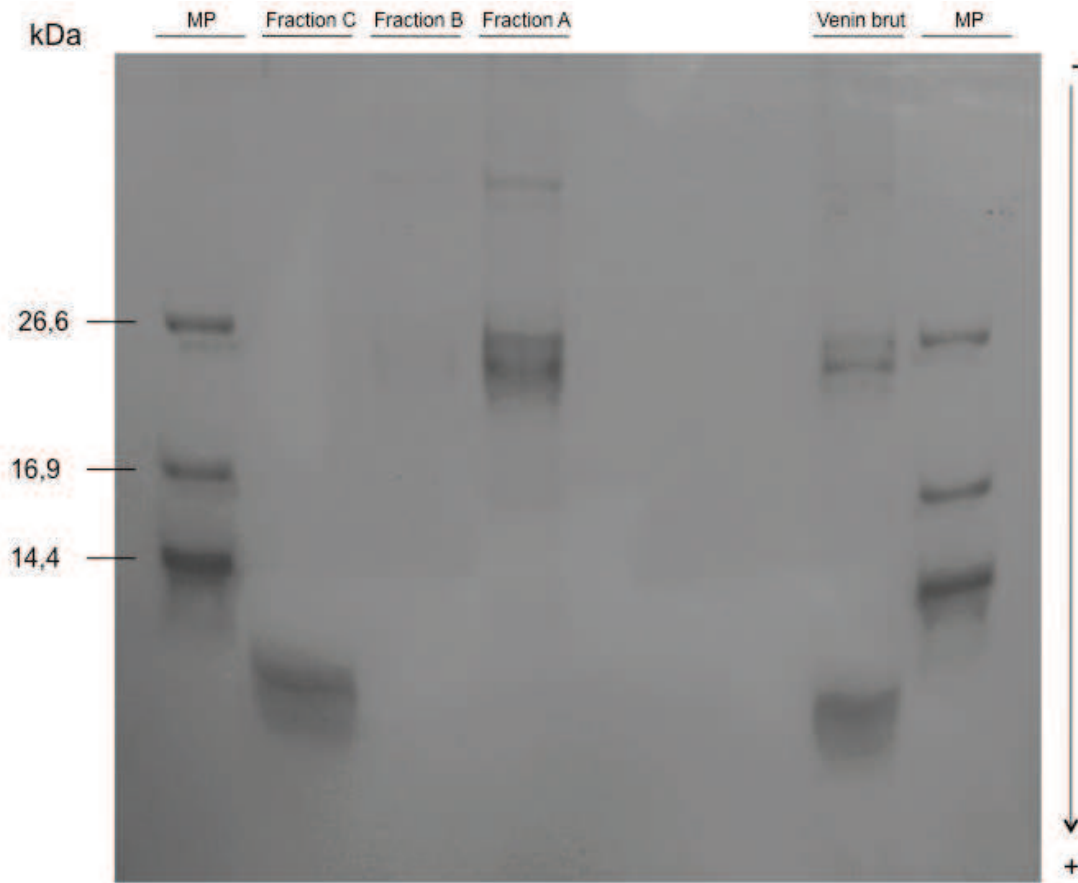


Figure 64 : Gel SDS-PAGE 16% du venin brut et des trois fractions A, B et C obtenues après fractionnement à l'aide du système AMICON®.

MP : marqueur de taille

L'analyse du gel SDS-PAGE des fractions A, B et C (Figure 64) a montré que :

- Les protéines d'un poids moléculaire supérieur à 10 kDa sont présentes uniquement dans la fraction A ; ce résultat était attendu au regard du cut-off du filtre utilisé.
- Les peptides de faible masse moléculaire (< 6 kDa) se sont retrouvés exclusivement dans la fraction C.
- La fraction B n'a montré aucune trace de peptide.

L'observation de ce gel nous permet de remarquer que la somme des fractions A et C correspond au venin brut ce qui nous permet de valider la méthode de fractionnement par les filtres AMICON.

Contrairement au principe de l'électrophorèse SDS-PAGE qui sépare les protéines et peptides dénaturés selon leur masse moléculaire, celui du système AMICON est basé sur le volume qu'occupent les protéines en fonction de leur conformation spatiale. Un peptide de conformation spatiale très compacte, passera facilement à travers une

membrane présentant un cut-off de 3 kDa même si sa masse moléculaire évaluée en gel SDS-PAGE est supérieure.

Afin de préciser la masse réelle des peptides identifiés par électrophorèse, une analyse de chaque fraction a été conduite par LC-MS.

⇒ Profil massique des fractions A, B et C

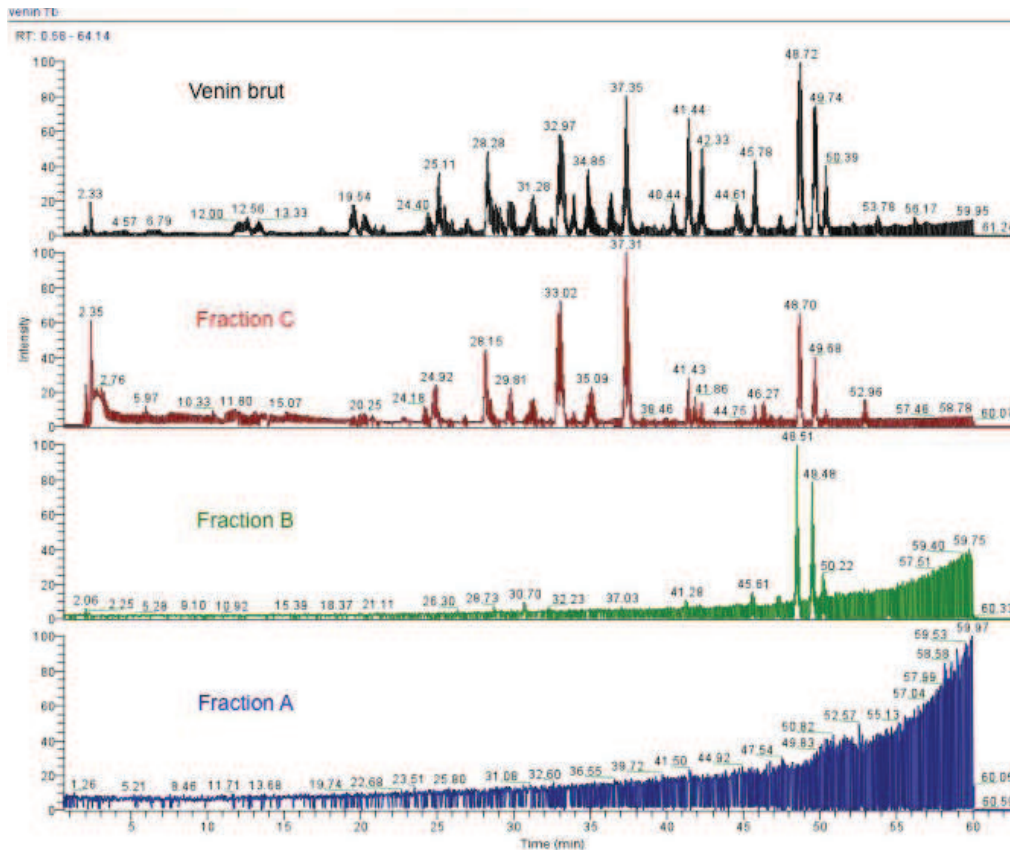


Figure 65 : TIC des différentes fractions A, B et C en LC-MS.

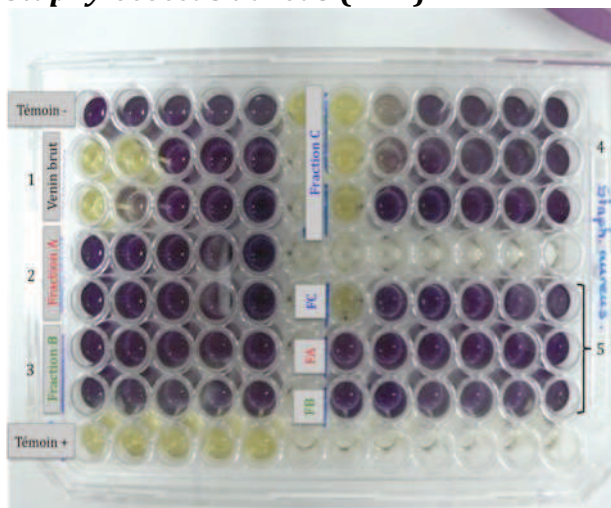
La fraction A est la fraction qui contient les molécules dont la masse moléculaire est supérieure à 10 kDa. L'absence d'ions sur le chromatogramme de masse de cette fraction est un résultat attendu (Figure 65). En effet, la gamme de masse de la trappe ionique étant limitée à  $m/z$  2000, les molécules monochargées supérieures à cette masse ne peuvent être détectées par cet analyseur. Notons également qu'il est difficile d'éluer des protéines de masse moléculaire importante sur une colonne C18. La fraction B laisse apparaître deux pics de très faible intensité aux alentours de 49 min. Ces derniers, également présents dans la fraction C et apparemment majoritaires dans le venin, résultent probablement d'une « rémanence » au sein du filtre AMICON.

La fraction C présente un profil proche de celui du venin brut. Ceci est relativement logique compte tenu du fait que la trappe ionique ne nous permet pas de détecter les ions monochargés de masse  $m/z$  supérieure à 2 kDa. En observant attentivement ce profil, nous remarquons que certains pics sont d'une intensité très atténuée par rapport au venin brut. Les trois fractions ont été testées sur les deux souches de staphylocoques fournies par le Laboratoire Départemental d'Analyses.

⇒ **Activité antibactérienne des fractions A, B et C**

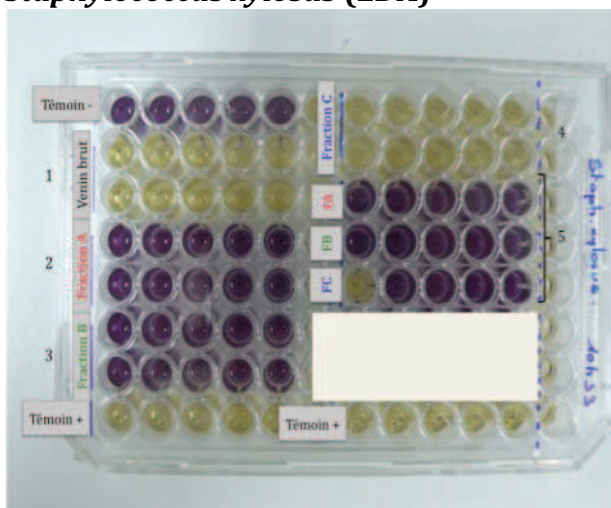
Chaque fraction a été testée sur *S. aureus* et *S. xylosus* afin de suivre leur activité antibactérienne (Figure 66). Les fractions ont été préalablement concentrées pour revenir à la concentration initiale des solutions de venin brut.

***Staphylococcus aureus* (LDA)**



Les deux lignes (1) représentent le contrôle venin brut. Les fractions A (2) et B (3) sont inactives. La fraction C (4) est active sur *S. aureus* à une concentration de 500 µg/mL. Sa CI<sub>50</sub> est égale à 500 µg/mL. Les lignes (5) montrent les mêmes résultats avec un lot de venin conservé au congélateur à -20°C durant 15 jours.

***Staphylococcus xylosus* (LDA)**



Même organisation de la plaque que ci-dessus. Seule la fraction C (4) présente la même activité que le venin brut. C'est la seule fraction à inhiber la croissance des *S. xylosus*. L'effet est total, même à faible dilution.

Figure 66 : Evaluation de l'activité antibactérienne des Fraction A, B et C sur les staphylocoques sauvages.

Les témoins négatifs et positifs sont respectivement du PBS et un mélange d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine).

A l'issue du fractionnement AMICON, seule la fraction C présente une activité antibactérienne sur les deux souches de staphylocoques (Figure 66). Cette activité est similaire à celle du venin brut. Cette fraction a donc été analysée par LC-MS et son profil chromatographique comparé à celui du venin brut.

### **2.3.1 Comparaison des profils du venin brut et de la fraction C**

A la suite du test antibactérien, nous avons comparé le profil chromatographique de la fraction C avec celui du venin brut. Chacun des chromatogrammes a été acquis simultanément en balayage total (full scan) et en mode « zoom scan » qui nous permet d'avoir l'état de charge de chaque ion. Ils sont tout à fait superposables et ne diffèrent que par l'intensité de certains pics. La Figure 67 présente les deux chromatogrammes obtenus.

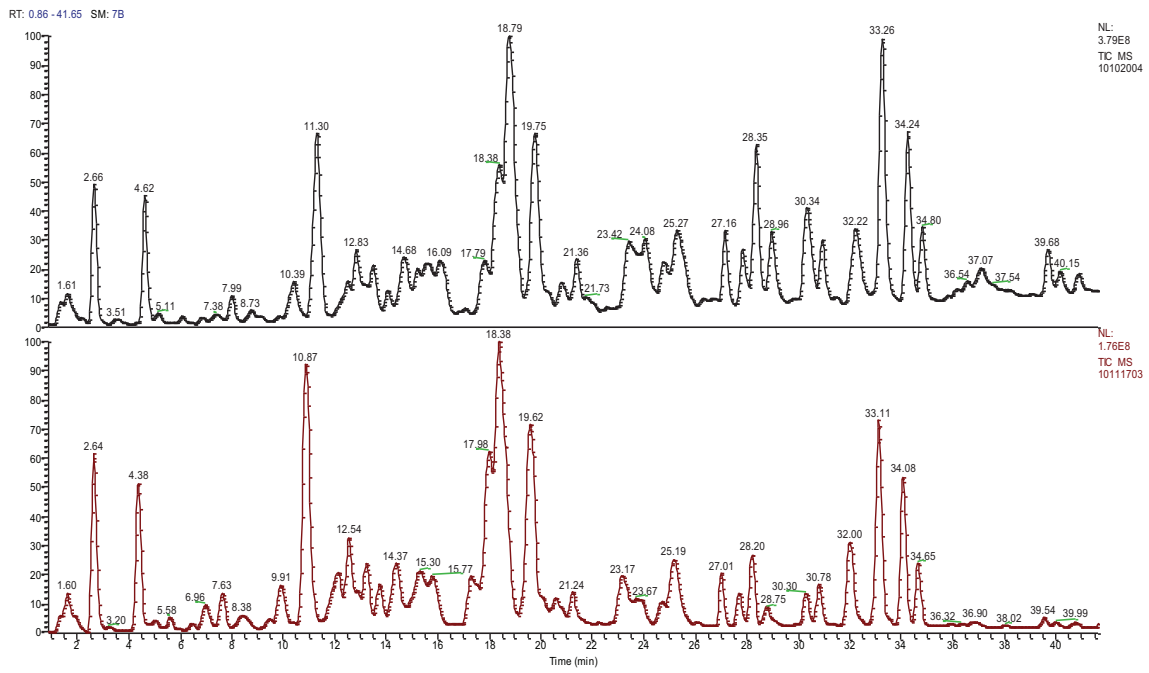


Figure 67 : Chromatogramme de masse (LC-ESI-MS) TIC du venin brut (A) et de la fraction C (B) de *T. bicarinatum*.

Le TIC du venin brut est en noir, celui de la fraction C en rouge.

TR en min	Venin brut de <i>T. bicarinatum</i>				Masse calculée	Fraction C			
	Z= 4	Z=3	Z= 2	Z= 1		Z= 1	Z= 2	Z= 3	Z= 4
1,60	-	-	779,35	1556,67	<b>1555,68</b>	-	779,03	-	-
2,66	-	891,79	1336,62	-	<b>2671,55</b>	-	1336,61	891,46	-
2,66	-	-	968,10	1934,88	<b>1933,99</b>	1934,88	968,10	-	-
4,62	-	-	-	616,25	<b>615,27</b>	616,29	-	-	-
7,99	798,18	1063,87	-	-	<b>3189,01</b>	-	-	1063,87	798,18
10,39	-	568,06	851,54	-	<b>1715,56</b>	-	851,52	568,12	-
11,30	-	-	527,41	1053,39	<b>1052,60</b>	1053,39	572,41	-	-
11,30	-	-	858,88	1715,72	<b>1714,72</b>	1715,78	859,37	-	-
11,30	-	-	649,09	1296,75	<b>1295,96</b>	1296,75	649,09	-	-
12,52	-	-	810,29	1619,78	<b>1618,72</b>	1619,82	810,34	-	-
12,81	-	869,55	1303,62	-	<b>2605,57</b>	-	1303,65	869,69	-
13,58	-	926,00	1388,05	-	<b>2774,38</b>	-	1388,06	925,76	-
14,68	-	952,39	1427,67	-	<b>2853,72</b>	-	1427,70	952,32	-
15,63	1005,95	1341,06	-	-	<b>4020,43</b>	-	-	1341,13	1006,34
17,81	-	671,00	1005,53	-	<b>2009,42</b>	-	1005,61	670,80	-
18,38	554,22	738,80	1107,54	-	<b>2213,20</b>	-	1107,55	738,74	554,23
18,79	-	-	786,83	1571,96	<b>1571,30</b>	1571,96	786,80	-	-
19,75	-	-	-	940,43	<b>939,43</b>	940,44	-	-	-
23,40	831,95	1109,36	1663,19	-	<b>3324,66</b>	-	1663,22	1109,24	831,92
24,81	-	-	968,75	1936,20	<b>1935,35</b>	1936,22	968,56	-	-
24,81	-	-	646,05	1291,26	<b>1290,18</b>	1291,82	646,12	-	-
25,25	-	-	972,14	1942,87	<b>1941,90</b>	1942,15	972,15	-	-
25,25	-	-	648,88	1295,38	<b>1295,07</b>	1295,45	648,87	-	-
28,30	-	-	826,76	1651,88	<b>1651,20</b>	1651,85	826,78	-	-
28,88	-	-	826,83	1651,79	<b>1651,21</b>	1651,78	826,81	-	-
30,29	660,31	880,15	1319,57	-	<b>2637,64</b>	-	1319,57	880,61	660,28
32,20	-	829,43	1243,34	-	<b>2485,29</b>	-	1243,43	829,78	-
33,21	-	-	604,25	1207,58	<b>1206,58</b>	1207,58	604,25	-	-
34,17	-	-	705,66	1409,62	<b>1408,62</b>	1409,62	705,66	-	-
34,80	-	-	705,66	1409,59	<b>1408,59</b>	1409,59	705,66	-	-

**Tableau 30 : Masses  $m/z$  et masses moléculaires des composés du venin brut et de la fraction C.**

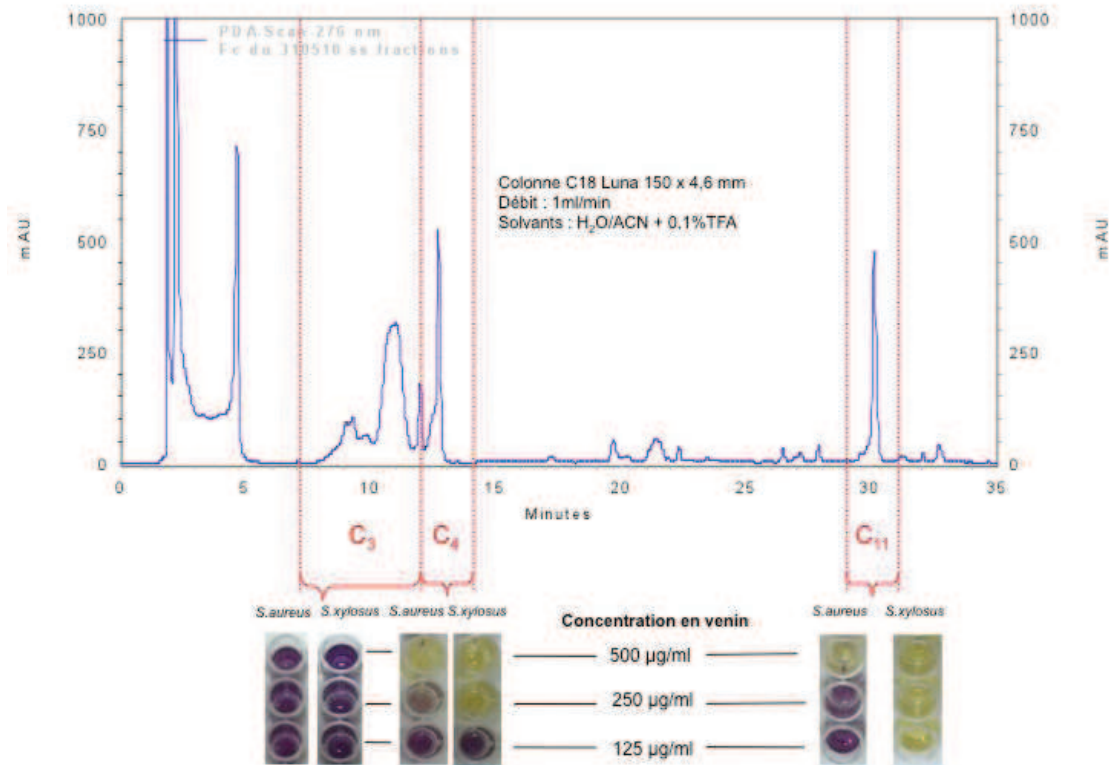
Le léger décalage au niveau des temps de rétention par rapport au tableau 49 est dû aux conditions de fractionnement où la colonne utilisée à un diamètre de 4,60 mm et le débit est de 1mL/min.

Le Tableau 30 liste les différentes masses  $m/z$  présentes dans le venin brut et la fraction C. La masse de chacun des 31 produits identifiés est calculée à partir des différents ions observés sur les spectres de masse. Les masses varient de 615 à 4020 Da.

## 2.4 Sous-fractionnement par HPLC

La chromatographie semi-préparative de la fraction C a été utilisée pour récolter 15 sous-fractions (C1 à C15) afin d'isoler la ou les activités biologiques. Ce fractionnement a été conduit par HPLC en phase inverse munie d'un détecteur à barrette de diodes. Chaque sous-fraction a été testée pour son activité biologique sur les différents staphylocoques.





**Figure 68 : Sous-fractionnement de la fraction C par HPLC-DAD.**

L'activité antibactérienne de chaque sous-fraction est évaluée par test MTT pour *S. aureus* et *S. xylosois*. Les puits de coloration jaune (fractions C4, C11) indiquent une activité alors que la fraction C3 (par exemple) est inactive. [conditions chromatographiques : gradient linéaire de 10% à 80% d'acétonitrile sur 45 min en milieu 0,1% TFA.

La Figure 68 montre que les sous-fractions C4, C11 possèdent une activité contre les deux staphylocoques testés. Cette expérience a été renouvelée trois fois et seule la sous-fraction C11 a montré une activité antibactérienne reproductible dans le temps. Pour la suite de l'étude la priorité a donc été donnée à l'exploration de la sous-fraction C11.

## 2.5 Analyse de la sous-fraction C11

La sous-fraction C11 a été analysée par infusion directe sur le LCQ-Advantage. On observe sur le spectre de masse résultant un mélange de deux composés dont le premier est représenté par les ions dichargés et trichargés, respectivement à  $m/z$  1107,73 et 739,10. Le deuxième est caractérisé par un ion monochargé à  $m/z$  1572,89 puis deux autres ions di et trichargés, respectivement à  $m/z$  787,00 et 525,15 (Figure 69).

Il s'agit certainement de deux peptides, puisque nous les retrouvons dans le spectre de masse du culot protéique.



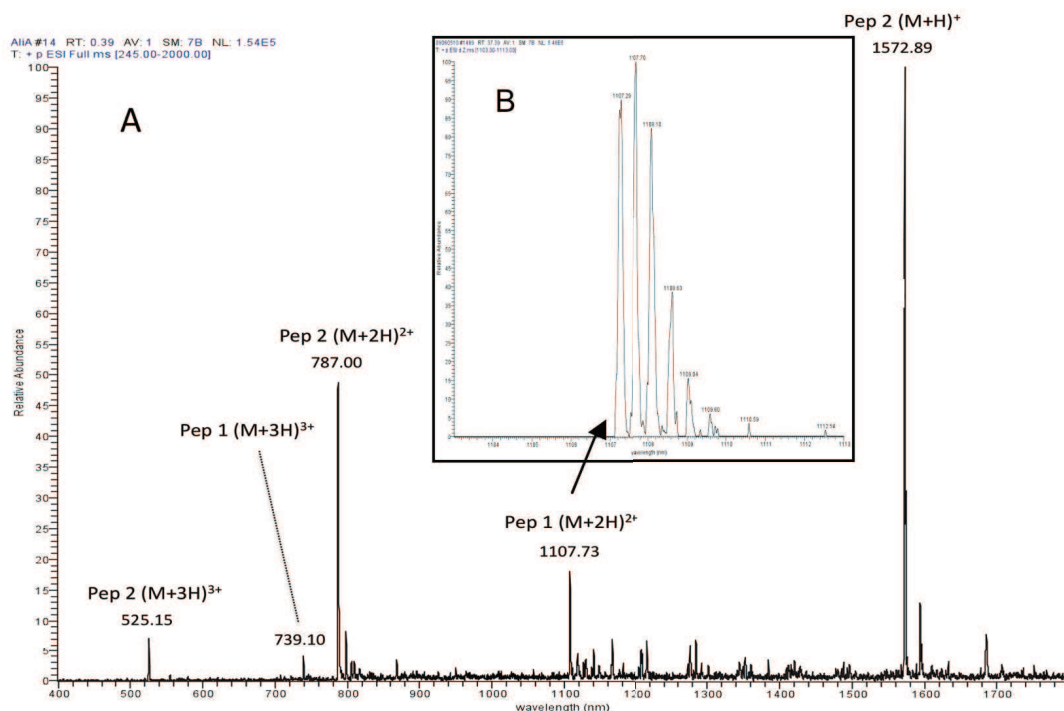


Figure 69 : A- Spectre de masse de la sous fraction C<sub>11</sub> obtenu par infusion sur la trappe ionique 3D. B - zoom scan de l'ion dichargé  $m/z$  1107,73.

A partir du profil isotopique, il est possible de vérifier l'état de charge de chaque composé.

Le médaillon B de la Figure 69 montre le profil isotopique de l'ion dichargé du peptide 1. On remarque que le pic P+1 ( $m/z$  1107,70) apparaît à une demi unité de masse du pic P ( $m/z$  1107,29) signifiant ainsi que ce dernier est doublement chargé.

## 2.6 Séquençage *de novo* des deux peptides

La structure primaire du peptide 2 représenté par les ions monochargé et dichargé à  $m/z$  1572,89 et  $m/z$  787,00 a été élucidée par analyse manuelle des spectres MS/MS obtenus à l'aide de la trappe à ions (LCQ Advantage). Par contre, la structure primaire du peptide 1, représenté par l'ion dichargé à  $m/z$  1107,73 a été déterminée par analyse automatique avec déconvolution à l'aide d'un LTQ-Orbitrap.

### 2.6.1 Séquençage du peptide 2 sur le LCQ Advantage

Les différents paramètres et réglages concernant la fragmentation de l'ion à  $m/z$  1572,89 et celle de l'ion dichargé à  $m/z$  787,00 sont répertoriés dans la partie Matériel et Méthodes (page 157).

Comme le montreront les résultats, l'originalité du peptide en question a conduit, pour déterminer sa séquence, à l'analyse de plusieurs spectres : MS/MS du monochargé et MS/MS du dichargé. Ainsi, bien que la fragmentation des ions multichargés soit généralement préférée pour le séquençage *de novo*, nous avons choisi de commencer avec celle de l'ion monochargé  $m/z$  1572,89 afin de déterminer au plus vite les fragments  $b_{max}$  et  $y_{max}$  pour pouvoir, à partir de ces derniers, identifier l'ensemble des fragments  $y$  et  $b$  présents dans le spectre.

La fragmentation de l'ion monochargé  $m/z$  1572,89 est représentée par le spectre (Figure 70). Le nombre total d'acides aminés du peptide a été estimé en divisant la masse mono isotopique de celui-ci par la masse mono isotopique moyenne des acides aminés :

$-1572.86 / 118 \approx 13$  acides aminés environ. Cette estimation du nombre total d'acides aminés est valable uniquement si la séquence primaire du peptide ne présente pas de modifications post-traductionnelles. En effet, le greffage de certains groupements sur les chaînes latérales des acides aminés fausserait l'estimation.

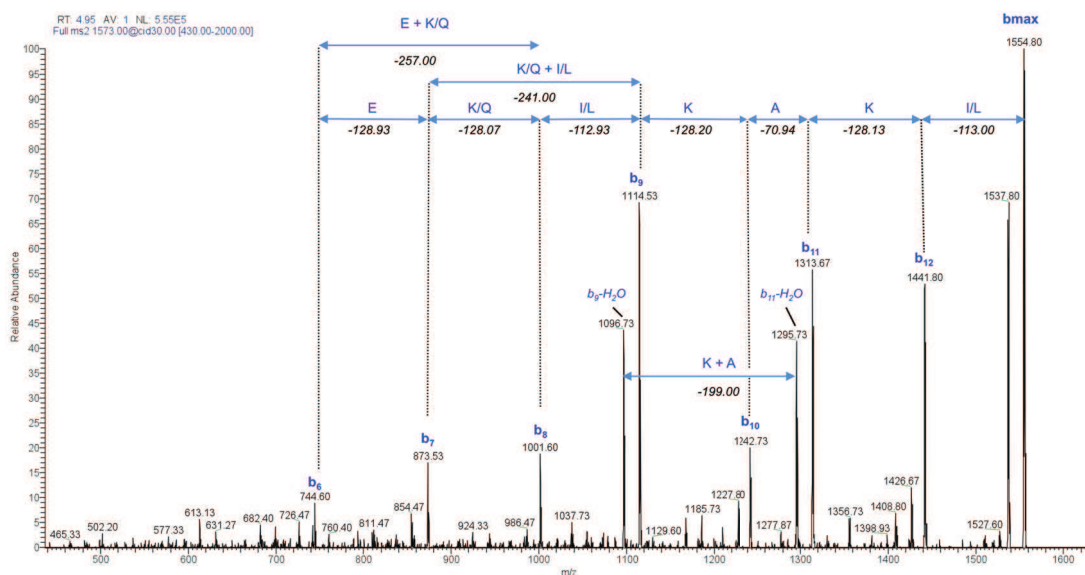


Figure 70 : Spectre MS/MS de l'ion monochargé  $m/z$  1572,89.

En suivant les règles de base du séquençage *de novo*, nous avons déterminé les fragments «  $b_{max}$  et  $y_{max}$  » à partir de l'ion monochargé  $m/z$  1572,89 :

$$y_{max} = 1572,89$$

$$b_{max} \text{ calculé} = 1571,89 - 17 = 1554,89, \quad b_{max} \text{ observé} = m/z 1554,80$$

Une fois ces fragments identifiés, nous nous sommes intéressés à la différence de masse ( $\Delta$ masse) entre chaque ion consécutif. Les calculs sont répertoriés dans le Tableau 31.

m/z observé ( $\alpha$ )	m/z observé ( $\beta$ )	$\Delta$ masse ( $\alpha$ - $\beta$ )	Acide aminé correspondant	évènement
1554,80	1441,80	113,00	Ile ou Leu (I/L)	-
1441,80	1356,73	85,07	-	-
	1313,67	128,13	Lys ou Gln (K/Q)	-
1313,67	1295,73	17,94 $\approx$ 18	-	Perte d'H <sub>2</sub> O
	1242,73	70,94 $\approx$ 71	Ala (A)	-
1242,73	1114,53	128,20	Lys ou Gln (K/Q)	-
1114,53	1096,73	17,8 $\approx$ 18	-	Perte d'H <sub>2</sub> O
	1001,60	112,93 $\approx$ 113	Ile ou Leu (I/L)	-
1295,73	1096,73	199,00	Ala et Lys (A+K)	Addition de 2 acides aminés (71+128)
1001,60	873,53	128,07	Lys ou Gln (K/Q)	-
1114,53		241,00	Ile/Leu et Lys/Gln (I/L + K/Q)	Addition de 2 acides aminés (113+128)
873,53	744,60	128,93 $\approx$ 129	Glu (E)	-
1001,60		257,00	Lys/Gln et Glu (K/Q + E)	Addition de 2 acides aminés (128+129)

Tableau 31 : Calculs de différence de masse entre les ions consécutifs de la série b et identification des acides aminés correspondants.

Le spectre MS/MS de l'ion monochargé, essentiellement fourni en fragments « b », nous a permis d'identifier les sept premiers acides aminés de l'extrémité C-terminale du peptide (Figure 71).

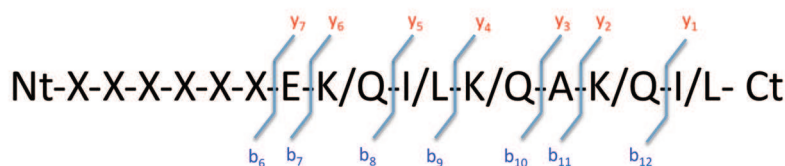


Figure 71 : Enchaînement des sept premiers acides aminés de l'extrémité C-terminale.

Les masses m/z des sept premiers « fragments y » ont été calculées à partir de celles des fragments « b » identifiés sur le premier spectre MS/MS. Ces masses ont été ensuite recherchées sur l'ensemble des spectres MS/MS. Elles ont été localisées sur le spectre de fragmentation de l'ion dichargé m/z 787,00 au niveau des basses masses (Figure 72).

Fragments b	Résidus	Fragments y
-------------	---------	-------------

<b>m/z observé</b>		<b>m/z calculé</b>	<b>m/z observé</b>
744,60	I/L	-	-
873,53	E	829,26	828,45
1001,60	K/Q	700,33	699,32
1114,53	I/L	572,29	571,46
1242,73	K/Q	459,33	458,23
1313,67	A	331,13	330,03
1441,80	K/Q	260,19	259,18

Tableau 32 : Détermination des « fragments y » à partir des m/z des « fragments b ».

L'ensemble des fragments « y » observés a présenté une différence d'environ une unité de masse par rapport à la masse m/z attendue (Tableau 32). Cette différence de masse n'a été observée que sur les fragments « y ». Elle peut s'expliquer par l'amidation de l'extrémité C-terminale du peptide. Cette hypothèse sera confirmée par une analyse en haute résolution.

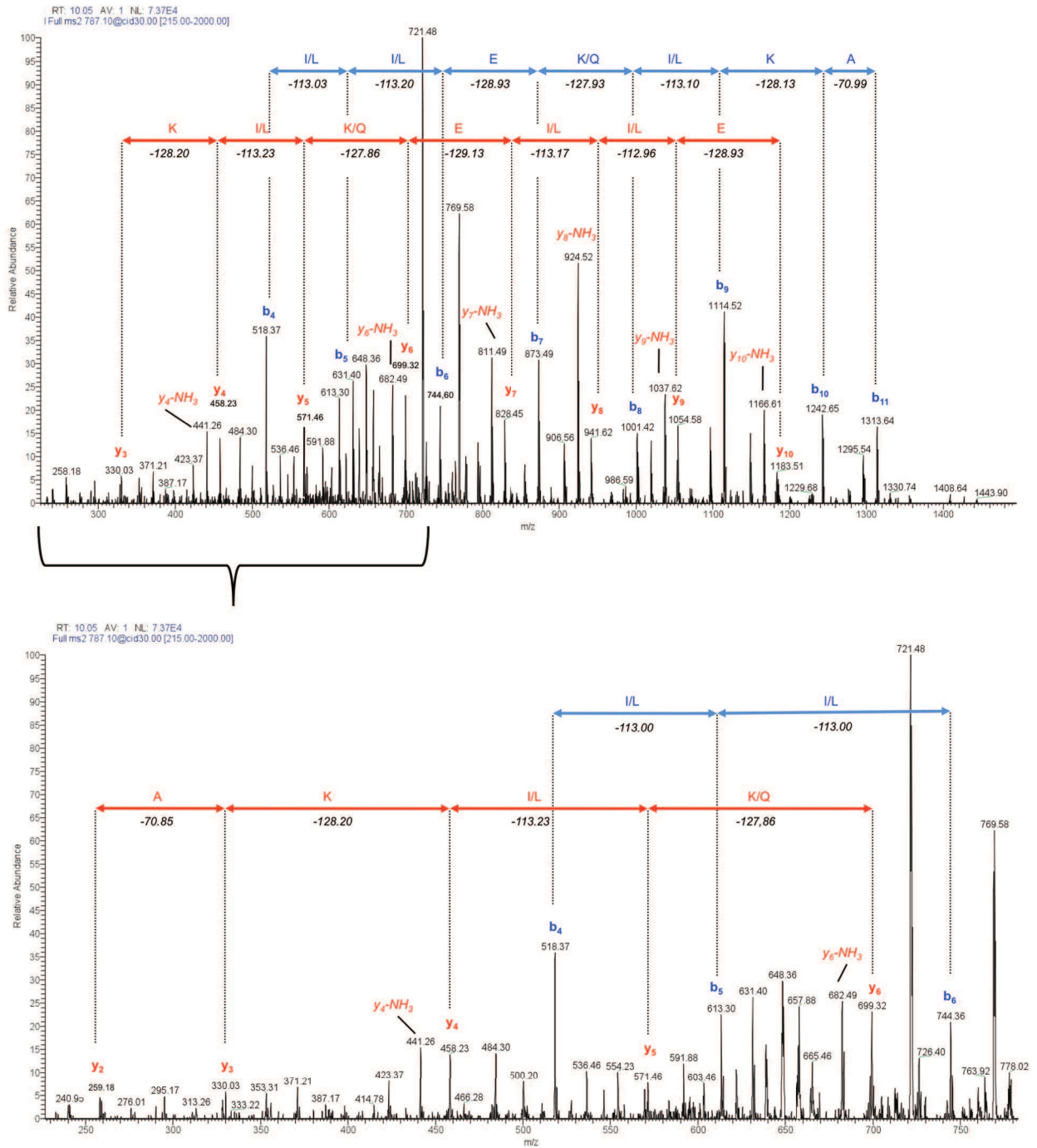


Figure 72 : Spectre MS/MS de l'ion dichargé m/z 787,00 et le zoom de la zone de masses (250-750 m/z).

Trois acides aminés supplémentaires ont pu être identifiés par le biais de la fragmentation de l'ion dichargé (Figure 72). L'étude des fragments « y » a révélé la présence de deux résidus d'isoleucine/leucine et d'un résidu de glutamate et a confirmé la première partie de la séquence en acides aminés. Les calculs, élaborés à partir des masses observées sur le spectre (Figure 72), sont répertoriés dans le Tableau 33.

Fragments y				
m/z observé (α)	m/z observé (β)	Δmasse (α-β)	Acide aminé correspondant	événement
330,03	313,26	16,77 ≈ 17	-	Perte de NH <sub>3</sub>
	259,18	70,85 ≈ 71	Ala (A)	
458,23	441,26	16,97 ≈ 17	-	Perte de NH <sub>3</sub>
	330,03	128,20	Lys ou Gln (K/Q)	
571,46	554,23	17,23	-	Perte de NH <sub>3</sub>
	458,23	113,23	Ile ou Leu (I/L)	
699,32	682,49	16,83 ≈ 17	-	Perte de NH <sub>3</sub>
	571,46	127,86 ≈ 128	Lys ou Gln (K/Q)	
828,45	811,49	16,96 ≈ 17	-	Perte de NH <sub>3</sub>
	699,32	129,13	Glu (E)	
941,62	924,52	17,10	-	Perte de NH <sub>3</sub>
	828,45	113,17	Ile ou Leu (I/L)	-
1054,58	1037,62	16,96 ≈ 17	-	Perte de NH <sub>3</sub>
	941,62	112,96 ≈ 113	Ile ou Leu (I/L)	-
1183,51	1166,61	16,90 ≈ 17	-	Perte de NH <sub>3</sub>
	1054,58	128,93 ≈ 129	Glu (E)	-

Tableau 33 : Détermination des acides aminés par analyse des fragments « y ».

A proximité de chaque fragment « y », nous avons remarqué la présence de nombreux ions qui ont perdu une molécule d'ammoniac, ce sont les fragments « y-NH<sub>3</sub> ». Ils sont représentés sur le spectre (Figure 72) et cités dans la colonne (β) du Tableau 33. Ces fragments présentent une intensité nettement plus élevée que celle des fragments « y ». Cela a facilité leur localisation. Nous nous sommes donc intéressés à cette série pour séquencer la suite du peptide. En calculant la différence de masse entre ces fragments, nous avons retrouvé le « tag » de séquence en acides aminés découvert à l'aide des fragments « y ». Le Tableau 34 présente les différences de masse entre les fragments « y-NH<sub>3</sub> » consécutifs. Ces valeurs sont plus précises que celles calculées à partir des fragments « y ».

Fragments y-NH <sub>3</sub>			
m/z observé (α)	m/z observé (β)	Δmasse (α-β)	Acide aminé correspondant
441,26	313,26	128,00	Lys ou Gln (K/Q)
554,46	441,26	113,20	Ile ou Leu (I/L)
682,49	554,46	128,03	Lys ou Gln (K/Q)
811,49	682,49	129,00	Glu (E)
924,52	811,49	113,03	Ile ou Leu (I/L)
1037,62	924,52	113,10	Ile ou Leu (I/L)
1166,61	1037,62	128,99	Glu (E)

Tableau 34 : Détermination d'acides aminés à l'aide de la série des fragments « y-NH<sub>3</sub> ».

Au final la série des fragments « y » et celle des fragments « y-NH<sub>3</sub> » nous ont fourni le tag suivant :

Ct - « A - K/Q - I/L - K/Q - E - I/L - I/L - E » - Nt

La Figure 73 fait état de l'enchaînement des acides aminés identifiés au cours du séquençage.

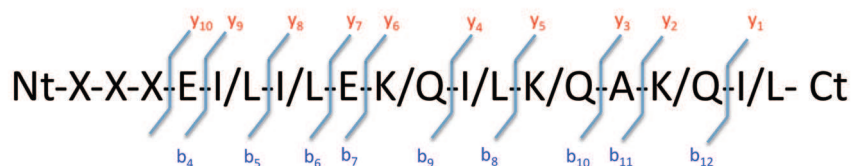


Figure 73 : Les 10 acides aminés qui composent l'extrémité C-terminale du peptide 2.

Afin de déterminer les acides aminés qui composent l'extrémité N-terminale et obtenir ainsi la séquence totale du peptide, nous avons recherché les fragments « y-NH<sub>3</sub> » manquants, au niveau des hautes masses du spectre MS/MS de l'ion monochargé m/z 1572,89 (Figure 74).

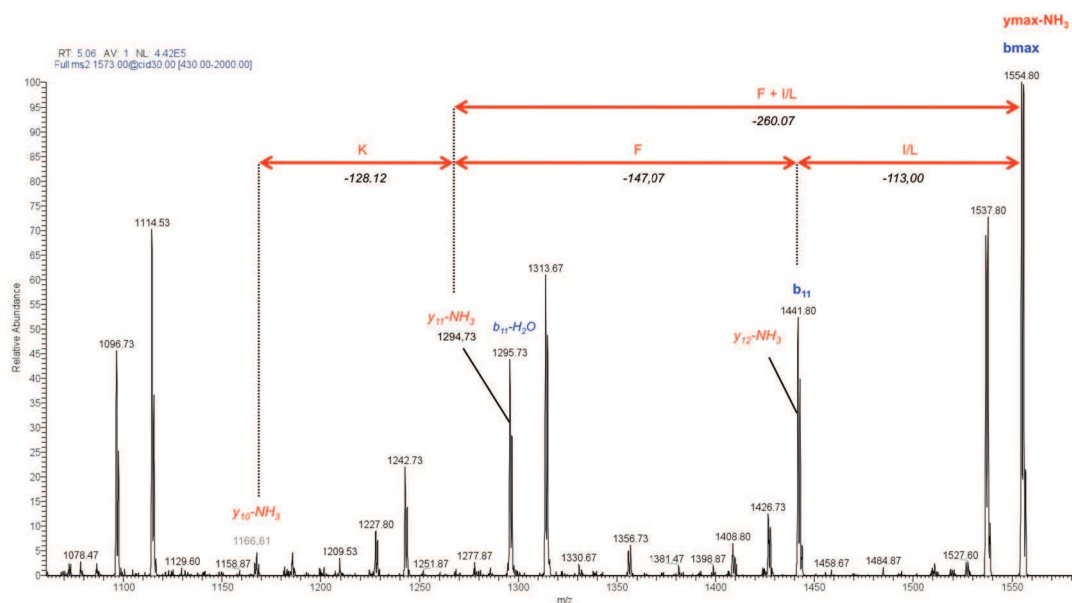


Figure 74 : Agrandissement de la zone 1000 à 1600 m/z du spectre MS/MS de la figure 63.

Dans un premier temps nous avons calculé l'ion caractéristique du fragment «  $y_{\max}\text{-NH}_3$  » :

$$- 1572,89 - 17 = 1555,89$$

Sur le spectre MS/MS (Figure 74), seul l'ion  $b_{\max}$  de masse  $m/z$  1554,80 apparaît. Précédemment, nous avons émis l'hypothèse que le peptide était amidé à l'extrémité C-terminale. Compte tenu de la différence de masse de 1 Da qui se répercute sur les fragments de la série des y et  $y\text{-NH}_3$ , nous avons supposé que le fragment «  $y_{\max}\text{-NH}_3$  » se confondait avec le fragment «  $b_{\max}$  » :

$$- 1555,89 - 1 = 1554,89, \text{ la masse observée est de } m/z \text{ 1554,80.}$$

En se focalisant sur l'ion  $m/z$  1295,73 (désigné comme le fragment  $b_{11}\text{-H}_2\text{O}$ ), nous avons observé la présence de l'ion  $m/z$  1294,73. Le calcul de la différence de masse entre cet ion et le fragment  $y_{10}\text{-NH}_3$  donne une masse (128,12) équivalente à celle de la lysine ou de la glutamine. Cet ion pourrait représenter le fragment  $y_{11}\text{-NH}_3$ . Nous avons donc ensuite calculé la différence de masse entre le fragment  $y_{\max}\text{-NH}_3$  et ce potentiel fragment :

$$- 1554,80 - 1294,73 = 260,07$$

Cette masse correspondrait à la somme des masses de deux acides aminés tels que la phénylalanine (147) et l'isoleucine/leucine (113). Afin de connaître l'ordre de succession de ces deux résidus, nous avons effectué les calculs réencés dans le Tableau 35.



m/z observé ( $\alpha$ )	Masse des acides aminés	m/z calculé	m/z observé ( $\beta$ )	correspondance
1554,80	-147	1407,80	1408,80	-
	-113	1441,80	1441,80	$b_{12}$
1294,73	+147	1441,73	1441,80	
	+113	1407,73	1408,80	-

Tableau 35 : Détermination des acides aminés de l'extrémité N-terminale.

D'après ces calculs, nous pouvons émettre l'hypothèse que le fragment «  $y_{12}\text{-NH}_3$  » se confond avec le fragment  $b_{12}$ . Cette dernière semble plausible puisque le peptide présenterait, à ses deux extrémités, un résidu d'isoleucine/leucine.

La séquence totale hypothétique du peptide est représentée par la Figure 75.

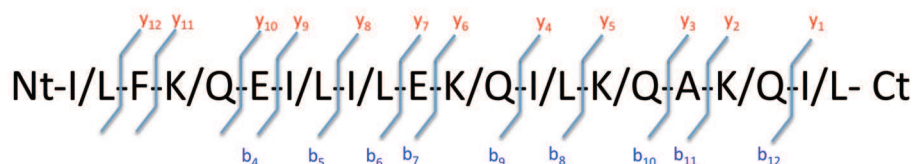
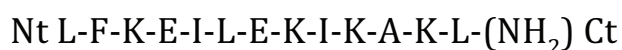


Figure 75 : Hypothèse de séquence primaire du peptide 2.

Les ambiguïtés concernant les résidus leucine/isoleucine ainsi que lysine/glutamine ont été levées grâce au microséquençage par dégradation d'Edman réalisé par la plateforme protéomique de Rouen dans le cadre d'une collaboration. Elle nous a également permis de confirmer l'enchaînement des trois premiers acides aminés N-terminaux et d'établir la séquence primaire définitive :



La Figure 76 représente le profil isotopique du peptide obtenu par analyse MS haute résolution.

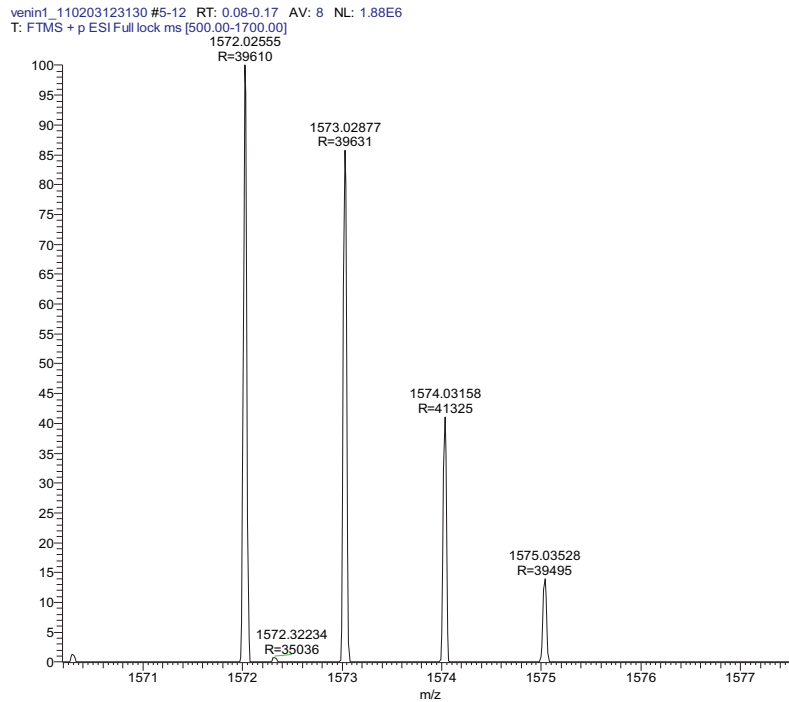


Figure 76: Profil isotopique de l'ion monochargé  $m/z$  1572,02555 en haute résolution.

La masse mono isotopique du peptide est de 1572, 02555 Da et non pas 1572,89 comme observé sur la trappe à ions. Au final, ce peptide est donc amidé à son extrémité C-terminale comme la plupart des peptides antimicrobiens d'insectes.

### 2.6.2 Séquençage du second peptide sur le LTQ-Orbitrap Velos

L'autre peptide de la sous-fraction active C<sub>11</sub>, représenté par les ions dichargé ( $m/z$  1107,73) et trichargé ( $m/z$  739,10) a été séquencé à l'aide du système hybride LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific).

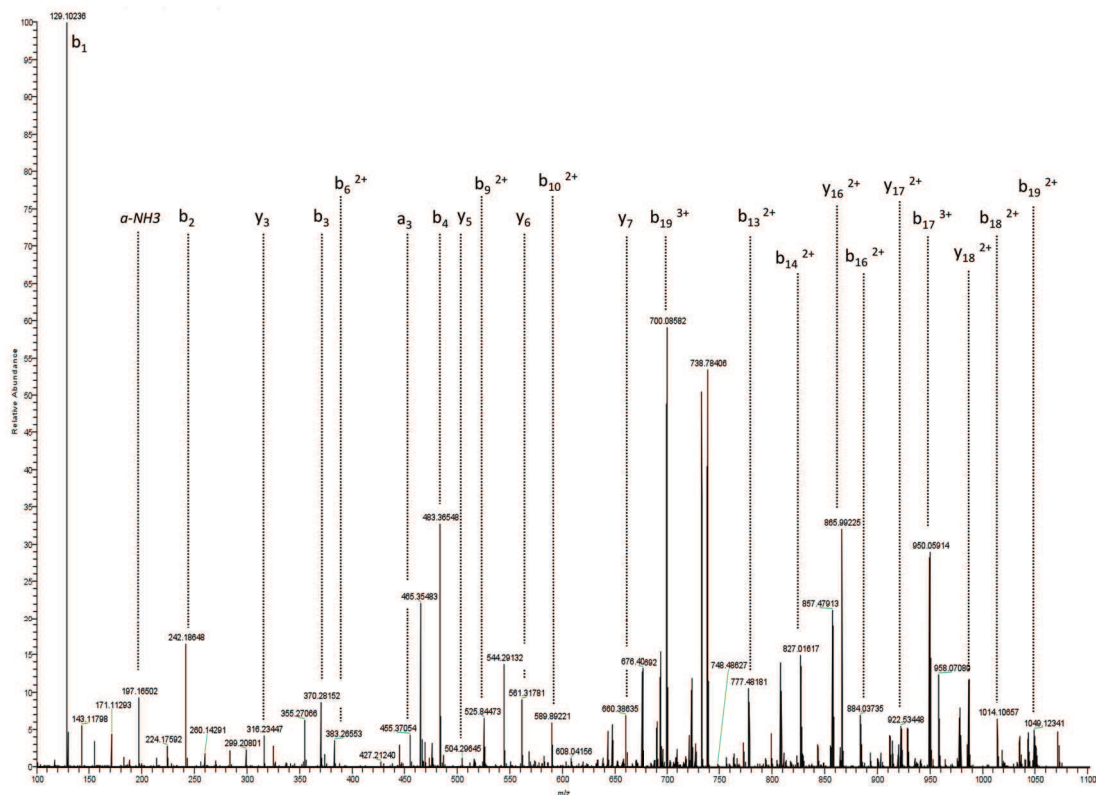


Figure 77 : Spectre MS/MS de l'espèce trichargée  $m/z$  738.7.

Le spectre MS/MS, obtenu à partir de la fragmentation de l'ion triplement chargé  $m/z$  738,7838 a présenté une multitude d'ions multichargés rendant l'interprétation manuelle impossible (Figure 77). C'est pourquoi ce spectre ainsi que des spectres MS/MS complémentaires ont été analysés à l'aide du logiciel Peaks (version 5.2).

Les fragments « b » et « y » mono et multichargés détectés par le logiciel sont répertoriés dans le Tableau 36.

#	b	b <sup>+2</sup>	b <sup>+3</sup>	m <sub>th</sub>	Séquence	m <sub>th</sub>	y <sup>+2</sup>	y	#
1	129.1024	-	-	-	K	-	-	-	20
2	242.1865	-	-	242.1863	I/L	2085.2405	-	2085.2393	19
3	370.2815	-	-	370.2813	K	1972.1565	-	1972.1555	18
4	483.3655	-	-	483.3653	I/L	1844.0615	922.5345	1844.0612	17
5	-	-	-	580.4181	P	1730.9774	865.9922	1730.9767	16
6	766.4979	383.2655	-	766.4974	W	1633.9247	-	-	15
7	-	-	-	823.5189	G	1447.8454	-	-	14
8	951.6139	-	-	951.6138	K	1390.8239	-	-	13
9	1050.6816	525.8447	-	1050.6822	V	1262.7289	-	-	12
10	1178.7766	589.8922	-	1178.7772	K	1163.6605	-	1163.6603	11
11	1293.8020	-	-	1293.8042	D	1035.5656	-	1035.5651	10
12	1440.8722	-	-	1440.8726	F	920.5386	-	-	9
13	1553.9558	777.4818	-	1553.9566	I/L	773.4702	-	-	8
14	1653.0245	827.0162	-	1653.0250	V	660.3861	-	660.3864	7
15	-	-	-	1710.0465	G	561.3177	-	561.3178	6
16	1767.0669	884.0373	-	1767.0680	G	504.2963	-	-	5
17	1898.1074	950.0591	-	1898.1085	M	447.2748	-	-	4
18	2026.2023	1014.1066	676.4069	2026.2034	K	316.2343	-	-	3
19	2097.2390	1049.1234	700.0858	2097.2405	A	188.1394	-	-	2
20	-	-	-	-	-0,98 V	117.1022	-	-	1

Tableau 36 : Fragments « b » et « y » mono et multichargés détectés par le logiciel Peaks (5.2) pour le peptide 1.

Les masses *m/z* annotées en bleu et rouge représentent les ions multichargés respectifs aux fragments « b » et « y » détectés sur le spectre MS/MS, les autres masses *m/z* (en noir) sont calculées en fonction des ions multichargés.

L'ion triplement chargé *m/z* 676,4069 est présent sur le spectre MS/MS (Figure 77) de même que l'ion dichargé *m/z* 1014,1234.

La déconvolution du spectre brut à l'aide du logiciel Peaks conduit au spectre simplifié présentant seulement des ions b et y monochargés (Figure 78).

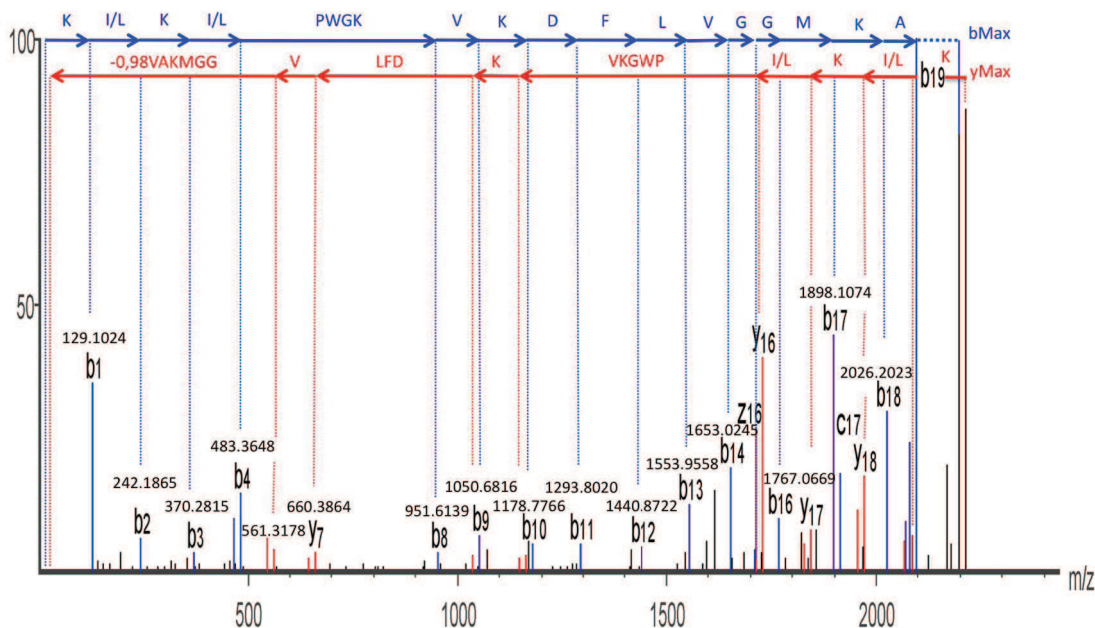


Figure 78 : Spectre déconvolué final obtenu à partir des spectres MS/MS de l'ion dichargé *m/z* 738,7.

Le spectre déconvolué nous permet également de conclure à une amidation de ce peptide en position C-terminale. Ainsi, sa masse mono isotopique théorique est de 2212,3457 Da et sa séquence est :

**Nt K-I/L-K-I/L-P-W-G-K-V-K-D-F-I/L-V-G-G-M-K-A-V-(NH<sub>2</sub>) Ct**

Les ambiguïtés concernant les résidus leucine/isoleucine ont été levées grâce au microséquençage par dégradation d'Edman.

La séquence définitive du second peptide est donc :

**Nt K-I-K-I-P-W-G-K-V-K-D-F-L-V-G-G-M-K-A-V-(NH<sub>2</sub>) Ct**

### 3 Synthèse des peptides

Nous avons montré précédemment une activité antimicrobienne du mélange des deux peptides sur les deux souches de *Staphylocoques* (cf. partie 2.4).

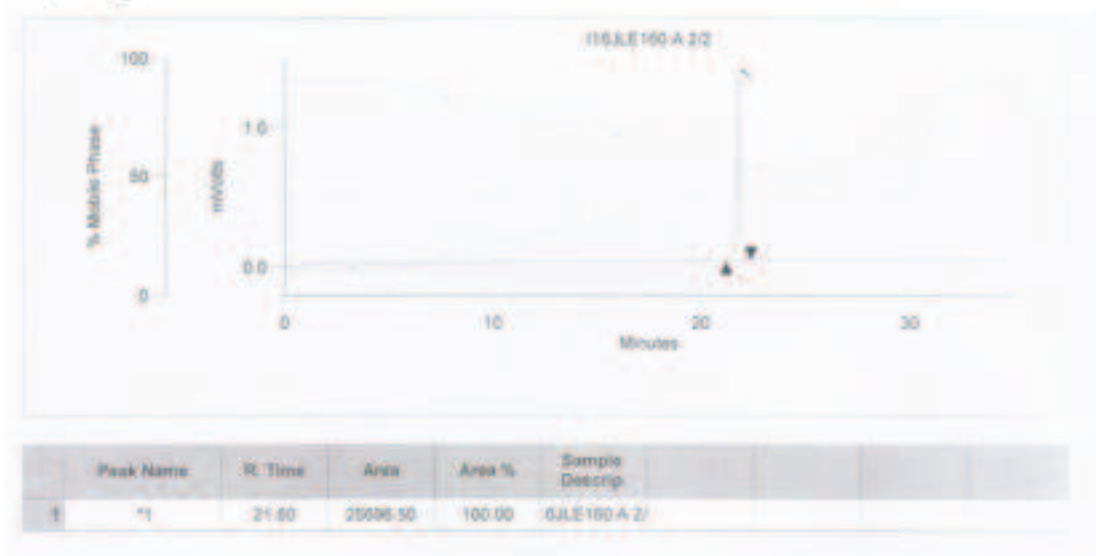
Afin de vérifier l'activité biologique de chacun d'eux, les deux peptides ont été synthétisés sous leurs formes naturelles (amidation en C-terminal) et sous leur forme acide (Tableau 37). Ceci nous a permis de comparer les activités antimicrobiennes de chacune des deux formes et de conclure sur le rôle de l'amidation.

Peptides	Séquence	Masse totale synthétisée en mg	Pureté HPLC	Peptide vrai estimé (pureté comprise)	Masse molaire en g/mol
Peptide1	KIKIPWGKVKDFLVGGMKAV-NH <sub>2</sub>	7,72	98,8 %	74,0 %	2213,81
Peptide1-COOH	KIKIPWGKVKDFLVGGMKAV-COOH	20,90	99,9 %	76,4 %	2214,79
Peptide2	LFKEILEKIKAKL-NH <sub>2</sub>	7,42	99,9 %	73,4 %	1571,98
Peptide2-COOH	LFKEILEKIKAKL-COOH	19,00	99,9 %	73,4 %	1572,97

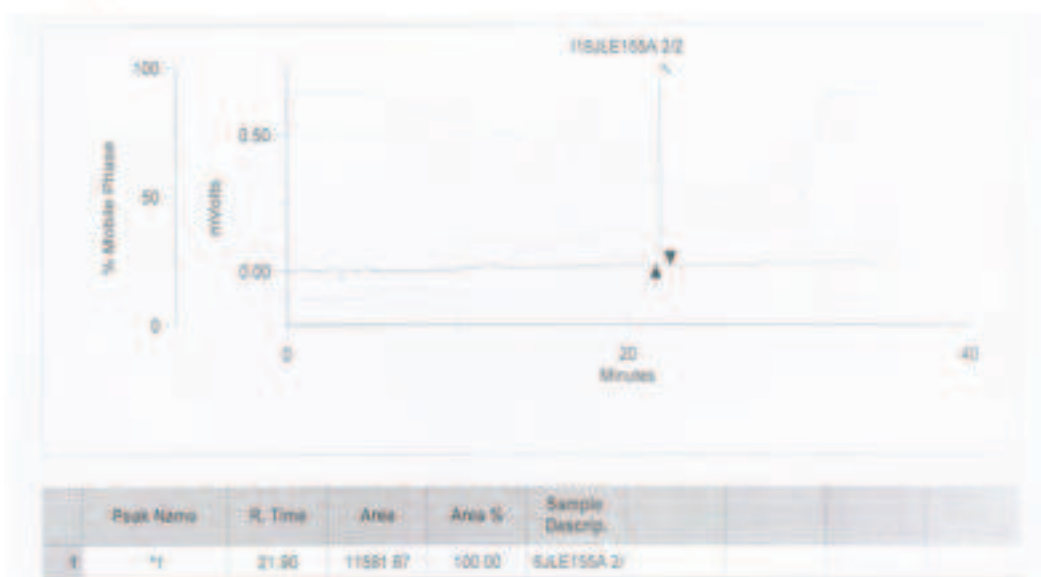
Tableau 37 : Bilan de la synthèse des peptides.

L'étape finale de la synthèse peptidique consiste à évaluer la pureté des produits obtenus. Ces produits sont donc analysés, un à un, par HPLC sous détection UV.

### A/ Peptide-1 amidé en Ct



### B/Peptide-2 amidé en Ct



**Figure 79 : Evaluation de la pureté des produits de synthèse par HPLC.**

Colonne Vydac™ C18 218TP54 (0,46 x 25 cm) ; débit 1mL/min ; gradient (90% H<sub>2</sub>O/10% ACN sur 25 min et 40% H<sub>2</sub>O/60% ACN sur 2 min, retour aux conditions initiales 90% H<sub>2</sub>O sur 3 min).

Lors de l'analyse chromatographique (Figure 79), les temps de rétention des peptides de synthèse amidés se sont révélés très proches : 21,80 min pour le peptide 1 et 21,90 min pour le second. Cette analyse confirme le phénomène de coélution de ces peptides



rencontré lors de l'analyse du venin brut et de la sous-fraction C<sub>11</sub> en LC/MS au laboratoire.

## 4 Résultats obtenus par dichroïsme circulaire

Dans le but de déterminer la présence d'une organisation spatiale en hélice, des tests de dichroïsme circulaire (DC) ont été conduits sur chacun des deux peptides de synthèse ainsi que sur leur forme carboxylée.

Les structures du peptide 1 « KIKIPWGKVKDFLVGGMKAV » et du peptide 2 « LFKEILEKIKAKL » ont ainsi été explorées dans trois milieux différents : l'eau pure, le TFE et le SDS en solution dans l'eau. Dans un premier temps, nous avons déterminé les conditions favorables à la structuration des deux peptides carboxylés. Ensuite, nous avons évalué l'effet de l'amidation C-terminale sur la conformation des peptides.

### 4.1 Dichroïsme circulaire du peptide 1

#### 4.1.1 Le peptide 1 carboxylé

La Figure 80 représente les différents spectres DC obtenus pour chaque milieu de solubilisation du peptide sous sa forme carboxylée « KIKIPWGKVKDFLVGGMKAV-COOH ».

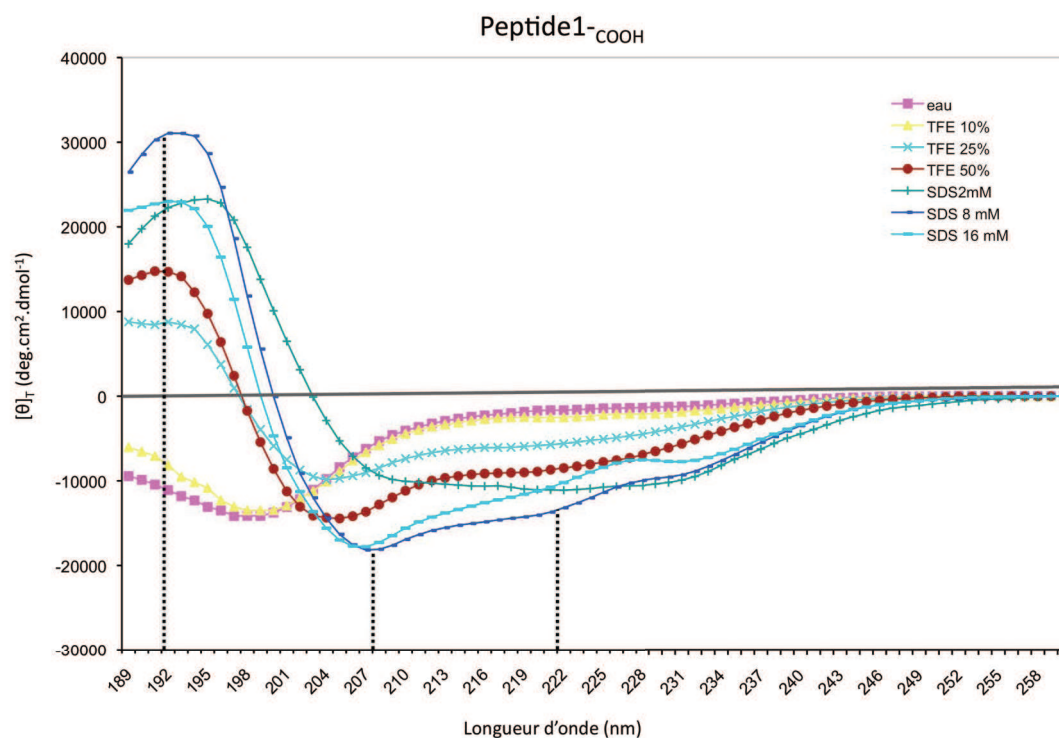


Figure 80 : Spectres dichroïques du peptide 1 carboxylé en C-terminal dissous dans différentes concentrations en TFE et SDS.



Ce peptide n'est ni structuré dans l'eau ni dans le milieu TFE à 10% (v/v). Une augmentation de la concentration du milieu TFE a induit une structuration en hélice  $\alpha$ . En effet, à partir de 25 % de TFE dans l'eau, le profil du spectre enregistré a adopté une allure que l'on peut attribuer à celle d'une hélice alpha avec un maximum à 192 nm et deux minima à 208 et 222 nm. Cependant, ces minima sont nettement moins marqués que ceux observés habituellement pour une molécule de conformation hélicoïdale. Le faible pourcentage d'hélicité obtenu dans le TFE et dans le SDS (Tableau 38) indique que la structure dominante du peptide est de type aléatoire.

Le pourcentage maximal d'hélicité a été obtenu dans du SDS à 8 mM et n'excède pas les 40%.

	eau	% TFE (v/v)			SDS en mM		
		10	25	50	2	8	16
<b>% hélicité</b>	5	7	16	20	32	39	29
<b>Nb d'aa</b>	0,9	1,4	3,2	4	6,3	7,8	5,8

Tableau 38 : Pourcentage d'hélicité et nombre d'acides aminés inclus dans l'hélice du peptide 1-cooh, calculés en fonction des différentes conditions testées.

Exemple du calcul du pourcentage d'hélicité :

- Dans 50% de TFE dans l'eau

$$[\theta]_T \text{ à } 222 \text{ nm} = -7171,42$$

$$\% \text{ hélicité} = (-7171,42 / [-40\ 000 \times (1 - (2,5/20))]) \times 100 = 20$$

Nombre d'acides aminés compris dans l'hélice :

$$(\% \text{ hélicité} \times \text{Nb total AA du peptide}) / 100$$

$$(20 \times 20) / 100 = 4$$

La concentration critique micellaire pour ce peptide est de 8 mM puisqu'au delà de cette concentration, aucune augmentation du pourcentage d'hélicité n'a été constatée.

#### 4.1.2 Le peptide 1 amidé

Des analyses complémentaires ont permis d'observer l'influence de l'amidation C-terminale sur la conformation du peptide dans le TFE et le SDS. Comme la forme carboxylée, le peptide amidé n'est pas structuré dans l'eau. Cependant à concentrations égales en TFE et en SDS, on remarque une augmentation des maxima (192 nm) et des minima (208 et 222 nm) des spectres représentatifs de la forme amidée en comparaison avec ceux de la forme carboxylée (Figure 81).

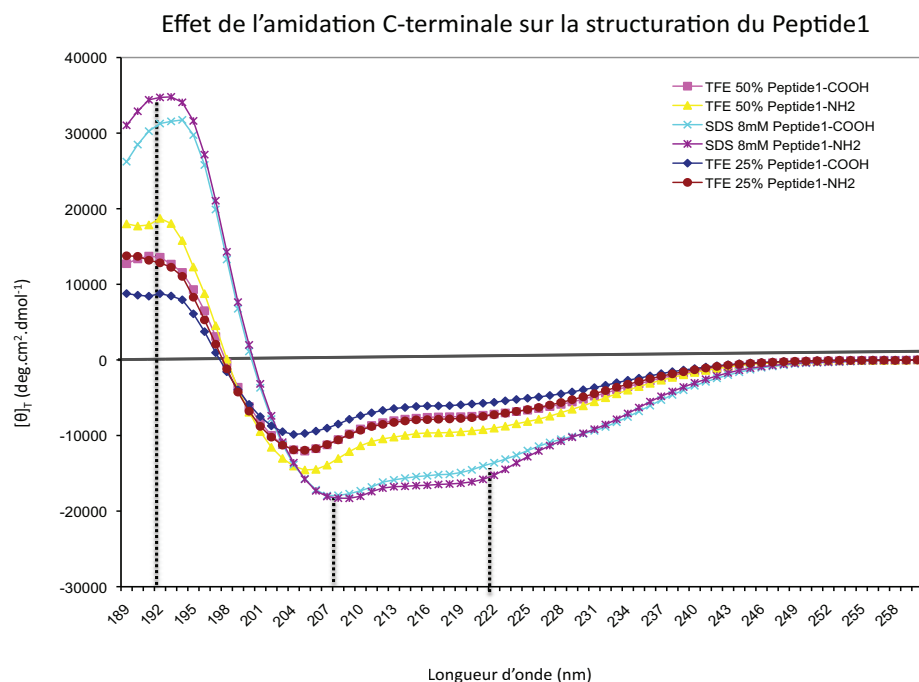


Figure 81 : Spectres dichroïques du peptide 1 et peptide 1-COOH obtenus dans 25 et 50% de TFE et dans du SDS à 8 mM.

Nous observons une légère augmentation du pourcentage d'hélicité du peptide pour chaque condition (Tableau 39). Cette augmentation est le résultat soit d'une meilleure stabilisation de la portion hélicoïdale du peptide, soit d'un allongement minime de l'hélice.

	% TFE (v/v)				SDS en mM	
	25		50		8	
	Peptide 1	Peptide 1-COOH	Peptide 1	Peptide 1-COOH	Peptide 1	Peptide 1-COOH
<b>% hélicité</b>	20	16	26	20	44	39
<b>Nb d'aa</b>	4	3,2	5,2	4	8,7	7,8

Tableau 39 : Comparaison du pourcentage d'hélicité du peptide 1 et peptide 1-COOH dissous dans le TFE et le SDS.

## 4.2 Cas du peptide 2

### 4.2.1 Le peptide 2 carboxylé

Les mêmes analyses ont été effectuées pour le peptide 2 «LFKEILEKIKAKL-COOH».

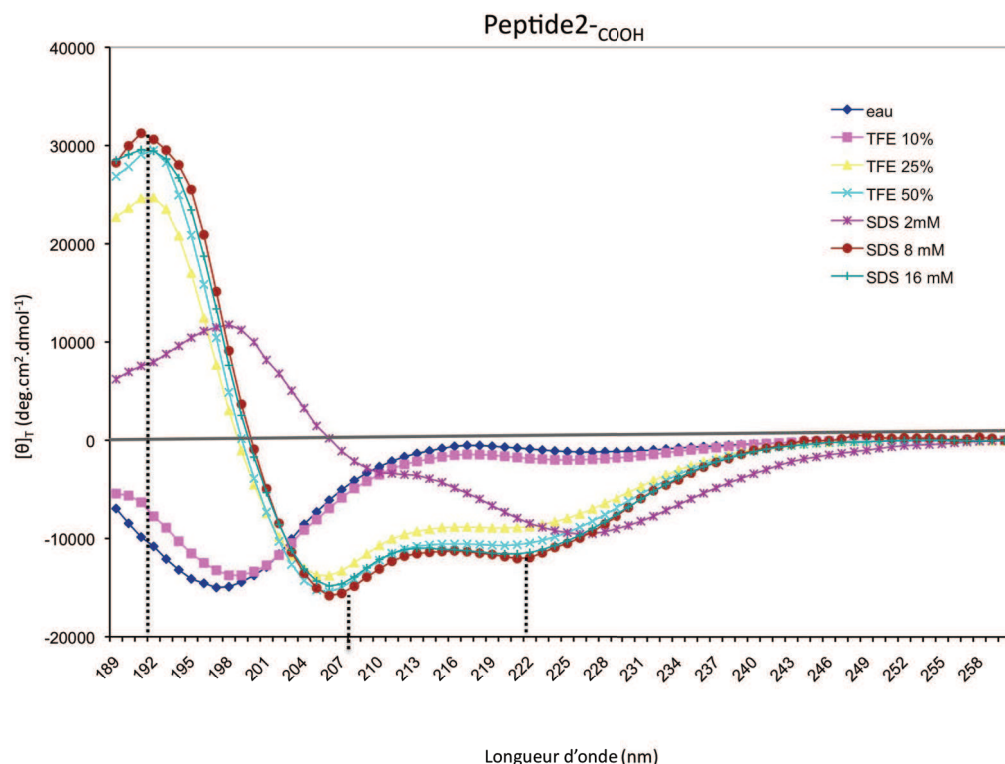


Figure 82 : Spectres dichroïques du peptide 2 carboxylé en C-terminal dissous dans différentes concentrations en TFE et SDS.

Contrairement au peptide 1-COOH, les spectres des échantillons dissous dans le TFE et le SDS ont une allure nettement plus caractéristique de celle représentant une hélice  $\alpha$ . En effet, les minima à 208 et 222 nm sont plus marqués que ceux observés pour le peptide 1 (Figure 82).

Pour chaque condition, le peptide 2-COOH présente un pourcentage d'hélicité (Tableau 40) plus élevé que le peptide 1-COOH (Tableau 38). Nous pouvons donc conclure que le peptide 2-COOH se structure plus facilement en hélice  $\alpha$  que le peptide 1-COOH. Avec un pourcentage d'hélicité maximal de 37%, obtenu après solubilisation dans du SDS à 8 mM, nous supposons que la conformation de ce peptide est une sorte d'hybride entre l'hélice  $\alpha$  et une structure aléatoire (random coil).

	eau	% TFE (v/v)			SDS en mM		
		10	25	50	2	8	16
<b>% hélicité</b>	3	6	27	32	26	37	35
<b>Nb d'aa</b>	0,4	0,8	3,5	4,2	3,4	4,8	4,6

Tableau 40 : Pourcentage d'hélicité et nombre d'acides aminés inclus dans l'hélice du peptide 2-COOH, calculés en fonction des différentes conditions testées.

Pour finir, l'analyse DC du peptide 2 amidé a été conduite dans les mêmes conditions. La Figure 83 et la Tableau 41 présentent les résultats obtenus ainsi que les comparaisons avec la forme COOH.

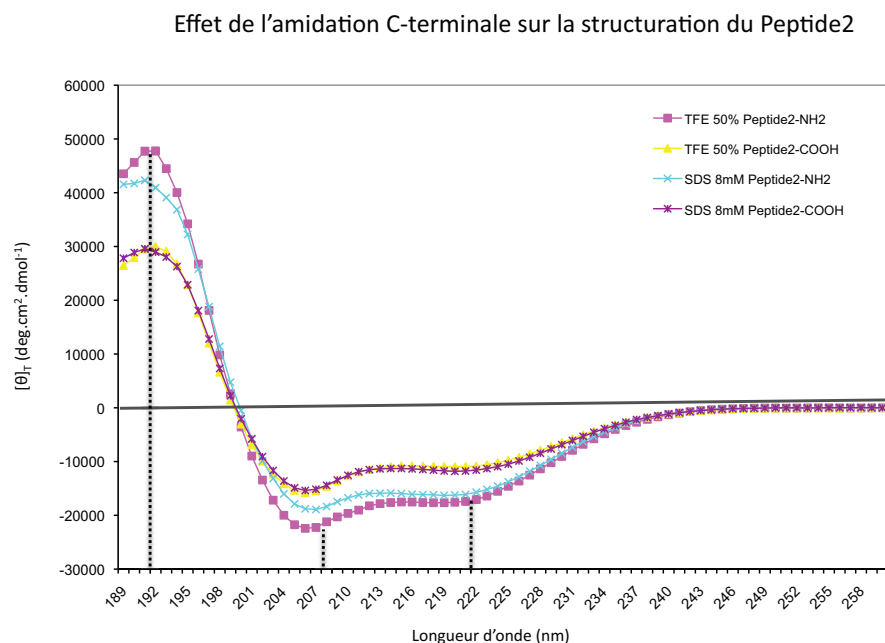


Figure 83 : Spectres dichroïques du peptide 2 et peptide 2-COOH obtenus dans 50% de TFE dans l'eau et dans du SDS à 8 mM.

	% TFE (v/v)				SDS en mM	
	25		50		8	
	Peptide 2	Peptide 2-COOH	Peptide 2	Peptide 2-COOH	Peptide 2	Peptide 2-COOH
<b>% hélicité</b>	-	27	53	32	49	37
<b>Nb d'aa</b>	-	3,5	6,9	4,2	6,3	4,8

Tableau 41 : Comparaison du pourcentage d'hélicité du peptide 2 et peptide 2-COOH dissous dans le TFE et le SDS.

Une fois encore, l'augmentation du pourcentage d'hélicité du peptide est corrélée avec la présence d'un groupement amide en position C-terminale. Solubilisé dans 50% de TFE dans l'eau et dans du SDS à 8 mM, le peptide 2 se structure en hélice  $\alpha$  (Tableau 41). Cette augmentation du taux d'hélicité pourrait être due à une stabilisation de la partie hélicoïdale.

## 5 Validation des résultats microbiologiques avec les peptides synthétisés

Les peptides synthétisés ont été testés sur les staphylocoques (terrain et référencés). Le test MTT a été réalisé sur les cinq souches citées dans le Tableau 42.

Peptides		Souches				
		<i>S. aureus</i>			<i>S. xylosus</i>	
Peptide 2	LFKEILEKIKAKL-NH <sub>2</sub>					
Peptide 2-COOH	LFKEILEKIKAKL-COOH	CIP	Sauvage	Sauvage	ATCC	Sauvage
Peptide 1	KIKIPWGGKVKDFLVGGMKAV-NH <sub>2</sub>	53157	(LDA)	(ENFA)	35033	(ENFA)
Peptide 1-COOH	KIKIPWGGKVKDFLVGGMKAV-COOH					

Tableau 42 : Récapitulatif des conditions expérimentales du test MTT sur les staphylocoques.

### 5.1 Les solutions peptidiques testées

Les peptides ont été solubilisés dans du PBS et leur concentration a été contrôlée à l'aide du nanodrop 2000.

Les concentrations des solutions mères des peptides synthétisés sont :

- peptide 1-COOH = 5,06 mg/mL
- peptide 1 = 3,98 mg/mL
- peptide 2-COOH = 5 mg/mL
- peptide 2 = 5 mg/mL

La mellitine a servi de PAM de référence tout au long du test, la concentration de la solution mère a été évaluée à 4,45 mg/mL.

### 5.2 Résultats microbiologiques

#### 5.2.1 Sur les différentes souches de *Staphylocoques*

⇒ *Staphylococcus aureus*

Le schéma des plaques 96 puits est représenté ci-dessous :

Les concentrations de peptides en solution utilisées lors des essais sont en µg/mL :

<b>Plaque 1 :</b>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Témoins (µL)	A	£10	£5	£2.5	£1.25	£0.63	£0.31	€5	€2.5	€1.25	€0.63	€0.31	0
Peptide2-COOH	B	500	250	125	62,50	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	0
	C												
Peptide2	D	500	250	125	62,50	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	0
	E												
Peptide1-COOH	F	506	253	126,5	63,25	31,63	15,81	7,91	3,95	1,98	0,99	0,49	0
	G												
--	H	--											
<b>Plaque 2 :</b>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Témoins (µL)	A	£ 10	£ 5	£ 2.5	£ 1.25	£ 0.63	£ 0.31	€ 5	€ 2.5	€ 1.25	€ 0.63	€ 0.31	0
Peptide1	B	497	248,5	124,25	62,13	31,06	15,53	7,77	3,88	1,94	0,97	0,49	0
	C												
Mellitine	D	489,5	245	122	61,19	30,59	15,30	7,65	3,82	1,91	0,96	0,48	0
	E												

Tableau 43 : Concentrations en peptides testées sur *S. aureus*.

£ témoin négatif (PBS)

€ témoin positif (mélange de streptomycine et de pénicilline)

Résultats :

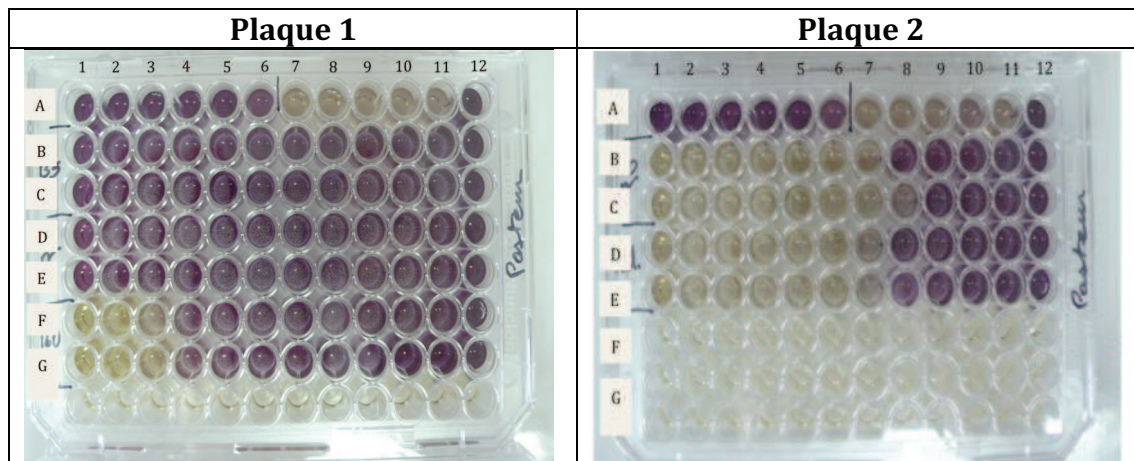


Figure 84 : Photos des plaques MTT de *S. aureus* CIP 53156.

Plaque 1 → ligne A : témoins ; B-C : concentrations en peptide 2-COOH ; D-E : concentrations en peptide 2 ; F-G : concentrations en peptide 1-COOH.

Plaque 2 → ligne A : témoins ; B-C : concentrations en peptide 1 ; D-E : concentrations en mellitine.

### Transform of St.a. Pasteur-A23-260411-C exactes

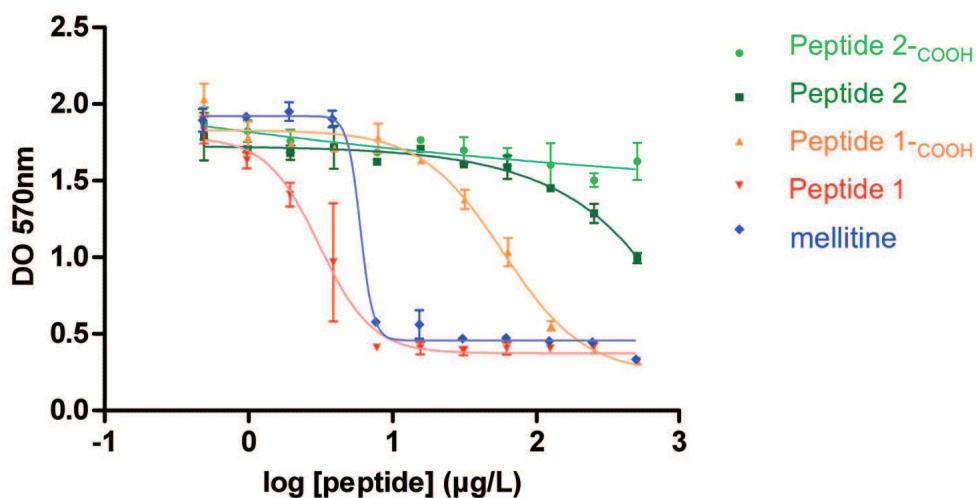


Figure 85 : Evaluation de l'activité antibactérienne des peptides synthétisés et de la mellitine sur *S. aureus* CIP 53156.

La coloration « violette » des puits (Figure 84) ainsi que l'analyse des données avec GraphPad Prism (Figure 85) révèlent l'absence d'activité antibactérienne des deux formes (carboxylée et amidée) du peptide-2 sur la souche référencée de staphylocoque doré contrairement au peptide-1 qui induit une inhibition de croissance bactérienne. Suite à cette information, nous avons reproduit ce test en recentrant la gamme de concentrations des peptide-1, peptide1-COOH et de la mellitine pour une détermination plus précise de leurs CI<sub>50</sub>.

		Concentrations exactes en peptides µg/mL											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Témoins	A	£ 20	£ 10	£ 5	£ 2.5	£ 1.25	£ 0.63	€ 2.5	€ 1.25	€ 0.63	€ 0.31	€ 0.15	€ 0.08
Peptide 1-COOH	B	506,00	253	126,5	63,25	31,63	15,81	7,91	3,95	1,98	0,99	0,49	0,25
	C	1012,0	506	253,0	126,5	63,25	31,63	15,81	7,91	3,95	1,98	0,99	0,49
Peptide 1	D	258,51	129,25	64,63	32,31	16,16	8,08	4,04	2,02	1,01	0,50	0,25	0,13
	E	129,25	64,63	32,31	16,16	8,08	4,04	2,02	1,01	0,50	0,25	0,13	0,06
Mellitine	F	499,88	249,94	124,97	62,48	31,24	15,62	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	0,24
	G	499,88	249,94	124,97	62,48	31,24	15,62	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	0,24
--	H	Témoins croissance (0 peptide)											

Tableau 44 : Concentrations exactes en peptides testées sur *S. aureus*.

£ témoin négatif (PBS)

€ témoin positif (mélange de streptomycine et de pénicilline)



**Transform of S.a.Pasteur-A25-lec060511-C exacte**

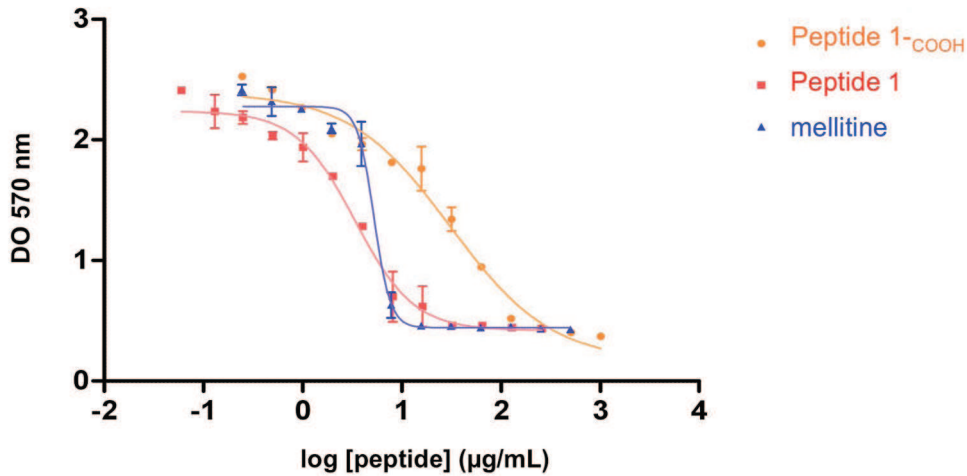


Figure 86 : Courbes « dose-effet » du peptide 1 et de son homologue carboxylé ainsi que de la mellitine pour la détermination des CI<sub>50</sub> sur *S. aureus* CIP 53156.

En recentrant la gamme de concentrations pour chaque peptide, nous avons obtenu des courbes « dose-effet » présentant un meilleur ajustement (Figure 86).

Nous avons procédé de la même façon pour les souches sauvages de *S. aureus*. Les différentes CI<sub>50</sub> calculées sont répertoriées dans le Tableau 45.

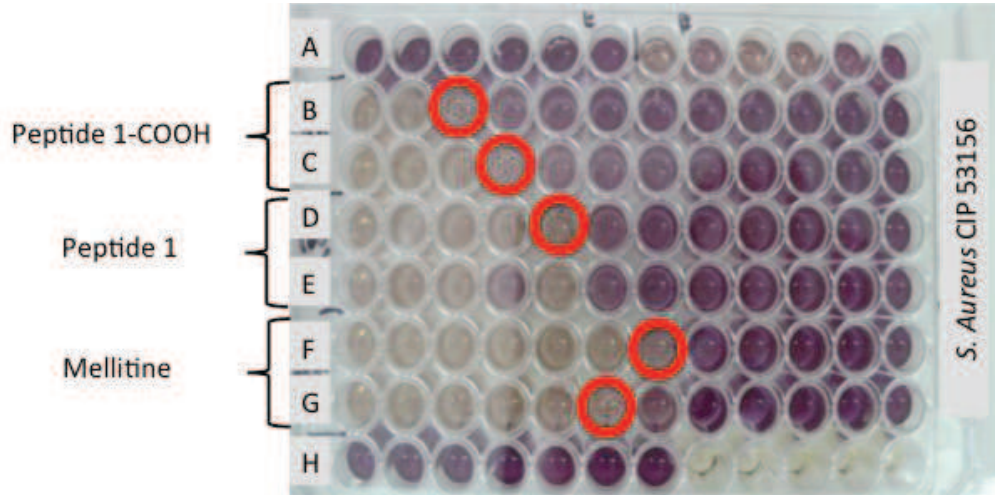
		Composés testés CI <sub>50</sub> en µg/mL				
		Peptide-1	Peptide-1-COOH	Peptide-2	Peptide-2-COOH	Mellitine
<i>S. aureus</i> CIP 53156	Moyenne	3,235	63,210	>500	>500	4,768
	Ecart-type	0,199	7,156	-	-	1,705
<i>S. aureus</i> (LDA)	Moyenne	3,173	17,005	>500	>500	4,255
	Ecart-type	0,688	1,690	-	-	0,162
<i>S. aureus</i> (ENFA)	Moyenne	0,694	1,501	>500	>500	2,149
	Ecart-type	0,078	0,084	-	-	0,309

Tableau 45 : Récapitulatif des CI<sub>50</sub> des différents peptides, calculées pour les *S. aureus*.

D’après nos résultats, nous pouvons conclure que le peptide 1, naturellement amidé, est nettement plus puissant que son homologue carboxylé puisqu’ il présente une CI<sub>50</sub> vingt fois inférieure à celle de ce dernier sur le staphylocoque doré référencé. Les tests ont également révélé que l’action antibactérienne du peptide 1 est similaire à celle de la mellitine. En effet, leur CI<sub>50</sub> sont de même ordre de grandeur excepté pour la souche sauvage provenant de l’ENFA qui semble plus sensible au peptide du venin (CI<sub>50</sub> = 0,694 µg/mL).

Focus sur *S. aureus* CIP 53156

La détermination de la CMI, concentration minimale d'inhibition, de cette souche peut être déterminée en observant la plaque 96 puits correspondant au test MTT effectué avec les concentrations exactes répertoriées dans le Tableau 45.



**Figure 87 : Résultat du test MTT sur *S. aureus* CIP 53156 avec le peptide 1 sous forme carboxylée et amidée.**

Les six premiers puits de la ligne A contiennent des *S. aureus* incubés en présence de PBS, de même pour les sept premiers puits de la ligne H.

Les puits marquant la CMI des différents réactifs sont encerclés en rouge.

En se reportant au Tableau 44, la CMI du peptide 1 carboxylé est évaluée à 126,5 µg/mL, celle du peptide sous forme amidée est de 16,2 µg/mL. Cette dernière est proche de celle de la mellitine, évaluée à 15,6 µg/mL pour cette souche.

⇒ ***Staphylococcus xylosus***

Des tests similaires ont été menés sur les staphylocoques coagulase négative (CNS) du genre *Staphylococcus xylosus*. Comme pour les staphylocoques dorés, le premier test permet de définir l'action antibactérienne de chaque peptide synthétisé et de la comparer à celle de la mellitine.

<b>Plaque 1 :</b>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Témoins (µL)	A	£ 10	£ 5	£ 2.5	£ 1.25	£ 0.63	£ 0.31	€ 5	€ 2.5	€ 1.25	€ 0.63	€ 0.31	0
Peptide2-COOH	B	500	250	125	62,50	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	0
	C												
Peptide2	D	500	250	125	62,50	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	0
	E												
Peptide1-COOH	F	253	127	63	31,63	15,81	7,91	3,95	1,98	0,99	0,49	0,25	0
	G												

Plaque 2 :		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Témoins (µL)	A	£ 10	£ 5	£ 2.5	£ 1.25	£ 0.63	£ 0.31	€ 5	€ 2.5	€ 1.25	€ 0.63	€ 0.31	0
Peptide1	B	258,5	129	65	32,31	16,16	8,08	4,04	2,02	1,01	0,50	0,25	0
	C												
Mellitine	D	489,5	245	122	61,19	30,59	15,30	7,65	3,82	1,91	0,96	0,48	0
	E												
--	F	--											
Mellitine	G	489,5	245	122	61,19	30,59	15,30	7,65	3,82	1,91	0,96	0,48	0
	H												

£ témoin négatif (PBS)

€ témoin positif (mélange de streptomycine et de pénicilline)

Les densités optiques pour chaque concentration ont permis d'établir le graphe de la Figure 88.

### Transform of St.x. ref-A22-220411-C exactes

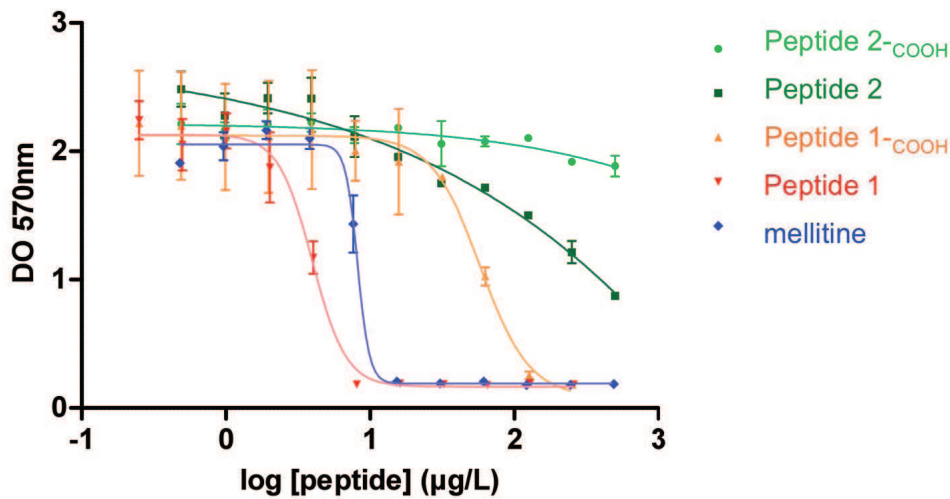


Figure 88 : Evaluation de l'activité antibactérienne des peptides synthétisés et de la mellitine sur *S. xylosus* ATCC 35033.

Nous observons le même phénomène, c'est à dire l'absence d'activité du peptide 2 sous les formes amidée et carboxylique en C-terminal sur *Staphylocoque xylosus*. Le peptide 1 est le seul peptide de la fraction C<sub>11</sub> capable d'inhiber la croissance bactérienne des souches du genre *Staphylococcus*. Par souci de clarté nous avons nommé le peptide 1 : bicarinaline.

Nous avons affiné de nouveau les gammes de concentration en peptides pour le calcul des CI<sub>50</sub>.

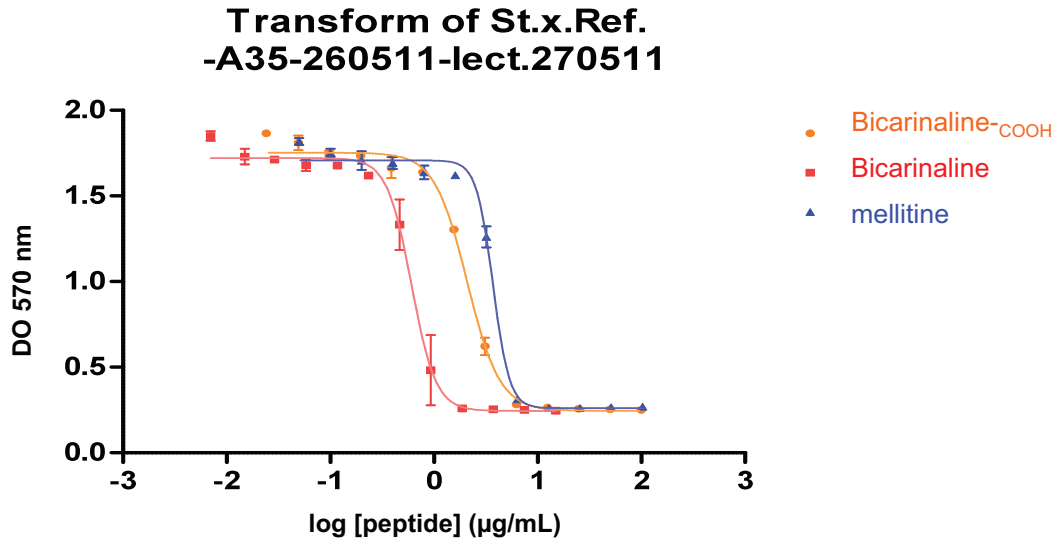


Figure 89 : Courbes « dose-effet » de la bicarinaline et de son homologue carboxylé ainsi que de la mellitine pour la détermination des  $CI_{50}$  sur *S. xylosus* ATCC 35033.

Les résultats des différents tests MTT réalisés sur la souche référencée et la souche sauvage de *S. xylosus* sont résumés dans le Tableau 46.

		Composés testés $CI_{50}$ en $\mu\text{g/mL}$				
		bicarinaline	bicarinaline- COOH	Peptide-2	Peptide-2- COOH	Mellitine
<i>S. xylosus</i> ATCC 35033	Moyenne	0,490	2,340	>500	>500	3,444
	Ecart-type	0,164	0,354	-	-	0,360
<i>S. xylosus</i> (LDA)	Moyenne	0,656	1,524	>500	>500	3,349
	Ecart-type	0,210	0,448	-	-	0,085

Tableau 46 : Récapitulatif des  $CI_{50}$  des différents peptides, calculées pour les *S. xylosus*.

Avec une  $CI_{50}$  moyenne de 0,49  $\mu\text{g/mL}$ , la bicarinaline est 7 fois plus puissante que la mellitine dont la  $CI_{50}$  de 3,44  $\mu\text{g/mL}$  sur la CNS référencée.

L'activité antibactérienne de la bicarinaline carboxylée reste moins puissante que la celle de la bicarinaline naturelle mais présente des  $CI_{50}$  inférieures à celles de la mellitine pour ces deux CNS.

#### Focus sur *S. xylosus* ATCC 35033

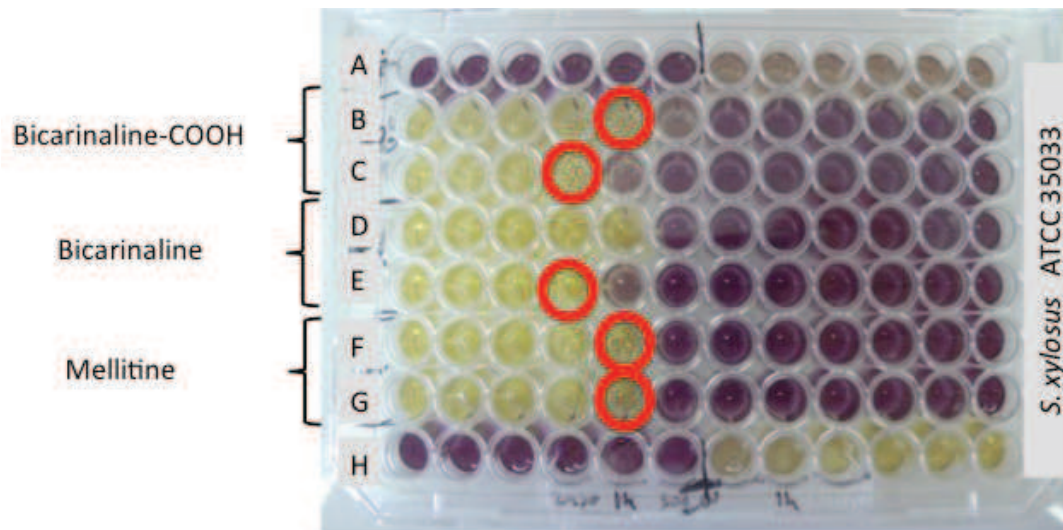
Pour le calcul des  $CI_{50}$ , nous avons affiné la gamme de concentration des peptides. Afin de déterminer la CMI de la bicarinaline sur *S. xylosus* ATCC 35033, l'observation de la plaque 96 puits est nécessaire. La répartition des différentes concentrations en bicarinaline au niveau de la plaque 96 puits a été réalisée de la manière suivante :

		<i>Concentrations exactes en peptides <math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math></i>											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Témoins</i>	A	£ 20	£ 10	£ 5	£ 2.5	£ 1.25	£ 0.63	€ 2.5	€ 1.25	€ 0.63	€ 0.31	€ 0.15	€ 0.08
<b>Bicarinaline-COOH</b>	B	439,16	219,58	109,79	54,90	27,45	13,72	6,86	3,43	1,71	0,86	0,43	0,21
	C	219,58	109,79	54,90	27,45	13,72	6,86	3,43	1,71	0,86	0,43	0,21	0,11
<b>Bicarinaline</b>	D	117,40	58,70	29,35	14,68	7,338	3,67	1,83	0,92	0,46	0,23	0,11	0,06
	E	117,40	58,70	29,35	14,68	7,338	3,67	1,83	0,92	0,46	0,23	0,11	0,06
<b>Mellitine</b>	F	410,00	205,00	102,50	51,25	25,63	12,81	6,40	3,20	1,60	0,80	0,40	0,20
	G	410,00	205,00	102,50	51,25	25,63	12,81	6,40	3,20	1,60	0,80	0,40	0,20
--	H	<i>Témoins croissance (0 peptide)</i>											

**Tableau 47 : Concentrations exactes en peptides testées sur *S. xylosus*.**

£ témoin négatif (PBS)

€ témoin positif (mélange de streptomycine et de pénicilline)



**Figure 90 : Résultat du test MTT sur *S. xylosus* ATCC 35033 avec la bicarinaline.**

Les six premiers puits de la ligne A contiennent des *S. xylosus* incubés en présence de PBS, de même pour les sept premiers puits de la ligne H.

Les puits marquant la CMI des différents réactifs sont encerclés en rouge.

En se reportant au Tableau 47, la CMI de la bicarinaline et celle de son homologue carboxylé sur la souche référencée de *S. xylosus* sont respectivement de 14,68 et 27,45  $\mu\text{g/mL}$ . La mellitine présente une CMI égale à 25,63  $\mu\text{g/mL}$  sur cette souche.

### 5.2.2 Autres souches bactériennes

Cette étude microbiologique a été élargie à d'autres souches telles que *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium smegmatis*.

⇒ *Listeria monocytogenes*

Voici le schéma expérimental des plaques 96 puits où la concentration de peptide en solution en µg/mL est indiquée pour chaque puit.

<b>Plaque 1 :</b>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Témoins (µL)	A	£ 10	£ 5	£ 2.5	£ 1.25	£ 0.63	£ 0.31	€ 5	€ 2.5	€ 1.25	€ 0.63	€ 0.31	0
Peptide2-COOH	B	500	250	125	62,50	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	0
	C												
Peptide2	D	500	250	125	62,50	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	0
	E												
Mellitine	F	19	9,5	4,75	2,37	1,18	0,59	0,29	0,15	0,07	0,04	0,02	0
	G	9,5	4,75	2,37	1,18	0,59	0,29	0,15	0,07	0,04	0,02	0,01	0
--													
<b>Plaque 2 :</b>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Témoins (µL)	A	£ 10	£ 5	£ 2.5	£ 1.25	£ 0.63	£ 0.31	€ 5	€ 2.5	€ 1.25	€ 0.63	€ 0.31	0
Bicarinaline-COOH	B	252,7	126,3	63,17	31,59	15,79	7,89	3,95	1,97	1,00	0,50	0,25	0
	C												
Bicarinaline	D	14,47	7,23	3,62	1,81	0,90	0,45	0,22	0,11	0,05	0,03	0,01	0
	E												

Tableau 48 : Concentrations exactes en peptides testées sur *L. monocytogenes*.

£ témoin négatif (PBS)

€ témoin positif (mélange de streptomycine et de pénicilline)

Résultats :

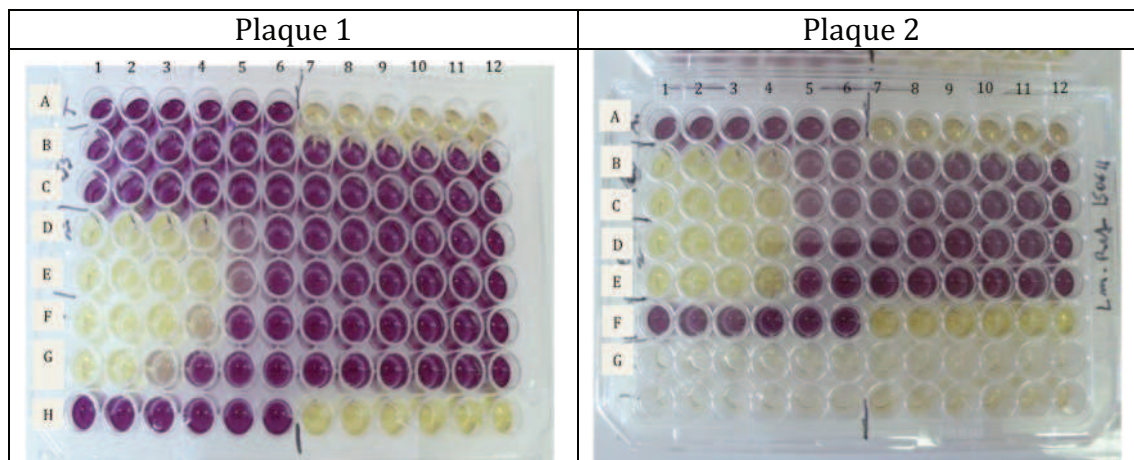


Figure 91 : Photos des plaques 96 puits suite au test MTT appliqué sur la souche *L. monocytogenes* ATCC 13932.

Plaque 1 → ligne A : témoins ; B-C : concentrations en peptide 2-COOH ; D-E : concentrations en peptide 2 ; F-G : concentrations en mellitine ; H : témoins.

Plaque 2 → ligne A : témoins ; B-C : concentrations en bicarinaline -COOH ; D-E : concentrations en bicarinaline ; F : témoins.



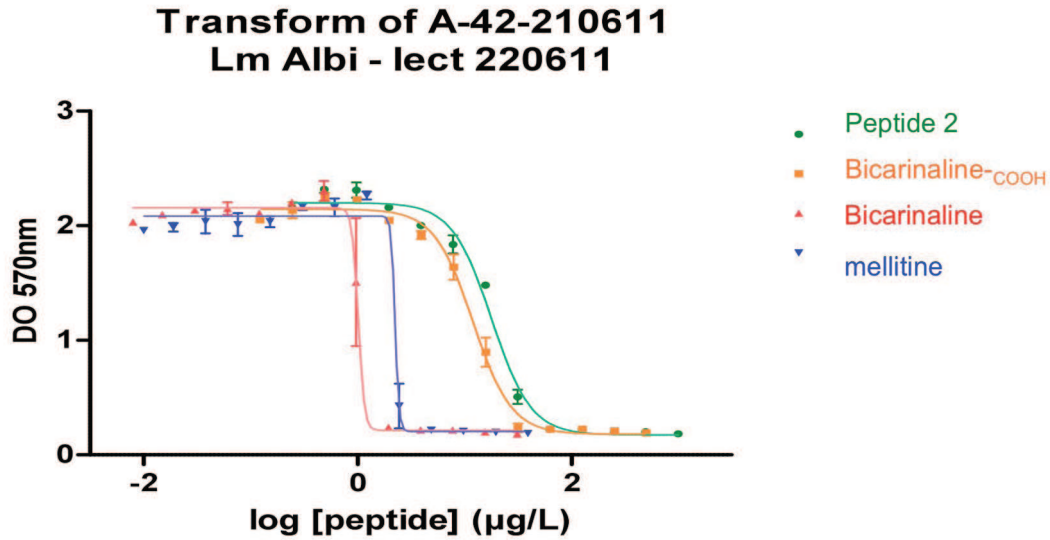


Figure 92 : Courbes « dose-effet » de la bicarinaline et de son homologue carboxylé ainsi que de la mellitine pour la détermination des  $CI_{50}$  sur *L. monocytogenes* ATCC 13932.

Les courbes « dose-effet » représentées par la Figure 92 révèlent une activité du peptide 2 sur la souche référencée de *L. monocytogenes*. Ce résultat est intéressant puisque ce peptide n'avait pas montré d'activité antibactérienne jusqu'à présent.

		Composés testés $CI_{50}$ en µg/mL				
		Bicarinaline	Bicarinaline <sub>COOH</sub>	Peptide-2	Peptide-2- <sub>COOH</sub>	Mellitine
<b><i>L. m</i> ATCC 13932</b>	Moyenne	<b>1,220</b>	<b>12,462</b>	<b>23,730</b>	<b>&gt;500</b>	<b>2,181</b>
	Ecart-type	0,206	3,342	1,260	-	0,593
<b><i>L. m</i> (LDA)</b>	Moyenne	<b>0,938</b>	<b>8,531</b>	<b>20,117</b>	<b>&gt;500</b>	<b>1,965</b>
	Ecart-type	0,084	3,119	5,362	-	0,336

Tableau 49 : Récapitulatif des  $CI_{50}$  des différents peptides, calculées pour les *L. monocytogenes*.

Malgré son action antibactérienne sur les *Listeria*, le peptide 2 apparaît comme l'agent antibactérien le moins puissant comparé à la bicarinaline, à son homologue carboxylé et à la mellitine. En effet, ses  $CI_{50}$  sont 10 fois supérieures à celles de la mellitine et 20 fois supérieures à celles de la bicarinaline. Après avoir montré l'influence de l'amidation sur la conformation des peptides, nous observons son rôle déterminant dans l'activité antibactérienne. En effet, le peptide 2 carboxylé à l'extrémité C-terminale n'inhibe pas la croissance des *Listeria* contrairement à son homologue amidé.

En se référant au Tableau 48 et à la Figure 91 (plaque 2), nous pouvons déterminer la CMI de la bicarinaline et de son homologue carboxylé. Ces dernières sont respectivement de 31,59 et 1,81 µg/mL.

⇒ *Mycobacterium smegmatis*

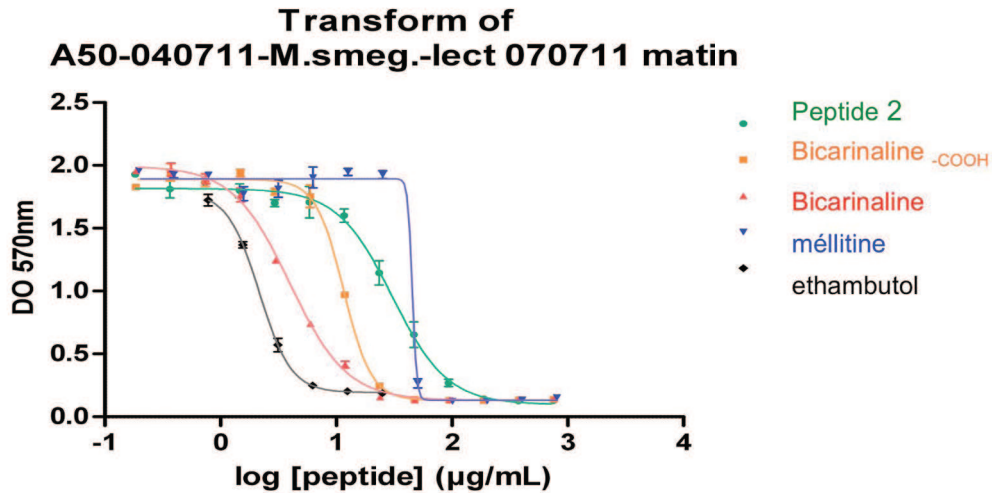


Figure 93 : Courbes « dose-effet » de la bicarinaline et de son homologue carboxylé ainsi que de la méllitine et de l'éthambutol pour la détermination des  $CI_{50}$  sur *M. smegmatis mc<sup>2</sup> 155*.

Le peptide 2 inhibe faiblement la croissance de *M. smegmatis* (Figure 93) tout comme la méllitine puisque leur  $IC_{50}$  est de 44 µg/mL (Tableau 50).

	Composés testés $CI_{50}$ en µg/mL					
	Bicarinaline	Bicarinaline <sub>COOH</sub>	Peptide-2	Peptide-2- <sub>COOH</sub>	Mellitine	Ethambutol
Moyenne	23,16	24,98	44,09	>500	44,33	2,26
Ecart-type	16,06	13,49	11,72	-	12,25	0,35

Tableau 50 : Récapitulatif de la  $CI_{50}$  des différents peptides, calculées pour *M. smegmatis mc<sup>2</sup> 155*.

L'amidation de la bicarinaline n'a pas d'influence sur l'action antibactérienne sur *Mycobacterium smegmatis* puisque la  $CI_{50}$  calculée et celle de son analogue carboxylé sont quasiment identiques. L'action de la bicarinaline reste, néanmoins, dix fois moins puissante que celle de l'antibiotique de référence l'éthambutol puisque ce dernier présente une  $CI_{50}$  de 2,26 µg/mL. Les valeurs importantes des écart-types révèlent une disparité entre les valeurs des  $CI_{50}$  calculées pour chaque composé excepté pour l'éthambutol.

L'évaluation du pouvoir antibactérien de la bicarinaline sur les souches *M. tuberculosis* et *E. sagazakii* est en cours de réalisation à l'IPBS ainsi qu'au laboratoire.



---

## 6 Discussion

---

### 6.1 Structure primaire des peptides

---

Les séquences en acides aminés des deux peptides isolés sont :

Bicarinaline **K-I-K-I-P-W-G-K-V-K-D-F-L-V-G-G-M-K-A-V**-NH<sub>2</sub>

Peptide-2 **L-F-K-E-I-L-E-K-I-K-A-K-L**-NH<sub>2</sub>

Une des principales caractéristiques des peptides isolés est leur richesse en lysine ainsi qu'en leucine et isoleucine. Les résidus de lysine sont fréquemment présents dans la composition des peptides cationiques antimicrobiens (Tableau 51).

Peptide	séquence	Masse (kDa)	Hôte/ synthétique	référence
Moricine-1	MN <b>ILK</b> FFVF IVAMS <b>L</b> VSCS TAAPAK <b>IP</b> IK AI <b>K</b> TVG <b>K</b> AVG <b>KGL</b> RA <b>IN</b> IAS TANDVF <b>NFLK</b> PK <b>KRKH</b>	7,16	Papillon	Hara et al., 1995
Mellitine	GI <b>G</b> AV <b>LK</b> VLT TGL <b>PAL</b> <b>IS</b> W <b>I</b> L <b>KR</b> KRQQ	2,85	Abeille	Baudier et al., 1987
Mastoparan-1	<b>IDW</b> <b>KLL</b> DAA <b>KQIL</b>	1,65	Guêpe	Souza et al., 2005
Anopline	<b>GLL</b> <b>KRIK</b> TL <b>L</b>	1,15	Guêpe	Konno et al., 2001
Decoraline	<b>SLL</b> <b>SLIR</b> <b>KLI</b> T	1,26	Guêpe	Konno et al., 2007
Oxyopinine-1	FR <b>GLAK</b> LL <b>KI</b> GL <b>K</b> SFAR <b>V</b> L <b>K</b> <b>KV</b> LP <b>KAA</b> K <b>AG</b> <b>KALAK</b> SMADE N <b>AI</b> R <b>Q</b> Q <b>NQ</b>	5,22	Araignée	Corzo et al., 2002
Eumenitine	<b>L</b> N <b>L</b> K <b>G</b> I <b>F</b> K <b>K</b> V AS <b>LL</b> T	1,64	Guêpe	Konno et al., 2006
Ponericine W3	GI <b>W</b> GT <b>LAK</b> IG <b>IK</b> AVPR <b>IS</b> M <b>L</b> K <b>K</b> K <b>K</b> Q	2,86	Fourmi	Orivel et al., 2001
Dinoponeratoxin Da-2501	FWGT <b>LAK</b> L <b>AL</b> <b>K</b> AVPA <b>VM</b> G <b>M</b> I <b>K</b> K <b>E</b>	2,50	Fourmi	Johnson et al., 2010
Mastoparan C	<b>L</b> N <b>L</b> K <b>AL</b> L <b>AVA</b> <b>K</b> K <b>IL</b>	1,50	Frelon	Argiolas et al., 1984
Bombolitine-7	<b>L</b> K <b>L</b> K <b>D</b> IL <b>G</b> K <b>I</b> <b>K</b> V <b>IL</b> SH <b>L</b> N <b>K</b>	2,17	Bourdon	Favreau et al., 2006

Tableau 51 : Séquences de toxines issues du venin d'arthropodes.

Les résidus lysine sont annotés en gras et les résidus isoleucine et leucine en rouge.

En interrogeant la base de données APD en vue de rechercher des homologies de séquences avec d'autres peptides antimicrobiens, les résultats obtenus ont révélé de fortes similarités entre la bicarinaline et des PAMs d'amphibiens.

Le programme d'alignement de cette base de données réalise un alignement local qui se restreint aux régions dans lesquelles la similarité est forte entre les deux séquences peptidiques à comparer, tout en excluant le reste de ces séquences.

Le Tableau 52 révèle que la bicarinaline partage 40 % d'homologie de séquence avec l'hymenochirine-3B et 4B et la magainine 1. Cette information nous amène à supposer que la bicarinaline partagerait également le mode d'action de ces PAMs par conséquent qu'elle agirait au niveau des membranes des bactéries.

PAMs	Origine	ID APD	Activité	Alignement local	% H
Hymenochirine-3B	Grenouille (Pipidés)	AP01966	B (G+/G-), F	+ I K I P + A V V K D T L K K V A K G V L S A V A G A L T Q K I K I P W G K V K D F L + + V + + G G M K A V + + + +	40
Hymenochirine-4B	<i>Hymenochirin boettgeri</i>	AP01967		+ I K I P + A F V K D T L K K V A K G V I S A V A G A L T Q K I K I P W G K V K D F L + + V + + G G M K A V + + + +	40
Magaimine 1	Grenouille <i>Xenopus laevis</i>	AP00771	B (G+/G-)	G I G K F L H S A G K F G K A F + V G E I M K + S K I + K + + I P W G K + V K D F L V G + G M K A V	40
Maximine 15	Crapaud <i>Bombina maxima</i>	AP01730	B (G+/G-)	G I G T K I + L G G V K A A L K G A L K E L A S T Y V N K I + + K I P W G K V K D F L V G G M K + + A + + + V +	39,28

**Tableau 52 : Alignements de séquences peptidiques entre la bicarinaline et des PAMs d'amphibiens.**

ID APD : numéro d'identifiant dans la base de données APD ; B : antibactérien ; G+ : Gram+ ; G- : Gram- ; F : antifongique ; %H : pourcentage d'homologie. La séquence peptidique de la bicarinaline est représentée en italique et les régions similaires en bleu.

---

Les précédentes investigations menées sur d'autres espèces de *Tetramorium*, *T. caespitum* et *T. guineens* (Von Sicard, 1989), nous informaient de leur richesse en acide aspartique et acide glutamique. Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette abondance en acide aspartique et acide glutamique dans le venin serait commune pour toutes les espèces de *Tetramorium*. Malgré la présence de ces deux résidus dans la composition des deux peptides isolés, nous ignorons leur taux de présence au sein du venin brut de *T. bicarinatum*. L'identification des autres composés du venin brut permettrait de confirmer cette hypothèse.

---

## 6.2 Structure secondaire des peptides

---

Les analyses de dichroïsme circulaire ont fourni les premières informations sur la structure secondaire de la bicarinaline et du peptide-2. Dans un environnement micellaire, ces deux peptides adoptent une conformation en hélice  $\alpha$ . Les pourcentages d'hélicité maximum calculés pour la bicarinaline et pour le peptide 2 sont respectivement 44% et 49%. Ceci nous indique que seule une portion de chaque peptide se structure en hélice  $\alpha$  et que le reste adopterait un autre type de conformation (Zaslouff, 2002). L'objectif des prochaines expériences sera donc de mieux comprendre la façon dont se structure la bicarinaline en identifiant la position exacte de cette hélice au sein du peptide et de confirmer la structure aléatoire de la seconde partie du peptide. Pour cela, des études par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) seront indispensables pour approfondir l'étude structurale de la bicarinaline.

---

## 6.3 Pouvoir antibactérien de la bicarinaline

---

D'après les résultats obtenus par le test MTT, la bicarinaline est le seul peptide de la sous fraction active à agir sur l'ensemble des souches bactériennes : elle inhibe aussi bien la croissance des staphylocoques coagulase positives et négatives que celle des listeria et mycobactéries. Nous avons vu que pour certaines souches telles que les *Staphylococcus xylosum*, la bicarinaline était plus puissante que la mellitine, ces résultats sont donc encourageants pour la suite du projet qui consistera non plus à comparer l'action de deux toxines entre elles mais celles de la bicarinaline avec un antibiotique adapté à chaque type de souche bactérienne.

Le peptide 2, inactif sur les staphylocoques, inhibe la croissance des *Listeria*. En comparaison avec la bicarinaline et la mellitine, ce peptide n'est pas un agent

antibactérien très puissant. Ce résultat nous interpelle sur le mode d'action de ces deux peptides :

- Ont-ils des cibles cellulaires différentes ?
- La longueur du peptide influence-t-elle l'action antibactérienne de ce dernier sur les staphylocoques ?

Grâce à la synthèse, en disposant de quantités suffisantes des deux peptides, il sera possible d'étudier en parallèle leur mode d'action.

---

#### 6.4 Relation structure-activité

---

Nous avons constaté l'importance de l'amidation de l'extrémité C-terminale dans l'activité antibactérienne de la bicarinaline. Les analyses de dichroïsme circulaire ont confirmé que cette amidation avait une influence positive sur le pourcentage d'hélicité du peptide. La présence du groupement amide en fin de séquence stabiliserait la portion hélicoïdale à l'aide de liaisons hydrogènes. Cette stabilisation de l'hélice par le groupement amide C-terminal a été démontrée dans la littérature. En effet, des analyses RMN de l'astressine, puissant inhibiteur de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, ont révélé qu'en absence de groupement amide en position C-terminale, la structure hélicoïdale du peptide était déstabilisée entraînant ainsi une forte diminution de l'affinité de ce peptide pour les récepteurs de la *corticotropin-releasing hormone* (CRH) (Grace *et al.*, 2007). Il serait intéressant de savoir si la portion hélicoïdale est la seule partie de la bicarinaline à interagir avec les membranes et de connaître les mécanismes de cette interaction.

Les résultats concernant la caractérisation de la bicarinaline dans le venin de *Tetramorium bicarinatum* ont donné suite à un article soumis dans le journal Peptides (Annexe II).

### 7 Test colorimétrique à partir de vésicules Lipides/PDA

D'après la littérature, la mise en place du test semble assez simple et ne requiert pas de matériel particulier (Kolusheva *et al.*, 2000 ; Eun-Kyung Ji *et al.*, 2003). Cependant, nous avons rencontré quelques difficultés dans la création de ces liposomes et avons tenté à plusieurs reprises d'aboutir à un protocole permettant de réaliser une solution homogène en vésicules.

## 7.1 Amélioration du protocole de synthèse

Le protocole de synthèse des vésicules utilisé à l'origine était basé sur celui mis au point par une équipe coréenne (Eun-Kyung Ji *et al.*, 2003) :

L'emploi de ce protocole s'est avéré insatisfaisant pour plusieurs raisons:

- l'évaporation sous flux d'azote ne permet pas d'obtenir un film lipidique homogène au fond du flacon en verre de 2 mL.
- l'étape de réhydratation est une étape cruciale pour la formation des vésicules et une simple reprise du film lipidique avec de l'eau ultrapure ne suffit pas à entraîner la totalité des lipides en solution.
- la filtration de la solution à température ambiante a provoqué un colmatage de la membrane des filtres. Nous avons perdu un grand nombre de liposomes puisque notre émulsion finale ne présentait pas une coloration bleue intense.

Au cours de cette thèse, nous avons modifié les premières étapes du protocole initial pour résoudre les différents problèmes évoqués ci-dessus. Ce protocole est décrit dans la partie matériel et méthodes.

## 7.2 Test avec la mellitine

Si les améliorations apportées lors de la synthèse des vésicules se sont révélées encourageantes pour la suite du test, nous nous sommes toutefois heurtés à des problèmes majeurs lors du test lui-même. En effet, un des premiers obstacles a été l'absence de contrôle sur la taille des vésicules synthétisées. Les liposomes formant facilement des agrégats, il était difficile de les répartir de manière homogène dans une plaque 96 puits.

Pour la mise en oeuvre du protocole, les premiers essais ont été réalisés avec la mellitine afin de valider le test. Les vésicules testées sont composées de phospholipides DPPC et de PDA dans les proportions 4/6.

Plan d'une plaque 96 puits :

Puits	1	2	3
	<b>Concentration en mellitine en mM</b>		
<b>A</b>	0		
<b>B</b>	0,012		
<b>C</b>	0,059		
<b>D</b>	0,085		
<b>E</b>	0,116		

Tableau 53 : Concentration en mellitine testées sur les vésicules DPPC/PDA (4/6)

Photos :



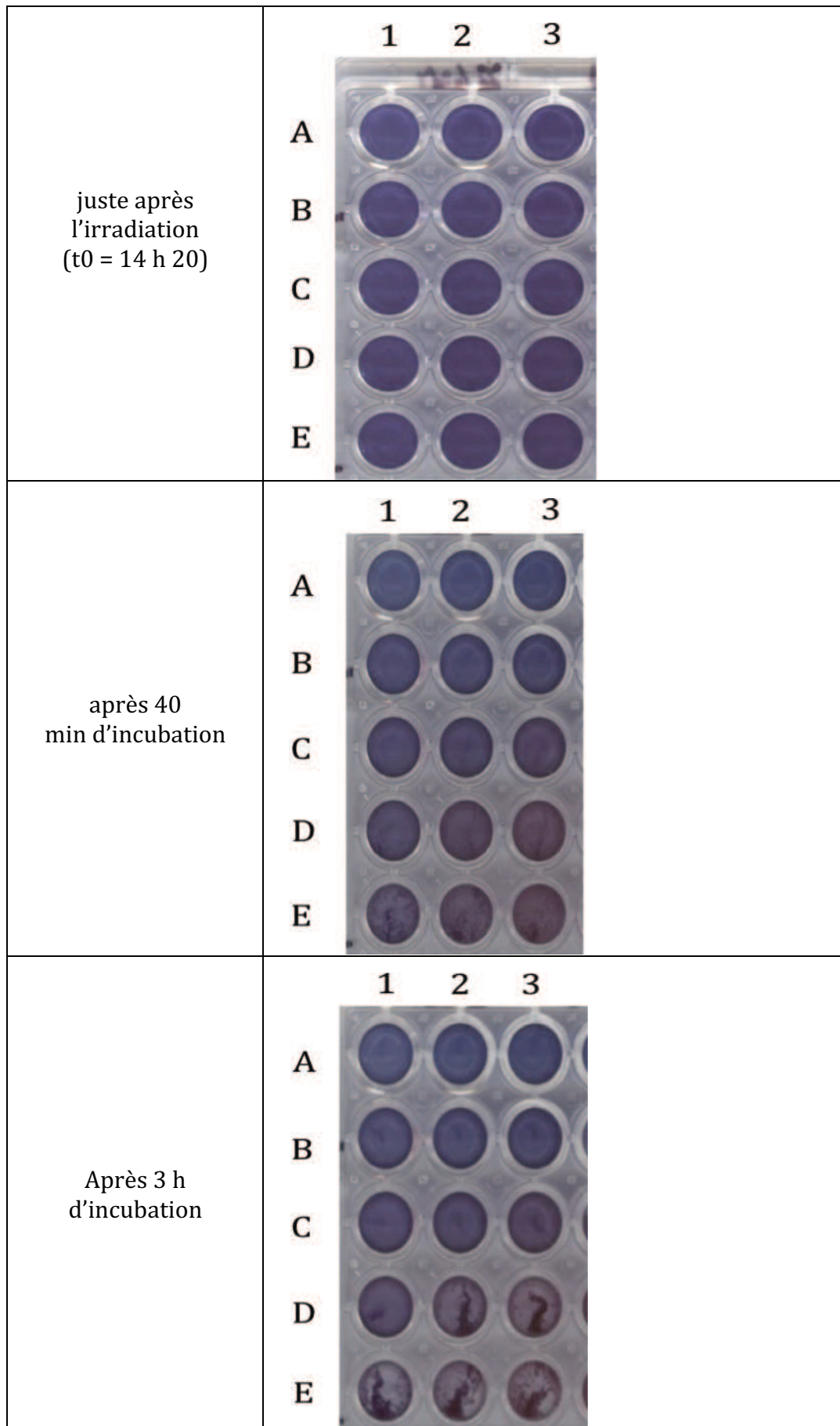


Figure 94 : Vésicules + mellitine après différents temps d'incubation (0, 40 min et 3 h).

Les vésicules soumises à des concentrations en mellitine égales à 0,085 et 0,1 mM précipitent au bout de 40 min d'exposition. Ce phénomène est clairement observé au bout de 3h d'incubation.

Calcul du % de réponse colorimétrique (RC):

$$\%RC = [(PB_0 - PB_t) / PB_t] \times 100$$

$$\text{Avec } PB = A_{640 \text{ nm}} / (A_{640 \text{ nm}} + A_{500 \text{ nm}})$$

Ligne [melit]	35 min			60 min			35 min		60 min	
	1	2	3	1	2	3	Moy	Ecart type	Moy	Ecart type
<b>A</b> 0	-0,47	-0,51	-0,51	-0,58	-0,42	-0,43	<b>-0,49</b>	0,02	<b>-0,48</b>	0,09
<b>B</b> 0,012	4,11	3,51	2,98	5,17	4,55	4,20	<b>3,53</b>	0,57	<b>4,64</b>	0,49
<b>C</b> 0,056	9,00	8,80	14,57	9,47	9,90	16,82	<b>10,79</b>	3,28	<b>12,06</b>	4,12
<b>D</b> 0,085	13,83	22,07	25,80	15,24	23,14	27,25	<b>20,56</b>	6,12	<b>21,88</b>	6,11
<b>E</b> 0,116	21,69	25,13	27,24	22,75	26,61	28,13	<b>24,69</b>	2,80	<b>25,83</b>	2,77

Tableau 54 : Calcul des %RC en fonction des concentrations de mellitine et du temps d'incubation.

Dans ce cas de figure, le pourcentage colorimétrique est stable pour les vésicules de même rangée (A et B) soumises à de faibles concentrations en mellitine.

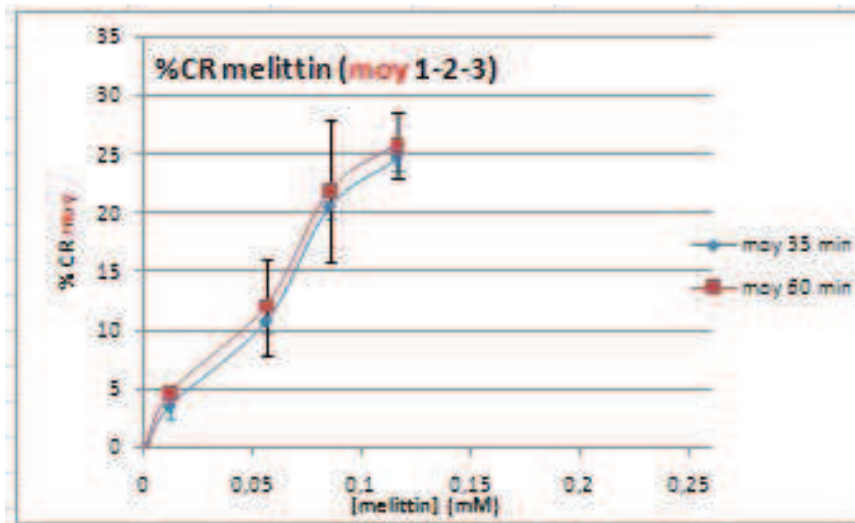


Figure 95 : %RC des vésicules ayant subi l'action de la mellitine après 35 et 60 min d'incubation.

Lorsque la concentration en mellitine augmente, nous assistons à une hétérogénéité des valeurs du pourcentage de la réponse colorimétrique au sein d'une même rangée de vésicules. Les écarts-types représentés à la Figure 95, montre l'absence d'homogénéité entre les triplicats.

Nous nous sommes également confrontés au problème de précipitation des vésicules en présence de mellitine à 0,1 mM dans le milieu à partir de 40 min d'incubation (Figure

94). Ce phénomène, non recensé dans la littérature, fausse la lecture des densités optiques.

Ainsi, ce test est difficilement reproductible puisque les pourcentages de réponse colorimétrique obtenus à l'issue de trois expériences consécutives ne présentent pas le même ordre de grandeur. En effet, pour une concentration en mellitine de 0,116 mM, le %RC a atteint 60% lors de l'expérience intitulée A12 alors qu'il n'excède pas 30% lors de l'expérience A13 (Figure 96).

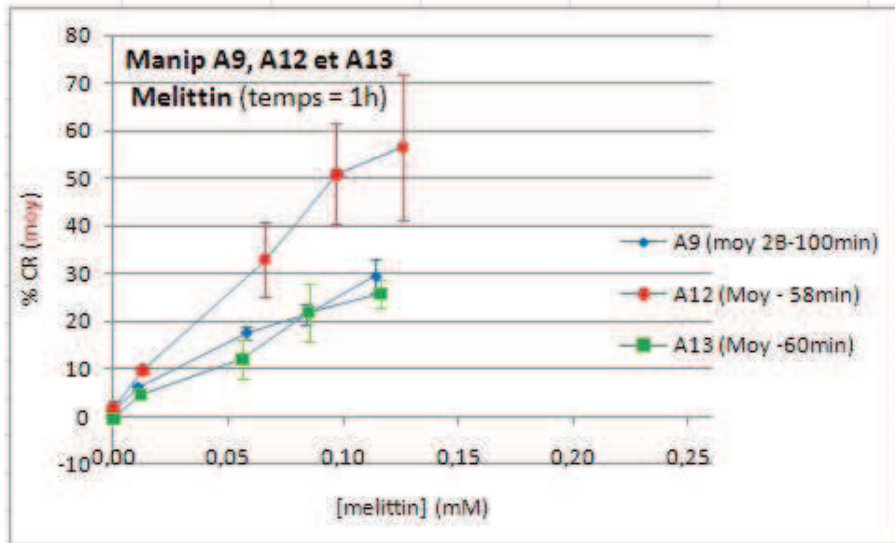


Figure 96 : Disparités des valeurs du %RC d'un même type de complexe vésiculaire au cours de trois expériences consécutives (A9-A12-A13).

Autre difficulté rencontrée : la dégradation rapide des vésicules lipides/PDA au cours du temps. Le PDA est un réactif très sensible à la moindre variation de température ou de pH. Malgré un stockage des solutions vésiculaires à 4°C et à l'abri de la lumière, nous avons assisté à leur dégradation rapide (3 jours).

Suite à ces divers problèmes, le test colorimétrique des vésicules lipides/PDA a été abandonné et des techniques alternatives sont étudiées pour élucider le mécanisme d'action de la bicarinaline sur la membrane cytoplasmique.

---

## Perspectives de l'étude

L'objectif de cette étude visait à étudier les différentes activités biologiques des sécrétions venimeuses des fourmis *Crematogaster striatula* et *Tetramorium bicarinatum* et à caractériser les molécules responsables de ces activités. Le choix d'étudier en parallèle deux espèces de fourmis au mode de vie différent et au système vulnérant bien distinct avait pour but de mettre en évidence diverses activités biologiques. Le contenu du réservoir à venin et celui de la glande de Dufour sont respectivement soluble et insoluble dans l'eau ce qui nous laisse supposer des natures chimiques donc des propriétés physico-chimiques différentes et par conséquent des activités biologiques différentes.

## Chapitre 1 : *Crematogaster striatula*

### 1 L'identification des molécules d'intérêt

Nous ignorons actuellement si la paralysie engendrée par le liquide de Dufour est le fait d'une ou de plusieurs molécules associées et nous souhaitons confirmer l'action neurotoxique de cette substance. Les substances neurotoxiques peuvent avoir différentes cibles allant des canaux ioniques, aux récepteurs neuronaux jusqu'au neurotransmetteur lui-même.

Travailler sur un mélange complexe ne semble pas judicieux pour la réalisation des tests de neurotoxicité *in vitro*. En effet, la diversité des composés du contenu de Dufour ne nous permettra pas de conclure sur son mode d'action.

Il est donc impératif d'identifier les principales substances de cette sécrétion et de les isoler afin de les tester individuellement sur une cible particulière. Pour cela, différentes techniques chromatographiques peuvent permettre de séparer les familles de molécules (Daloze *et al.*, 1986 ; Leclercq *et al.*, 1997).

### 2 Mode d'action des molécules aux propriétés insecticides

De nombreuses neurotoxines de venin d'araignées et de guêpes ont pour cible les canaux ioniques (Beleboni, 2004). Une grande majorité de ces neurotoxines sont de nature peptidique comme la huwentoxin-V isolée du venin d'araignée *Ornithoctonus huwena*, agissant sur les canaux calcium des neurones dorsaux médians des cafards (Deng *et al.*, 2008). Cependant certains alcaloïdes comme la batrachotoxine, neurotoxine isolée de sécrétions venimeuses de dendrobates, sont connus pour se lier aux canaux sodiques du système nerveux et de bloquer la sécrétion de chlorure de sodium dans la lumière des cellules (Zubov *et al.*, 1984). Nous ignorons la nature exacte du composé présentant une masse de 1583 Da, il serait intéressant d'évaluer son action sur différents canaux ioniques des neurones DUM (Dorsal Unpaired Median) de la blatte *Periplaneta americana* afin de savoir si les canaux ioniques sont ses principales cibles et de connaître la nature de ces derniers. Les neurones DUM des insectes sont un modèle de choix lors d'études électrophysiologiques puisqu'ils expriment une large variété de canaux ioniques comme les canaux calciques et sodiques et des canaux potassiques

---

calcium et sodium dépendants (Grolleau et Lapied, 2000). L'étude sur ces canaux ioniques s'effectuera à l'aide des techniques de patch-clamp.

Au sein du système nerveux central des insectes, se trouvent des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChRs) synaptiques et extrasynaptiques jouant un rôle important dans la transmission et la régulation de l'information nerveuse (Gundenfinger *et al.*, 1992). Ces récepteurs sont les principales cibles d'insecticides synthétiques comme l'imidaclopride, appartenant à la famille des néonicotinoïdes (Liu *et al.*, 2005). Une fois les différents composés de la glande de Dufour isolés, nous pourrions les tester sur ce type de récepteurs et comparer leur action avec celle d'insecticides commercialisés.

Les alcaloïdes isolés du venin des fourmis de feu *Solenopsis invicta* tels que l'isosolenopsine A ont la capacité d'inhiber l'oxyde nitrique synthétase neurale du cervelet de rat (Yi *et al.*, 2003). Cette enzyme agit essentiellement aux niveau des synapses glutamatergiques (Ledo, Frade *et al.*, 2004). L'oxyde nitrique produit dans le système nerveux est un neuromodulateur agissant sur la relâche et la recapture de neurotransmetteurs et dans le développement des neurones chez les vertébrés et chez les insectes (Colasanti et Venturini, 1998). Les molécules du liquide de Dufour sont-elles capables d'inhiber une action enzymatique comme le font les alcaloïdes des venins ?

## Chapitre 2 : *Tetramorium bicarinatum*

Nous avons démontré que le venin brut de cette espèce présente une activité antibactérienne plus ou moins efficace selon la souche bactérienne cible. En effet, la IC<sub>50</sub> observée pour *S. aureus* et *M. smegmatis* est élevée puisqu'elle est de l'ordre de 500 µg/mL. Le venin brut de *T. bicarinatum* possède une action à large spectre puisqu'il agit aussi bien sur les souches Gram+ que sur les Gram-. Les résultats des expériences menées avec la protéinase K ont révélé la nature peptidique de l'activité du venin brut.

Dans un premier temps, cette recherche a débouché sur l'isolement d'une fraction qui regroupe l'ensemble des molécules de faible poids moléculaire (>3 kDa) du venin et qui est responsable de l'activité antibactérienne du venin brut contre nos souches bactériennes. Ce résultat coïncide puisque la majorité des composés actifs des venins d'hyménoptères (abeilles, guêpes et fourmis) décrits dans la littérature, sont de petits peptides dont la taille n'excède pas les 5000 Da.

Le fractionnement de la fraction C par HPLC s'est imposé comme la suite logique pour cibler nos peptides d'intérêts. Nous avons identifié deux peptides dans la sous-fraction C<sub>11</sub> et leurs séquences ont été déterminées par séquençage *de novo* à l'aide de la spectrométrie de masse et de la dégradation d'Edman.

---

Les prochaines études consacrées à la bicarinaline auront pour but de répondre aux questions suivantes :

- Quel est son mode d'action exact et sa / ses principale(s) cible(s) ?
- Sa structure permet-elle d'expliquer l'action antibactérienne ?
- La bicarinaline a-t-elle une action antibactérienne suffisamment puissante pour neutraliser des souches bactériennes résistantes?
- La bicarinaline possède t-elle d'autres propriétés biologiques susceptibles d'intéresser les industries pharmaceutiques ?

## **1 Détermination du mode d'action de la bicarinaline**

Si la structure de la bicarinaline doit être examinée dans le détail, les prochaines étapes du projet auront comme objectif de nous renseigner sur son mode d'action.

---

### **1.1 Test colorimétrique vésicules Lipides/PDA**

S'agissant des tests destinés à caractériser la perturbation membranaire des vésicules artificielles ; les résultats avec la mellitine, en tant que peptide antimicrobien de référence, se sont avérés décevants à cause de l'absence de reproductibilité des pourcentages de réponse colorimétrique calculés dans les mêmes conditions (nature des vésicule, concentration en peptide) pour chaque expérience. Ce semi-échec est en partie dû au manque de contrôle de la taille des liposomes formés. En effet, nous ignorons le taux d'agrégats au sein de l'émulsion finale, ces derniers peuvent perturber l'interaction entre la mellitine et les membranes lipidiques et rendre impossible toute insertion de ce peptide au sein de la membrane. C'est pourquoi, la taille des vésicules pourrait être contrôlée par diffusion dynamique de la lumière (DLS = Dynamic Light Scattering). Cette technique est basée sur le principe de diffusion de la lumière par des particules soumises au mouvement Brownien. Cette diffusion qui varie avec le temps, est reliée au coefficient de diffusion des particules dans un milieu donné, et par conséquent, au diamètre des particules. La DLS permet de mesurer des particules dont la taille varie de 2 nm à 500 nm.

---

### **1.2 Relargage de la calcéine**

Un autre test basé sur des liposomes est régulièrement mentionné dans la littérature. Il s'agit de l'estimation du pourcentage de libération de la calcéine (Park *et al.*, 2011 ; Venugopal *et al.*, 2010). La première étape de ce test consiste à l'encapsulation d'un



---

marqueur fluorescent, la calcéine, dans des liposomes artificiels. Ceux-ci seront ensuite exposés à plusieurs concentrations de peptides. Le relargage de la calcéine est un indicateur de perméabilisation membranaire induite par des peptides et la quantité de calcéine libérée est mesurée par spectrofluorométrie. La calcéine est le fluorochrome le plus utilisé car il a la particularité d'émettre peu de fluorescence quand il est concentré (self-quenching) et de fluorescer en solution diluée (Düzgünes *et al.*, 2003).

Une fois encore ce test fait appel à la construction de liposomes impliquant la nécessité de contrôler leur taille par DLS. Il présente l'avantage de s'affranchir du PDA, qui est un réactif très sensible à son environnement. En fonction de la fluorescence émise, nous aurons une indication du niveau de perturbation de la membrane des liposomes engendrée par la bicarinaline.

---

### 1.3 Test avec le SYTOX green

---

L'étude de la perméabilisation membranaire des bactéries et levures peut s'effectuer également grâce à l'utilisation du SYTOX green, fluorochrome ayant une forte affinité pour l'ADN et connu pour son incapacité à traverser les membranes intactes de cellules vivantes (Roth *et al.*, 1997 ; Lebaron, 1998). Le principe de cette technique consiste à incuber dans un premier temps les micro-organismes avec ce fluorochrome à l'abri de la lumière. Les peptides antimicrobiens sont ensuite ajoutés au milieu, le mélange subit une seconde incubation. En cas de perméabilisation membranaire, le fluorochrome pénétrera dans le cytosol du micro-organisme pour aller se fixer sur la molécule d'ADN. Une fois fixé, le SYTOX green va fluorescer. Cette fluorescence est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre dont les longueurs d'excitation et d'émission sont réglées respectivement à 485 nm et 520 nm. L'intérêt du SYTOX green par rapport aux techniques des liposomes est la possibilité de travailler directement sur les microorganismes entiers et vivants que ce soient des bactéries ou des champignons (Park *et al.*, 2011 ; Thevissen *et al.*, 1999).

---

### 1.4 Interaction Peptide/Membrane

---

Les études réalisées en dichroïsme circulaire nous ont révélé que la bicarinaline a tendance à adopter une conformation en hélice  $\alpha$  dans un environnement mimant la présence de membranes. Une grande majorité de PAMs comprenant plus de 20 acides aminés et de structure secondaire similaire à la bicarinaline ont une action membranaire (formation de pores « en tonneau » ou pores toriques) sur les micro

organismes. De nombreuses techniques physico-chimiques complémentaires permettront de déterminer l'action exacte de notre peptide sur des systèmes membranaires.

#### **1.4.1 Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC)**

Cette technique est utilisée pour étudier les transitions thermiques d'un polymère lorsque celui-ci est chauffé à différentes températures. La DSC est donc tout indiquée pour évaluer les effets de la bicarinaline sur le comportement thermodynamique des membranes. En fonction de leur concentration, les PAMs induisent des modifications de la température et une variation d'enthalpie de la transition gel-liquide en phase cristalline des bicouches phospholipidiques (Seto *et al.*, 2007).

#### **1.4.2 Résonance plasmonique de surface (SPR)**

C'est une méthode de mesure de la liaison d'un ligand sur un récepteur adsorbé à la surface d'une couche métallique. Le système de détection est basé sur une variation de l'indice de réfraction à la surface d'un biocapteur. Lorsque qu'il y a liaison entre le ligand et le récepteur, on assiste à une augmentation du signal SPR et inversement, lorsque que le complexe se dissocie, ce signal diminue. Cette technique permet de révéler l'affinité relative des PAMs envers les différents systèmes membranaires en observant la vitesse et la quantité de peptides qui s'adsorbent ou désorbent des bicouches lipidiques. C'est par l'intermédiaire de cette technique que Mozolits et ses collaborateurs ont pu mesurer, en temps réel, la fixation de la magainine 1 et de la mellitine sur des liposomes (Mozolits *et al.*, 2001). En résumé, ce système de mesure comprend un biocapteur composée d'une lamelle de verre sur laquelle est déposée une fine pellicule d'or provoquant un phénomène de résonance plasmonique de surface. Un polymère composé de longues chaînes alcanethiol recouvre la surface métallique dorée. De petites vésicules unilamellaires (SUV) de DMPC ou DMPG vont ensuite s'adsorber spontanément sur cette surface et former, au final, une bicouche membranaire hybride. Les peptides à tester sont solubilisés dans du tampon phosphate et vont, par le biais d'un flux, entrer en contact avec la membrane hybride. La dernière étape consiste en une régénération de la surface pour décrocher les complexes et revenir à la ligne de base. Une centaine de cycles peut être réalisée sur une même surface.

### 1.4.3 RMN des solides : dynamique des lipides

Pour l'étude RMN en milieu membranaire, deux noyaux sont principalement utilisés pour décrire la dynamique des membranes biomimétiques : le phosphore ( $^{31}\text{P}$ ) et le deutérium ( $^2\text{H}$ ). Le phosphore-31, plus sensible que le carbone, est naturellement présent au niveau des têtes polaires des phospholipides membranaires et présente une abondance naturelle avoisinant les 100%. À l'opposé, le deutérium est un élément d'une abondance naturelle infinitésimale et non présent dans les membranes. Son étude nécessite de marquer préalablement les lipides au deutérium. La  $^{31}\text{P}$ -RMN et  $^2\text{H}$ -RMN vont apporter, respectivement, des informations sur le mouvement et les changements de conformation des têtes polaires des phospholipides au niveau de l'interface aqueuse et au cœur de la bicouche lipidique en cas d'interaction avec des PAMs. Les spectres résultant de l'interaction entre des PAMs d'amphibiens et les modèles membranaires de type DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine) ont montré qu'en présence de lipides zwitterioniques, les peptides interagissent partiellement avec la surface membranaire. Malgré une augmentation de leur concentration dans le milieu, les aureines 2.2 et 2.3 ne perturbent qu'une faible proportion des têtes polaires lipidiques des phospholipides des membranes DMPC (Pan *et al.*, 2007). À contrario, en présence de membranes anioniques hybrides de type DMPC/DMPG (dimyristoylphosphatidylglycerol), les interactions peptides/membrane sont plus intenses.

Les expériences en RMN réalisées *in vivo* sur des bactéries Gram+ ont montré que la maculatine 1.1 ou caerine 1.1 induisait rapidement une perte de l'intégrité membranaire de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus epidermis* conduisant à une augmentation du signal isotrope en  $^{31}\text{P}$ -RMN (Chia *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent la formation de pores membranaires et par conséquent une fuite du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire.

## 2 Valorisation de la bicarinaline en tant que peptide antimicrobien

La découverte et l'utilisation de peptides antimicrobiens sont des thématiques prometteuses puisque l'objectif principal est de contrer la perte d'efficacité des antibiotiques classiques (Gordon *et al.*, 2005).

Pour la suite du projet, il sera donc nécessaire de tester la bicarinaline sur des souches résistantes aux antibiotiques comme les staphylocoques dorés MRSA (Méthicilin

résistant *Staphylococcus aureus*). Ceux-ci résistent aux antibiotiques de type «  $\beta$ -lactame » inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne et qui sont habituellement prescrits pour leur traitement.

Des chercheurs ont combiné l'action de la ranalexine, peptide antimicrobien cationique isolé des sécrétions dermiques de la grenouille *Rana catesbeiana*, avec celle de la lysotaphine, enzyme agissant contre les *S. aureus*, dans le but de les tester sur des souches MRSA et de traiter des souris infectés par ces dernières (Desbois *et al.*, 2010). Ces deux agents antibactériens se sont révélés plus efficaces en mélange qu'isolés sur les cultures des souches MRSA et de *Staphylococcus epidermis* issu d'échantillons hospitaliers.

Si l'action de la bicarinaline seule est insuffisante face à des souches résistantes de staphylocoques doré, il sera intéressant de la tester en présence de la lysotaphine afin d'observer une éventuelle synergie et comparer leur action avec celle d'antibiotiques utilisés pour ce type d'infections.

### 3 Evaluation du pouvoir antifongique de la bicarinaline

La plupart des peptides antimicrobiens naturels sont connus pour être également d'excellents antifongiques et pour servir de modèle pour des antifongiques de synthèse (Arenas *et al.*, 2009).

Les mycoses sont des infections de la peau causées par des champignons microscopiques. Elles peuvent être superficielles touchant ainsi l'épiderme ou les muqueuses mais peuvent être également systémiques (infection touchant l'ensemble de l'organisme de personnes immunodéprimées). Les mycoses superficielles sont très fréquentes chez l'Homme et représentent 10 % des maladies de la peau.

La bicarinaline pourrait être testée sur plusieurs champignons responsables de mycoses comme ceux cités ci-après :

Champignons	Pouvoir pathogène	Références
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Candidoses et candidémie chez l'immunodéprimé	Barret, 2002
<i>Aspergillus versicolor</i> IFM41406	Onyxis et aspergillose pulmonaire	
<i>Fusarium solani</i> IFM41532	Dermatites et possibilité de diarrhées	
<i>Cryptococcus neoformans</i> TIMM0354	Infections neuroméningées chez l'immunodéprimé	Santos et Hamdan, 2005
<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 40051	Lésions des pieds : onyxis et intertrigos	
<i>Malassezia furfur</i> ATCC 14521	Pityriasis versicolor	Rukayadi et Hwang, 2007

---

**Tableau 55 : Exemple de souches de champignons susceptibles d'être sélectionnés pour les prochains tests.**

Les traitements existants pour ce genre d'infections sont généralement administrés par application locale et sont essentiellement composés de dérivés imidazolés tels que l'éconazole et le ciclopiroxolamine.

Les peptides antimicrobiens naturels sont rarement employés tels quels dans le développement de nouveaux antifongiques. La plupart du temps, leur structure est modifiée par l'insertion d'un acide aminé exotique ou en ajoutant plusieurs acides aminés hydrophobes dans le but d'augmenter l'hydrophobicité totale du peptide (Arenas *et al.*, 2009).

Les premiers tests antifongiques consisteront à tester la bicarinaline de synthèse afin de connaître son efficacité.

Présentant une séquence primaire de seulement 20 acides aminés et une structure secondaire assez simple, il sera possible de modifier le peptide en vue d'augmenter son potentiel antifongique.

## **4 Tests de cytotoxicité**

Comme pour tout antibiotique ou antifongique, nous devons nous assurer de l'innocuité de la bicarinaline sur des cellules de mammifères et sur des modèles animaux afin de la présenter comme molécule candidate dans le développement de nouveaux traitements.

---

### **4.1 Sur des cellules**

Le choix du type cellulaire pour ce type de test devra être défini en fonction du type de traitement que l'on souhaite développer. La conception de peptides à usage thérapeutique s'avère compliquée du fait que les peptides sont considérés comme étant peu absorbables par voie orale puisqu'ils sont incapables de passer du tractus digestif vers le système circulatoire. En effet, les peptides sont vite dégradés par le système digestif à la fois à cause de l'acidité de l'estomac et par la présence d'enzymes protéolytiques. C'est pourquoi leur administration se fait généralement par intraveineuse (Decaffmeyer, Thomas et Basseur, 2007). Cependant des stratégies alternatives de délivrance existent, telles que l'administration *via* les muqueuses (Prego *et al.*, 2005) nasales (Maggio, 2005) et pulmonaires (Skyler *et al.*, 2001). C'est pourquoi,

la cytotoxicité de la bicarinaline pourrait être évaluée sur des lignées cellulaires épithéliales comme les cellules bronchiques BEAS-2B (CRL-9609™) ou des cultures primaires issues de morceaux d'épithélium nasal prélevés sur une souris sacrifiée par dislocation.

L'évaluation de la tolérance cutanée à la bicarinaline s'effectuera également sur des lignées cellulaires comme les kératinocytes, les cellules de Langherans et macrophages, cellules spécifiques de la peau. Les kératinocytes sont couramment employés pour mesurer le pouvoir irritant d'une substance (Segal *et al.*, 1990 ; Ward *et al.*, 1998) car elle sont les principales cibles de celle-ci et expriment la majorité des médiateurs associés à une réaction inflammatoire. Autre modèle cellulaire intéressant : les cellules dendritiques. Ces cellules issues du sang périphérique ont la propriété d'induire des réponses immunologiques de la même façon que les cellules de Langerhans (cellule de l'épiderme activée en présence d'antigène) (Sallusto et Lanzavecchia, 1994). Seule une substance dite « sensibilisante », à une forte concentration, peut induire la production de cytokines spécifiques (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-10).

L'étude de sensibilisation peut être réalisée grâce à des techniques de biologie moléculaire. En effet, l'utilisation de puces à ADN permet de caractériser des modifications de l'expression de gènes induites après traitement des cellules dendritiques avec des produits sensibilisants et non sensibilisants.

A titre d'exemple, des chercheurs belges (Schoeters *et al.*, 2007) ont récemment exposé des cellules dendritiques (CD) dérivant de précurseurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> à quatre allergènes de contact (du sulfate de nickel, de l'oxazolone, du dinitrochlorobenzène et de l'eugénol) et à deux irritants tels que le SDS et le chlorure de benzalkonium. A l'aide de puces à ADN, ils ont pu identifier 25 gènes dont l'expression variait significativement en présence des quatre allergènes. Parmi ces gènes, 5 ont été ensuite sélectionnés et leur rôle dans le phénomène de sensibilisation a été confirmé par RT-PCR en temps réel. L'intérêt de cette étude est de fournir une multitude de gènes cibles qui serviront pour d'autres tests de sensibilisation. Par conséquent, nous pouvons envisager d'évaluer le pouvoir allergène de la bicarinaline en étudiant l'expression des gènes recensés dans la littérature par RT-PCR (Tableau 56).

<b>Fonction</b>	<b>Gènes correspondants</b>
Développement	NINJ1, MAD

---

Différenciation/Prolifération cellulaire	NINJ1, MAD
Régulation de la transcription	MAD, CREM
Réponse à un stimulus	NINJ1
Communication cellulaire	NINJ1
Transduction du signal	CREM
Expression d'un récepteur de cytokines et chimiokines des CD immatures	CCR2
Activation de la maturation des CD	CCR7

---

**Tableau 56 : Fonctions des 5 gènes étudiés dans l'étude de sensibilisation de cellules dendritiques aux allergènes.**

*D'après Schoeters et al. Molecular Immunology 44 (2007)*

---

## 4.2 Sur des tissus

---

L'emploi de modèles de peau humaine et de rat est fréquent pour évaluer la corrosivité d'une substance en routine.

Le modèle Episkin®, produit par une filiale de L'Oréal (EPISKIN SNC), peau reconstituée en 3D, présente l'avantage de reproduire au mieux les effets constatés *in vivo* puisque ce modèle présente une couche cornée.

Il est encore trop tôt pour savoir si la bicarinaline pourrait être utilisée à des fins thérapeutiques comme nouvel agent antibactérien. Les tests évoqués précédemment permettront d'évaluer le réel potentiel de ce peptide.

## Conclusion générale

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux sécrétions venimeuses de deux espèces de fourmis aux modes de vie très distincts :

Pour *Crematogaster striatula*, espèce arboricole présente au Cameroun, nous avons exploré l'activité termicide du liquide de la glande de Dufour. Pour la première fois, l'action paralysante de ce liquide a été démontrée sur le termite. Ce résultat remet en cause la théorie de Daloz et de ses collaborateurs qui suggéraient que l'activité du venin de *Crematogaster* serait le fruit d'une action combinée entre les molécules de la glande de Dufour et des enzymes de la glande à venin. L'analyse par LC/MS a permis la détection d'un nouveau composé de masse impaire de 1500 Da. Ce composé apparemment azoté et résistant à la fragmentation en spectrométrie de masse, fera l'objet de travaux complémentaires visant à déterminer sa nature exacte. Les analyses en spectrométrie de masse et RMN devraient permettre d'établir la structure de cette substance qui pourrait, bien que de masse élevée, être un alcaloïde.

Pour *Tetramorium bicarinatum*, espèce terricole et vagabonde localisée au Brésil, nous avons mis en évidence des propriétés antimicrobiennes du venin. Celles-ci ont été démontrées sur plusieurs souches bactériennes Gram +/- : *Staphylococcus aureus* et *xylosus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* et *Mycobacterium smegmatis* et *tuberculosis*. La molécule responsable de cette activité a été identifiée et caractérisée. Il s'agit d'un peptide amide constitué de 20 acides aminés : la bicarinaline.

Cette étude est totalement originale, puisque la littérature ne mentionne aucun travail sur cette espèce de *Tetramorium*. S'agissant du peptide découvert, les premiers résultats ouvrent la voie à une exploration de son mode d'action et à l'élargissement de son spectre d'activité en direction des eucaryotes (champignons, levures...). Ce peptide pourrait également servir de base dans la conception de nouveaux « antibiotiques ». Les techniques de pharmacomodulation pourraient permettre d'obtenir un (ou des) composé(s) plus actif(s) et plus spécifique(s) pour des souches d'intérêt sociétal. Les



---

différentes perspectives qu'offre ce travail de thèse invitent à poursuivre l'analyse du venin des *Tetramorium* et à s'intéresser à des espèces venimeuses moins « impressionnantes » que les serpents ou araignées.

Il serait également intéressant d'utiliser le profil protéique du venin de *Tetramorium bicarinatum* comme critère taxonomique et de le comparer à d'autres espèces proches telles que *Tetramorium aculeatum*, *africanum*, ou plus lointaines.

Du fait de la faible quantité de matière première, l'étude du venin de fourmis est particulièrement fastidieuse mais elle apparaît néanmoins comme une voie d'exploration pertinente dans la quête de nouvelles toxines d'intérêt pharmaceutique. Le nombre et la diversité des espèces de fourmis justifient pleinement l'investissement sur cette piste de recherche de nouvelles molécules bioactives.

## Références bibliographiques

- Abedrabbo S. (1994) Control of the little fire ant *Wasmannia auropunctata*, on Santa Fe Island in the Galàpagos Islands pp. 219–227. In D.F. Williams (ed.), Exotic ants: biology, impact, and control of introduced species. Westview Press, Boulder, CO, USA.
- Arbiser J.L., Kau T., Konar M., Narra K., Ramchandran R., Summers S.A., Vlahos C.J., Ye K., Perry B.N., Matter W., Fischl A., Cook J., Silver P.A., Bain J., Cohen P., Whitmire D., Furness S., Govindarajan B., Bowen J. P. (2007) Solenopsin, the alkaloidal component of the fire ant (*Solenopsis invicta*), is a naturally occurring inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase signaling and angiogenesis. *Blood* 109, 560–565
- Arenas G., Guzmán F., Cárdenas C., Mercado L., Marshall S. H. (2009) A novel antifungal peptide designed from the primary structure of a natural antimicrobial peptide purified from *Argopecten purpuratus* hemocytes. *Peptides* 30, 1405-1411
- Astruc C., Malosse C., Errard C., (2001) Lack of intraspecific aggression in the ant *Tetramorium bicarinatum*: a chemical hypothesis. *J. Chem. Ecology* 27, 1229-1248
- Astruc C. (2000) Etude de la fourmi *Tetramorium bicarinatum* : approches biologique et moléculaire. Thèse de l'Université François Rabelais
- Baek J. H., Lee S. H., (2010) Isolation and molecular cloning of venom peptides from *Orancistrocerus drewseni* (Hymenoptera: Eumenidae). *Toxicon* 55, 711-718
- Baer H., Liu D. T., Anderson M. C., Blum M., Schmid W. H. and James F. J. (1979) Protein components of fire ant venom (*Solenopsis invicta*). *Toxicon* 17, 397-405
- Barrett D. (2002) From natural products to clinically useful antifungals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1587, 224-233
- Barron A., Maleszka J., Vandermeer R., Robinson G., Maleszka R. (2007) Comparing injection, feeding and topical application methods for treatment of honeybees with octopamine. *Journal of Insect Physiology*. 53, 187-194
- Bechinger, B. and Lohner, K. (2006). Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758, 1529-1539.
- Beleboni R. (2004) Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *European Journal of Pharmacology* 493, 1-17

- 
- Bernheimer A. W., Avigad L. S. and Schmidt J. O. (1980). A hemolytic polypeptide from the venom of the red harvester ant, *Pogonomyrmex barbatus*. *Toxicon* 18, 271-278
- Blum M. S., Hermann H. R. (1978) Venoms and venom apparatuses of the Formicidae: Myrmeciinae, Ponerinae, Dorylinae, Pseudomyrmecinae, Myrmicinae, and Formicinae. In: Bettini S, editor.
- Blum M.S. (1992) Ant venoms : chemicals and pharmacological properties. *J. Toxicol. Toxin. Rev.* 11, 115-164
- Boevé J-L. (1994) Injection of venom into an insect prey by the free hunting spider *Cupiennius salei* (Araneae, Ctenidae). *J Zool* 234, 165-175
- Bolton B., (1980) The *ant* tribe Tetramoriini (Hymenoptera: Formicidae) : the genus *Tetramorium* Mayr in the Ethiopian zoogeographical region. *Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.), Entomol.*, 193-384
- Boman HG and Hultmark (1987). "Cell-free immunity in insects." *Annu Rev Microbiol* 41: 103-26.
- Boneca, I. G. and Chiosis, G. (2003). Vancomycin resistance : occurrence, mechanisms and strategies to comba it. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 7, 311-328.
- Bosmans F., Tytgat J. (2006) Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion  $\alpha$ -toxins. *Toxicon* 49:142-158
- Brand J. M., Blum M. S., Fales H. M., MacConnell J. G. (1972) Fire ant venoms: comparative analyses of alkaloidal components. *Toxicon* 10, 259-71
- Brand J. M., Blum M. S., Llyod H. A., and Fletcher D. J. C. (1974) Monoterpene hydrocarbons in the poison gland secretion of the ant *Myrmecaria natalensis* (Hymenoptera : Formicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 67, 525-526
- Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Micro* 3, 238-250.
- Brotz, H., Bierbaum, G., Reynolds, P.E., Sahl, H. (1997) The Lantibiotic Mersacidin Inhibits Peptidoglycan Biosynthesis at the Level of Transglycosylation. *Eur. J. Biochem.* 246, 193-199.
- Brown S.G.A., Wu Q.X., Kelsall G.R., Heddle R.J., Baldo B.A., (2001) Fatal anaphylaxis following jack jumper ant sting in southern Tasmania. *Med. J. Aust.* 175, 644-647
- Bulet, P. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental & Comparative Immunology* 23, 329-344
- Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 169-184

- Buren W. F. (1958) A review of the species of *Crematogaster*, *sensu stricto*, in North America (*Hymenoptera* : *Formicidae*), part I. J NY Entomol Soc 66, 119-134
- Buschinger A., Maschwitz U. (1984) Defensive behavior and defensive mechanisms in ants. In: Herman HR, editor. Defensive mechanisms in social insects. New York: Praeger 95-150
- Cammaerts M. C., Inwood M. R., Morgan E. D., Parry K. and Tyler R. C. (1978). Comparative study of the phéromones emitted by workers of the ants *Myrmica rubra* and *Myrmica scabrinodis*. J. insect. Physiol. 24, 207-214
- Catterall W.A., Cestèle S., Yarov-Yarovoy V., Yu F.H., Konoki K., Scheuer T. (2000) Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins.
- Cavill G. W. K., Robertson P. L., Whitfield F. B., (1964) Venom and venom apparatus of the bull ant *Myrmecia gulosa*. Science. 146, 79-80
- Cerda X., Dejean A. (2011) Predation by ants on arthropods and other animals. In Polidori C, editor. Predation in the Hymenoptera: an evolutionary perspective. Trivandrum: Research Signpost / Transworld Research Network. pp In press.
- Cestèle S. and Catterall W.A. (2000) Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. Biochimie 82, 583-592
- Chen H.M., Wang W., Smith D., Chan S.C. (1997). Effects of the anti- bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells. Biochim. Biophys. Acta 1336, 171-179
- Chen J., Cantrell C.L., Shang H-W., Rojas M.G. (2009) Piperidine alkaloids from the poison gland of the red imported fire ant (*Hymenoptera*: *Formicidae*). J Agric Food Chem 57, 3128-3133
- Chen L, Fadamiro HY. (2009) Re-investigation of venom chemistry of *Solenopsis* fire ants. I. Identification of novel alkaloids in *S. richteri*. Toxicon 53, 469-478
- Chia BCS, Lam YH, Dyall-Smith M, Separovic F. Bowie JH (2000) A 31P NMR study of the interaction of amphibian antimicrobial peptides with the membranes of live bacteria, Lett. Pept. Sci. 7 151-156.
- Cho Y.S., Lee Y.M., Lee C.K., Yoo B., Park H.S., Moon H.B. (2002) Prevalence of *Pachycondyla chinensis* venom allergy in an ant-infested area in Korea. J. Allergy Clin. Immunol. 110, 54-57
- Colasanti M., Persichini T., Venturini G., Menegatti E., Lauro G.M., Ascenzi P. (1998) Effect of Gabexate Mesylate (FOY), a Drug for Serine Proteinase-Mediated Diseases, on the Nitric Oxide Pathway. Biochemical and Biophysical Research Communications 246, 453-456

- Costa Manso E., Croce M., Pinto J.R.A.S., Souza Santos K., Delazari Santos L., Baptista Dias N., Palma M.S. (2010) Anaphylaxis due to *Pachycondyla goeldii* ant: a case report, J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 20 (4), 352-363
- Daloze D., Braekman J-C., Vanhecke P., Boevé J.L. , Pasteels J.M. (1987) Long chain electrophilic contact poison from the Dufour's gland of the ant *Crematogaster scutellaris* (Hymenoptera, Myrmicinae). Can J Chem 65, 432-436
- Daloze D., de Biseau J-C., Leclercq S., Braekman J-C., Quinet Y., Pasteels J.M. (1998) (13E, 15E, 18Z,20Z)-1-Hydroxypentacosyl-13,15,18,20-tetraenyl-4-yl-1-acetate, from the venom of a Brazilian *Crematogaster* ant. Tetrahedron Lett 39, 4671-4672
- Daloze D, Kaisin M, Detrain C, Pasteels JM (1991) Chemical defense in the three European species of *Crematogaster* ants. Experientia 47, 1082-1089
- Davies N.W., Michael D., Wiese M.D., Brown S.G.A., (2004) Characterisation of major peptides in 'jack jumper' ant venom by mass spectrometry. Toxicon 43, 173-183
- Davis J., Jones A., Lewis R.J. (2009) Remarkable inter- and intra- species complexity of conotoxins revealed by LC/MS. Peptides 30, 1222-1227
- Decaffmeyer M., Thomas A., et Brasseur R. (2007) Les médicaments peptidiques : mythe ou réalité ? Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 12, 81-88
- De Castro Junior C.J., Pinheiro A.C.N., Guatimosim C., Cordeiro M.N., Souza A.H., Richardson M., Romano-Silva M.A., Prado M.A.M, Gomez M.V. (2008) Tx3-4 a toxin from the venom of spider *Phoneutria nigriventer* blocks calcium channels associated with exocytosis. Neuroscience Letters 439:170-172
- Dejean A. (2011) Prey capture behavior in an arboreal African ponerine ant. *PLoS ONE* 38.
- Dejean A., Corbara B., Orivel J., Leponce M. (2007) Rainforest canopy ants: the implications of territoriality and predatory behavior. *Funct Ecosyst Commun* 1, 105-120.
- Dejean A., Durand J-L., Bolton B. (1996). Ants inhabiting *Cubitermes* termitaries in African rainforests. *Biotropica* 28, 701-713.
- Dejean A., Giberneau M. (2000). A rainforest ant mosaic: the edge effect (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 35, 385-401.
- Deng M., Luo X., Meng E., Xiao Y., Liang S. (2008) Inhibition of insect calcium channels by huwentoxin-V, a neurotoxin from Chinese tarantula *Ornithoctonus huwena* venom. *European Journal of Pharmacology* 582:12-16
- Deshane J., Garner C.C., Sontheimer H. (2003) Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *J. Biol. Chem.* 278, 4135-4144

- Deslippe R.J., Guo Y.J. (2000) Venom alkaloids of fire ants in relation to worker size and age. *Toxicon*. 38, 223-232
- Detrain C., Pasteels J.M., Braekman J.C. and Daloze D. (1987) (Z-E)- $\alpha$ -farnesene, main constituent of the hypertrophied Dufour's gland of the major workers of *Pheidole pallidula* (Formicidae). *Experientia* 43, 345
- Deyrup M., Johnson C., Wheeler G. C., Wheeler J. (1989) A preliminary list of the ants of Florida. *Fla. Entomol.* 72, 91-101
- Dib G., Guerin B., Banks W.A., Leynadier F., (1995). Systemic reactions to the *Samsun* ant: an IgE mediated hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 96, 465-472
- Duke R. C., Witter R. Z., Nash P. B., Young J. D. E., Ojcius D. M., (1994) Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptosis. *FASEB J.* 8, 237-246
- E**spamer GF and Cei JM (1970) Biogenic amines and active polypeptide in the skin of *Leptodactylus vilarsi melin*. *Biochem. Pharmacol.* 19(2) : 321-325
- Eun-Kyung Ji., Dong June Ahn Jong-Man Kim. (2003). The Fluorescent Polydiacetylene Liposome. *Bull. Korean Chem. Soc., Vol.24, No 5*
- F**avreau P., Menin L., Michalet S., Perret F., Cheneval O., Stocklin M., Bulet P, Stocklin R. (2006) Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: Case applications with single arthropod specimen. *Toxicon* 47, 676-687
- Forood B., Feliciano E.J., Nambiar K.P., (1993) Stabilization of alpha-helical structures in short peptides via end capping. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 838-842
- G**abrielson J. (2002) Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *Journal of Microbiological Methods* 50, 63-73
- Giacometti A., Cirioni O., Kamysz W., Silvestri C., Licci A., D'Amato G., Nadolski P., Riva A., Lukasiak J., Scalise G. (2005) In vitro activity and killing effect of uperin 3.6 against gram-positive cocci isolated from immunocompromised patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49,3933-3936
- Gordon Y.J., Romanowski EG. and McDermott A.M. (2005). A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr. Eye Res.*, 30 505-515.
- Grace C. R. R., Cervini L, Gulyas J, Rivier J, Riek R (2007) Astressin-amide and astressin-acid are structurally different in dimethylsulfoxide. *Biopolymers* 87:196-205
- Graham JH, Hughie HH, Jones S, Wrinn K, Krzysik AJ, Duda JJ, Freeman DC, Emlen JM, Zack JC, Kovacic DA, Chamberlin-Graham C, Balbach H (2004) Habitat disturbance and the

- diversity and abundance of ants (Formicidae) in the Southeastern Fall-Line Sandhills. *J Insect Sc* 4: 30
- Grare M, Fontanay S, Cornil C, Finance C, Duval RE (2008) Tetrazolium salts for MIC determination in microplates: Why? Which salt to select? How? *Journal of Microbiological Methods* 75,156-159
- Greenberg L, Kabashima J.N., Allison C.J., Rust M.K., Klotz J.H., Hurvois J-P., Paine T.D. (2008) Lethality of red imported fire ant venom to argentine ants and other ant species. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 101, 1162-1168
- Grolleau F. and Lapied B. (2000) Dorsal unpaired médian neurones in the insect central nervous system : towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *J. Exp. Biol.* 203, 1633-1648
- Guina T, Yi EC *et al.* (2000). "A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica serovar typhimurium* promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides." *J Bacteriol* 182(14): 4077-86.
- Gundelfinger ED, Hess N (1992) Nicotinic acetylcholine receptors of the central nervous system of *Drosophila*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1137:299-308
- Guo L, Lim KB *et al.* (1998). "Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides." *Cell* 95(2): 189-98.
- Gurevitz M, Karbat I, Cohen L, Ilan N, Kahn R, Turkov M, Stankiewicz M, Stühmer W, Dong K, Gordon D (2007) The insecticidal potential of scorpion  $\beta$ -toxins. *Toxicon* 49:473-489
- Haddad Junior V., Cardoso J.L., Moraes R.H. (2005) Description of an injury in a human caused by a false tocadira (*Dinoponera gigantea*, Perty, 1833) with a revision on folkloric, pharmacological and clinical aspects of the giant ants of the genera *Paraponera* and *Dinoponera* (sub-family Ponerinae). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 47, 235-238
- Halevy R, Rozek A, Kolusheva S, Hancock REW, Jelinek R. Membrane binding and permeation by indolicidin analogs studied by a biomimetic lipid/polydiacetylene vesicle assay. *Peptides* 24, 1753-1761
- Hefetz A. and Orion T. (1982) Pheromones of ant of Israel. I. The alarm-defense system of some larger *Formicinae*. *Isr. J. Entomol.* 16, 87-97
- Heredia A, de Biseau J-C, Quinet Y (2005) Toxicity of the venom in three neotropical *Crematogaster* ants (*Formicidae: Myrmicinae*). *Chemoecology* 15: 235-242
- Herman H. R. and Blum M. S. (1968) The hymenopterous poison apparatus. VI. *Comptonotus pennsylvanicus* (*Hymenoptera : Formicidae*). *Psyche* 75, 216-227



- Herzig, V., Wood, D. L., Newell, F., Chaumeil, P. A., Kaas, Q., Binford, G. J., Nicholson, G. M., Gorse, D. and King, G. F. (2011) ArachnoServer 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures. *Nucleic Acids Res.* 39, D653–D657
- Hilburn D. J., Marsh P. M., Schauff M. E. (1990) Hymenoptera of Bermuda. *Fla. Entomol.* 73, 161-176
- Hölldobler B, Wilson EO (1990) The ants. Cambridge: Harvard University Press, 746p. 37.
- Hultmark D, Steiner H (1980) Insect immunity. Purification and properties of three inductible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* 106(1) : 7-16.
- Ibarra-Alvarado C., García J.A., Aguilar M.B., Rojas A., Falcón A., Heimer de la Cotera E.P. (2007) Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 511–518
- Inagaki H., Akagi M., Imai H.T., Taylor R.W., Kubo T. (2004) Molecular cloning and biological characterization of novel antimicrobial peptides, pilosulin 3 and pilosulin 4, from a species of the Australian ant genus *Myrmecia*. *Arch. Biochem. Biophys.* 428, 170-178
- Iwase M., Lally E.T., Berthold P., Korchak H.M., Taichman S.N. (1990) Effects of cations and osmotic protectants on cytolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect. Immun.* 58, 1782–1788
- Johnson S.R., Copello J.A., Evans M.S., Suarez A.V., (2010) A biochemical characterization of the major peptides from the venom of the giant neotropical hunting ant *Dinoponera australis*. *Toxicon* 55, 702-710
- Jones T. H., Blum M. S., Fales H. M. (1982) Ant venom alkaloids from *Solenopsis* and *Monomorium* species Recent developments. *Tetrahedron* 38: 1949-1958
- Jones T. H., Devries P. J., Escoubas P. (1991) Chemistry of venom alkaloids in the ant *Megalomyrmex foreli* (Myrmicinae) from Costa Rica. *J Chem Ecol* 17: 2507-2518. In press
- Kacinko S. L, Shakleya D. M, Huestis M. A. (2008) Validation and Application of a Method for the Determination of Buprenorphine, Norbuprenorphine, and Their Glucuronide Conjugates in Human Meconium. *Analytical chemistry* 80 : 246
- Kenne M, Schatz B, Dejean A (2000) Hunting strategy of a generalist ant species proposed as a biological control agent against termites. *Entomol Exp Appl* 94: 31-40.
- Key L. (2002) Novel activities of saliva from the octopus *Eledone cirrhosa* (Mollusca; Cephalopoda). *Toxicon* 40, 677-683
- King, G. F., Escoubas, P. and Nicholson, G. M. (2008) Peptide toxins that selectively target



---

insect Nav and Cav channels. *Channels* 2, 100–116

- Kinoshita, E., Maejima, H., Yamaoka, K., Konno, K., Kawai, N., Shimizu, E., Yokote, S., Nakayama, H., Seyama, I. (2001) Novel wasp toxin discriminates between neuronal and cardiac sodium channels. *Mol. Pharmacol.* 59, 1457–1463
- Kolusheva S, Shahal T, Jelinek R (2000) Peptide–Membrane Interactions Studied by a New Phospholipid/Polydiacetylene Colorimetric Vesicle Assay†. *Biochemistry* 39, 15851-15859
- Kolusheva S., Lecht S., Derazon Y., Jelinek R., Lazarovici P. (2008) Pardaxin, a fish toxin peptide interaction with a biomimetic phospholipid/polydiacetylene membrane assay. *Peptides* 29, 1620-1625
- Konno K (1997)  $\alpha$ -Pompilidotoxin ( $\alpha$ -PMTX), a novel neurotoxin from the venom of a solitary wasp, facilitates transmission in the crustacean neuromuscular synapse. *Neuroscience Letters* 238:99-102
- Konno K., Hisada M., Fontana R., Lorenzi C.C.B., Naoki H., Itagaki Y., Miwa A., Kawai N., Nakata Y., Yasuhara T., Ruggiero Neto J., de Azevedo W.F., Palma M.S., Nakajima T.(2001) Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1550, 70-80
- Konno, K., Hisada, M., Naoki, H., Itagaki, Y., Fontana, R., Rangel, M., Oliveira, J.S., Cabrera, M.P., Neto, J.R., Hide, I., Nakata, Y., Yasuhara, T., Nakajima, T., (2006) Eumenitin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Eumenes rubronotatus*. *Peptides* 27, 2624-2631
- Konno K., Rangel M., Oliveira J.S., Dos Santos Cabrera M.P., Fontana R., Hirata I.Y., Hide I., Nakata Y., Mori K., Kawano M., Fuchino H., Sekita S., Neto JR., (2007) Decoralin, a novel linear cationic  $\alpha$ -helical peptide from the venom of the solitary eumenine wasp *Oreumenes decoratus*. *Peptides* 28, 2320-2327
- Kruszewska D, Sahl HG, Bierbaum G, Pag U, Hynes SO, Ljungh A. (2004). Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 648–53
- Kugler C (1978) A comparative study of the Myrmicine sting apparatus (*Hymenoptera: Formicidae*). *Studia Ent.* 20, 413-543
- Kuhn-Nentwig L (2004) Biochemistry, toxicology and ecology of the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *Toxicon* 43, 543-553
- Lamy C, Goodchild SJ, Weatherall KL, Jane DE, Liegeois JF, Seutin V, Marrion NV (2010) Allosteric Block of KCa2 Channels by Apamin. *Journal of Biological Chemistry* 285, 27067-27077

- Laurent P, Braekman J-C, Daloz D (2005) Insect chemical defense. *Top Curr Chemist* 240, 167- 229.
- Laurent P, Hamdani A, Braekman J-C, Daloz D, Isbell LA, de Biseau J-C, Pasteels JM (2003) New 1-alk(en)yl-1,3,5-trihydroxycyclohexanes from the Dufour gland of the African ant *Crematogaster nigriceps*. *Tetrahedron Lett* 44, 1383-1386
- Lebaron P., Catala P., Parthuisot N. (1998) Effectiveness of SYTOX Green Stain for Bacterial Viability Assessment. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2697
- Leclercq S. (1994) Absolute configuration of the solenopsins, venom alkaloids of the fire ants. *Tetrahedron* 50, 8465-8478
- Leclercq S., Braekman J-C., Daloz D., Pasteels JM, Vander Meer RK (1996) Biosynthesis of the solenopsins, venom alkaloids of the fire ants. *Naturwissenschaften* 83, 222-225
- Leclercq S., Braekman J-C, Kaisin M., Daloz D., Detrain C., de Biseau J-C, Pasteels J. M. (1997) Venom constituents of three species of *Crematogaster* ants from Papua New Guinea. *J Nat Prod* 60, 1143-1147
- Leclercq S., de Biseau J-C, Daloz D., Braekman J-C., Quinet Y, Pasteels JM (2000) Five new furanocembrenoids from the venom of the ant *Crematogaster brevispinosa ampla* from Brazil. *Tetrahedron Lett* 41, 633-637
- Leclercq S., de Biseau J-C, Braekman J-C, Daloz D, Quinet Y, Lumer M., Sundin A., Pasteels J.M. (2000) Furanocembranoid Diterpenes as Defensive Compounds in the Dufour Gland of the Ant *Crematogaster brevispinosa rochai*. *Tetrahedron* 56, 2037-2042
- Ledo A, Frade J, Barbosa RM, Laranjinha J. (2004) Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions. *Molecular Aspects of Medicine* 25, 75-89
- Lehrer RI, Barton A (1989). "Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity." *J Clin Invest* 84(2): 553-61.
- Leitgeb B, Szekeres A, Manczinger L, Vágvölgyi C, Kredics L (2007) The History of Alamethicin: A Review of the Most Extensively Studied Peptaibol. *C&B* 4,1027-1051
- Leponce M., Y. Roisin and J.M. Pasteels (1999) Community interactions between ants and arboreal-nesting termites in New Guinea coconut plantations. *Insect. Soc*, 46, 126–130
- Lewis J., Delalande I. (1967) Pharmacological and enzymic constituents of the venom of an Australian "bulldog" and *Myrmecia pyriformis*. *Toxicon* 4, 225-234
- Liu Z, Williamson M.S, Lansdell, S.J.,Denholm, I., Han, Z., Millar, N.S. (2005) A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 8420-8425

- Mackintosh J.A., Trimble J.E., Beattie A.J., Veal D.A., Jones M.K., Karuso P.H. (1995) Antimicrobial mode of action of secretions from the metapleural gland of *Myrmecia gulosa* (Australian bull ant). *Can. J. Microbiol.* 41, 136-144
- Maeda S. (1989) Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. *Biochem Biophys Res Commun*;165;1177-83
- Maggio E.T. (2005) Recent developments in intranasal drug delivery technology are creating new vistas for peptide and protein therapeutics. *Drug Delivery Companies Report*, 13, 29-33
- Mandard N (2001). Role of disulfide bridges in the hairpin fold of androctonin. Structure-activity relationships. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIC - Chemistry* 4, 735-738
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Harada, M., Fujii, N. and Miyajima, K. (1997). Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1327, 119-130.
- Matsuzaki K. (1998). Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1376, 391-400
- Marino A., Morabito R., Pizzata T., La Spada G. (2008) Effect of various factors on *Pelagia noctiluca* (Cnidaria, Scyphozoa) crude venom-induced haemolysis. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 151, 144-149
- Marlier J. F., Quinet Y., De Biseau J.C. (2004) Defensive behaviour and biological activities of the abdominal secretion in the ant *Crematogaster scutellaris* (Hymenoptera: Myrmicinae). *Behav Proc* 67, 427-440
- Martinez M. J. (1993). The first field record for the ant *Tetramorium bicarinatum* Nylander (Hymenoptera : Formicidae) in California. *Pan-Pac. Entomol.* 69, 272-273
- Matysiak J., Schmelzer C.E.H, Neubert R.H.H., Kokot Z.J. (2011) Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54, 273-278
- Maurizot J.C. (2009) Activité optique : dichroïsme circulaire. R6470. Techniques de l'ingénieur.
- Mitra A., Saha P., Chaoulideer M.E., Bhadra A., Gadagkar R. Chemical communication in *Ropalidia marginata*: Dufour's gland contains queen signal that is perceived across colonies and does not contain colony signal. *Journal of Insect Physiology* 57, 280-284
- Morgan E.D. (2008) Chemical sorcery for sociality: exocrine secretions of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol News* 11, 79-90

- Morgan E.D., Jungnickel H., Keegans S.J., Do Nascimento R.R., Billen J., Gobin B., Ito F. (2003) Comparative survey of abdominal gland secretions of the ant subfamily *Ponerinae*. *J Chem Ecol* 29, 95-114
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 16, 55-63
- Mozsolits H, Wirth HJ, Werkmeister J, Aguilar MI (2001) Analysis of antimicrobial peptide interactions with hybrid bilayer membrane systems using surface plasmon resonance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1512:64-76
- Nicholson G. M. (2006) Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon* 49:490-512
- Nikbakhtzadeh M.R., Tirgari S., Fakoorziba M.R., Alipour H. (2009) Two volatiles from the venom gland of the Samsun ant, *Pachycondyla sennaarensis*. *Toxicon* 54, 80-82
- Obin MS, Vander Meer RK (1985) Gaster flagging by fire ants (*Solenopsis* spp.): functional significance of venom dispersal behavior. *J Chem Ecol* 11, 1757-1768
- Otvos Jr L, O I, Rogers ME, Consolvo PJ, Condie BA, Lovas S, (2000). Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochem.* 39, 14150-9.
- Orivel J, Redeker V. Le Caer J.P, Krier F, Revol-Junelles A.M, Longeon A, Chaffotte A, Dejean A, Rossier J. (2001) Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the Venom of the Ant *Pachycondyla goeldii*. *J. Biol. Chem.* 276, 17823-17829
- Oren, Z. and Shai, Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47, 451-463.
- Pan YL *et al.*, (2007) Characterization of the Structure and Membrane Interactions of Antimicrobial Peptides aurein 2.2 and 2.3 from Australian Southern Bell frogs. *Biophysical Journal* 92, 2854-2864
- Park S, Kim J, Jeong C, Yoo S, Hahm K, Park Y. (2011) A plausible mode of action of pseudin-2, an antimicrobial peptide from *Pseudis paradoxa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808, 171-182
- Pasteels JM, (2000) Furanocembranoid diterpenes as defensive compounds in the Dufour gland of the ant *Crematogaster brevispinosa rochai*. *Tetrahedron* 56, 2037-2042
- Pasteels JM, Daloze D, Boevé JL (1989) Aldehydic contact poisons and alarm pheromone of the ant *Crematogaster scutellaris* (Hymenoptera: Myrmicinae). Enzyme-Mediated Production from acetate precursors. *J Chem Ecol* 15, 1501-1511
- Peschel A, Otto M, Jack RW, Kulbacher H, Jung G, Gotz F (1999). "Inactivation of the dlt operon

- in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides." *J Biol Chem* 274(13): 8405-10.
- Pimenta AM, Stocklin R, Favreau P, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF (2001) Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). *Rapid Commun Mass Spectrom* 15, 1562–1572
- Prestwich GD (1984) Defense Mechanisms of Termites. *Ann Rev Entomol* 29: 201-232
- Rash L. D, Hodgson W. C. (2002) Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* 40:225-254
- Regev A, Rivkin H, Inceoglu B, Gershburg E, Hammock BD, Gur-evitz M, et al. (2003) Further enhancement of baculovirus insecticidal efficacy with scorpion toxins that interact cooperatively. *FEBS Lett*;537;106–10
- Regnier F. E. and Wilson E. O. (1968) The alarm-defense system of the ant *Acanthomyops claviger*. *J. Insect. Physiol.* 14, 955-970
- Reimer N.J. (1994) Distribution and impact of alien ants in vulnerable Hawaiian ecosystems. In: Williams, D.F. (ed.) *Exotic ants: biology, impact, and control of introduced species*. Bolulder, Westview Press,. Pg. 11–22
- Ribeiro R.O.S, Chaim O.M., da Silveira R.B., Gremski L.H., Sade Y.B., Paludo K.S., Senff-Ribeiro A., de Moura J., Chávez-Olórtegui C., Gremski W. (2007) Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom☆. *Toxicon* 50:1162-1174
- Richard F-J, Fabre A, Dejean A (2001) Predatory behavior in dominant arboreal ant species: the case of *Crematogaster* sp. (Hymenoptera: Formicidae). *J Insect Behav* 14: 271-282
- Rivers DB, Uckan F, Ergin E (2005) Characterization and biochemical analyses of venom from the ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Walker) (hymenoptera: *Pteromalidae*). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 61:24-41
- Rodríguez de la Vega R.C., Possani L.D. (2005) Overview of scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels and related peptides: biodiversity, structure–function relationships and evolution. *Toxicon* 46:831-844
- Roth B.L., Poot M., Yue S.T., Millard J. (1997) Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX Green nucleic acid stain. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 , 2421–2431
- Rottini G., Gusmani L., Parovel E., Avian M., Patriarca P. (1995) Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*. *Toxicon* 33, 315–326.
- Rozner S., Kulusheva S., Cohen Z., Dowhan W., Eichler J., Jelinek R. (2003) Detection and analysis of membrane interactions by a biomimetic colorimetric lipid/polydiacetylene assay. *Analytical Biochemistry* 319 , 96-104

- Ruano F., Hefetz A., Lenoir A, Francke W., Tinaut A (2005) Dufour's gland secretion as a repellent used during usurpation by the slave-maker ant. *Journal of Insect Physiology* 51, 1158-1164
- Sahara, Y., Gotoh, M., Konno, K., Miwa, A., Tsubokawa, H., Robinson, H.P., Kawai, N., (2000) A new class of neurotoxin from wasp venom slows inactivation of sodium current. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1961 – 1970
- Sallusto F. and Lanzavecchia A. (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of Experimental Medicine* 179, 1109
- Santos D.A., Hamdan J.S. (2005) Evaluation of Broth Microdilution Antifungal Susceptibility Testing Conditions for *Trichophyton rubrum*. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 1917-1920
- Santos L., Santos K., Desouza B., Arcuri H., Cunhaneto E., Castro F., Kalil J., Palma M.S., (2007) Purification, sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp. *Polybia paulista (Hymenoptera, Vespidae)*. *Toxicon* 50, 923-937
- Schägger H., von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 1, 166, 368-79
- Schatz B, Hossaert-McKey M (2003) Interactions of the ant *Crematogaster scutellaris* with the fig/fig wasp mutualism. *Ecol Entomol* 28, 359-368. 39
- Schoeters E, Verheyen GR, Nelissen I, Van Rompay AR, Hooyberghs J, Van Den Heuvel RL, Witters H, Schoeters GER, Van Tendeloo VFI, Berneman ZN (2007) Microarray analyses in dendritic cells reveal potential biomarkers for chemical-induced skin sensitization. *Molecular Immunology* 44, 3222-3233
- Schultz D. R., Arnold P. I., Wu M.-C., Lo T. M., Volanakis J. E. and Loos M. (1979) Isolation and partial characterization of a polysaccharide in ant venom (*Pseudomyrmex* sp.) that activates the classical complement pathway. *Mol. Immunol.* 16, 253-264
- Selsted, ME, Brown DM (1985). "Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils." *J. Biol. Chem.* 260(8): 4579-84.
- Servigne P., Corbara B., Gaspar C., Dejean A., Orivel J. (2002) Rythme d'activité et comportement prédateur chez la fourmi néotropicale *Dolichoderus bidens* (L.) (*Hymenoptera: Formicidae*). *Actes Coll Insectes Soc* 15: 215-217



- Seto GWJ, Marwaha S, Kobewka D.M., Lewis RNAH, Separovic F, McElhaney RN (2007) Interactions of the Australian tree frog antimicrobial peptides aurein 1.2, citropin 1.1 and maculatin 1.1 with lipid model membranes: differential scanning calorimetric and Fourier transform infrared spectroscopic studies, *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 2787–2800.
- Shaposhnikova V.V., Egorova M.V., Kudryavtsev A.A., Levitman M.Kh., Korystov Y.N. (1997) The effect of melittin on proliferation and death of thymocytes. *FEBS Lett.* 410, 285–288
- Singh Y., Swanson E., Sokoloski E., Kutty R. K, Krishna G. (1988) MPTP and MPTP analogs induced cell death in cultured rat hepatocytes involving the formation of pyridinium metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 96, 347-359
- Skarnes RC and Watson DW (1957) Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. *Bacteriol. Rev.* 21(4) : 273-294
- Skyler J.S. et al., (2001) Efficacy of inhaled human insulin in type 1 diabetes mellitus: a randomised proof-of-concept study. *The Lancet*, 357, 331-335
- Songping L. (2009) *Methods in Molecular Biology Protocols for Peptidomic Analysis of Spider Venoms* M. Soloviev, ed. Totowa, NJ: Humana Press
- Soroceanu L., Manning Jr. T.J., Sontheimer H. (1999) Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl and K ion channel blockers. *J. Neurosci.* 19, 5942–5954
- Stöcklin R, Favreau P, Thai R, Pflugfelder J, Bulet P, Mebs D (2010) Structural identification by mass spectrometry of a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary bee *Osmia rufa* (Hymenoptera: Megachilidae). *Toxicon* 55, 20-27
- Sun X.L., Wang H.L., Sun X, Chen X.W., van der Werf W., Vlak J.M. (2002) Evaluation of control efficacy and biosafety of genetically modified *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus*. Abstracts of the 7th international symposium on the biosafety of genetically modified organisms, Beijing, China
- Szewczyk B, Hoyoscarvajal L, Paluszek M, Skrzecz I, Lobodesouza M (2006) Baculoviruses — re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances* 24,143-160
- Taylor R. W. (1978). *Nothomyrmecia macrops* : a living-fossil ant rediscovered. *Science* 201, 979-985.
- Thevissen K, Terras FRG, Broekaert WF (1999) Permeabilization of Fungal Membranes by Plant Defensins Inhibits Fungal Growth. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5451
- Torres J.A. (1984) Niches and coexistence of ant communities in Puerto Rico: repeated patterns. *Biotropica* 16, 284–295
- Tossi, A. and Sandri, L. (2002). Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. *Current pharmaceutical design* 8, 743-761.

- Tossi, A., Sandri, L. and Giangaspero, A. (2000). Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55, 4-30.
- Van Beek N., Lu A., Presnail J., Davis D., Greenamoyer C., Joraski K., (2003) Effect of signal sequence and promoter on the speed of action of a genetically modified *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* expressing the scorpion toxin LqhIT2. *Biol Control* 27, 53 – 64
- Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Cartens EB, Estes MK, Lemon SM, et al. (2005) Virus taxonomy. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. New York7 Academic; 2000
- Veiseh M., Gabikian P., Bahrami S.B., Veiseh O., Zhang M., Hackman R.C., Ravanpay A.C., Stroud M.R., Kusuma Y., Hansen S.J., Kwok D., Munoz N.M., Sze R.W., Grady W.M., Greenberg N.M., Ellenbogen R.G., Olson J.M. (2007) Tumor paint: a chlorotoxin: Cy5.5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci. *Cancer Res.* 67, 6882–6888
- Venugopal D., Klapper D., Srouji A.H., Bhonsle J.B., Borschel R., Mueller A., Russell A.L., Williams B.C., Hicks R.P. Novel antimicrobial peptides that exhibit activity against select agents and other drug resistant bacteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18:5137-5147
- Visser LG, Hiemstra PS, VandenBarselaar MT, Baillieux PA, Vanfurth R(1996). "Role of YadA in resistance to killing of *Yersinia enterocolitica* by antimicrobial polypeptides of human granulocytes." *Infect Immun* 64(5): 1653-8.
- Von Sicard N.A.E., Candy D.J., Anderson M. (1989) The biochemical composition of venom from the pavement ant (*Tetramorium caespitum* L.). *Toxicon* 27, 1127-1133
- Wang H, Cheng H, Wang F, Wei D, Wang X An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *Journal of Microbiological Methods* 82:330-333
- Wang H., Lu Y., Zhang X., Hu Y., Yu H., Liu J., Sun J. (2009a) The novel antimicrobial peptides from skin of Chinese broad-folded frog, *Hylarana latouchii* (Anura:Ranidae). *Peptides* 30, 273–282
- Wiese M., Chataway T., Davies N., Milne R., Brown S., Gai W., Heddle R. (2006) Proteomic analysis of *Myrmecia pilosula* (jack jumper) ant venom. *Toxicon* 47:208-217
- Wilson E. O. (1976) The organization of colony defense in the ant *Pheidole dentata* Mayr (Hymenoptera: Formicidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 1, 63-81
- Yan, L. and M. E. Adams. (2000) The spider toxin omega-Aga IIIA defines a high affinity site on neuronal high voltage-activated calcium channels. *J. Biol. Chem.* 275(28): 21309-16



Yeaman, M. R. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews* 55, 27-55.

Yi G. B., McClendon D., Desai D., Goddard J., Lister A., Moffitt J., Meer R. K. V., deShazo R., Lee K. S., Rockhold R.W. (2003) Fire Ant Venom Alkaloid, Isosolenopsin A, a Potent and Selective Inhibitor of Neuronal Nitric Oxide Synthase. *International Journal of Toxicology* 22, 81-86

Yoya G. K., Bedos-Belval F., Constant P., Duran H., Daffé M., Baltas M. (2009) Synthesis and evaluation of a novel series of pseudo-cinnamic derivatives as antituberculosis agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 341-343

Zasloff, M (1987). "Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(15): 5449-53.

Zelezetsky I., Pag U., Antcheva N., Sahl HG., Tossi A., (2005). Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. *Arch. Biochem. Biophys.* 434, 358-364

## Ouvrages :

Venoms of the Hymenoptera. Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects. Tom Piek (1986, Paperback).

Animaux venimeux et vénéneux. Dietrich Mebs (2006, Tec et Doc Lavoisier)

Fields Virology. David M. Knipe and Peter M. Howley (2006, 5th revised edition, Lippincott Williams and Wilkins)

Animaux venimeux terrestres. M. Goyffon et J.P. Chippaux (1990, Edition Techniques)

Serpents. Roland Bauchot (2005, Edition Artémis)

Essentials of Glycobiology. A. Varki, R.D Cummings, J.D Esko (2009, 2<sup>nd</sup> édition, Cold Spring Harbor)

## **Sites internet :**

<http://www.antweb.org>

<http://www.bacterio.cict.fr>

# Annexes

## Notion en spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse permet de mesurer le rapport masse/charge ( $m/z$ ) des ions formés à partir d'un échantillon analysé. Il est composé de trois compartiments distincts : une source d'ions, un analyseur et un détecteur (Figure 97

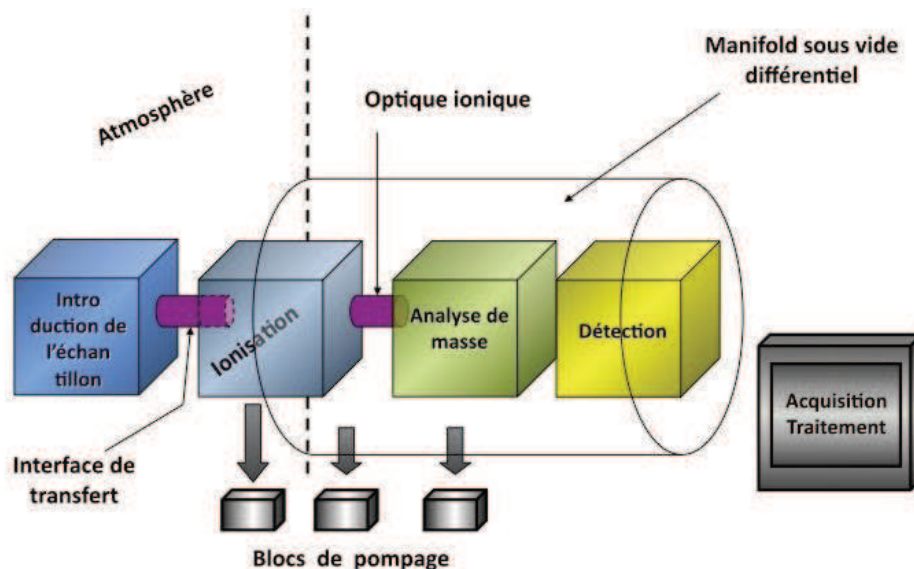


Figure 97: Schéma d'un spectromètre de masse.

En couplage chromatographie/masse, le choix du type de source d'ionisation est fonction de la nature chimique de l'échantillon à analyser. Ainsi, l'ionisation par impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC) sont uniquement appropriées à la chromatographie en phase gazeuse. Leur utilisation est donc limitée aux composés suffisamment volatils et thermiquement stables. Les sources électrospray (ESI) comme la nano-électrospray (nanoESI) et l'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) sont principalement employées pour les biomolécules non volatiles, de masse supérieures à 1 kDa et thermosensibles.

### 1.1 Modes d'ionisation

#### 1.1.1 Principales sources d'ions adaptées aux composés organiques volatils

##### ⇒ La source à Impact électronique (EI)

C'est la source la plus courante en spectrométrie de masse organique. Cette technique d'ionisation induit une fragmentation intense due à l'énergie de 70 eV des électrons qui percutent la molécule. Elle permet, grâce aux fragments obtenus, de reconnaître les

---

grands groupes chimiques (alcool, ester, amide,...) ainsi que les chaînes hydrocarbonées saturées ou insaturées.

A titre d'exemple, cette technique d'ionisation a été utilisée pour mettre en évidence les molécules responsables de la communication chimique dans les glandes de Dufour de la guêpe *Ropalidia marginata* (Mitra *et al.*, 2011). Ces molécules sont essentiellement des hydrocarbures linéaires (alcane) comme l'heptacosane et le nonacosane et parfois ramifiés.

L'intérêt de l'EI réside dans sa sensibilité, sa stabilité, sa reproductibilité et dans l'importance du phénomène de fragmentation : source d'informations structurales précieuses.

### ⇒ La source par ionisation chimique (CI)

Cette méthode d'ionisation implique des réactions ion/molécule. En effet, un gaz dit réactant (méthane, ammoniac, isobutane) est ionisé par les électrons produits par le filament. Il réagit ensuite avec la molécule à analyser pour produire, soit la masse protonée du composé, soit des adduits en fonction du gaz utilisé. Il s'agit d'une méthode plus douce que l'IE, le spectre de masse présente donc très peu de fragments et permet de reconnaître le pic de l'ion moléculaire du composé. Cette technique est complémentaire de l'IE.

Par ces méthodes d'ionisation (EI et CI), Dalozze a identifié les molécules impliquées dans le système de défense de trois espèces européennes de fourmis du genre *Crematogaster*. Il s'agit principalement de céto-acétates à chaîne linéaires poly insaturées.

### 1.1.2 Principes des sources d'ions adaptées aux biomolécules thermosensibles

#### ⇒ L'électrospray

Cette technique, réalisée à pression atmosphérique, consiste en l'ionisation de molécules d'échantillon en solution dans un solvant sous l'influence d'un champ électrique. Ces dernières subissent ensuite une désolvatation avant d'être injectées dans l'analyseur masse. Comparativement aux autres techniques d'ionisation, l'électrospray est considéré comme la technique la plus douce.

L'électrospray repose sur l'introduction de l'échantillon par un capillaire de silice guidé dans un tube métallique porté à un fort potentiel électrique de plusieurs kilovolts (entre

3 et 5 kV). Si le champ électrique généré par cette différence de potentiel est suffisant, il se formera à l'extrémité du capillaire une déformation du liquide appelée « cône de Taylor ». Une légère augmentation du champ électrique rompt le cône à son extrémité, dispersant ainsi l'échantillon en fines gouttelettes multichargées. Sous l'effet conjugué du gaz auxiliaire, de la température de l'entrée de la ligne de transfert, le solvant des gouttelettes est évaporé: c'est le phénomène de désolvatation. Une évaporation rapide du solvant conduit les gouttelettes aux limites de Rayleigh, point où les répulsions électrostatiques entre les charges positives présentes à la surface de la gouttelette sont égales à la tension superficielle du solvant avec son soluté.

Une fois cette limite atteinte, les gouttelettes deviennent instables et explosent en gouttelettes de seconde génération, beaucoup plus petites: c'est l'explosion coulombienne.

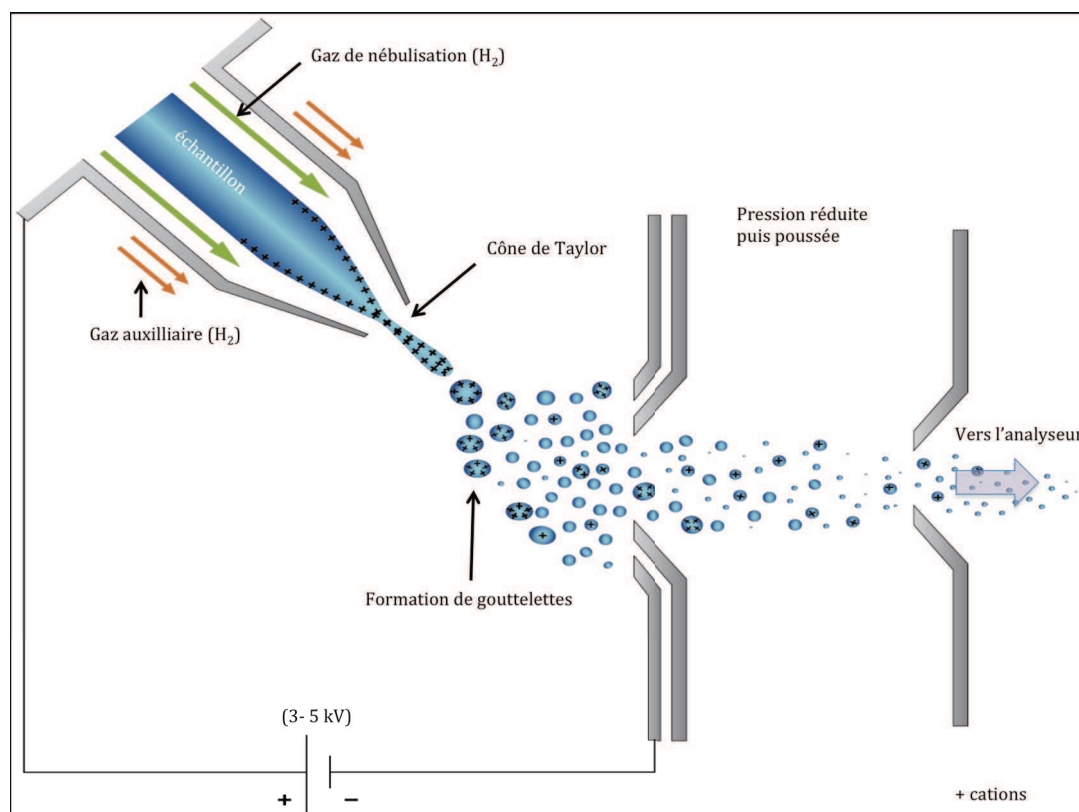


Figure 98 : schéma de la source ESI orthogonale de la trappe ionique LCQ Advantage Max.

Deux théories coexistent pour expliquer la formation d'ions en phase gazeuse à partir de ces microgouttelettes. La première, intitulée « Modèle de la charge résiduelle » est proposée par Dole et ses collaborateurs en 1968. D'après ces auteurs, le processus d'éclatement et de désolvatation se poursuit jusqu'à l'obtention de microgouttelettes ne contenant qu'un seul ion qui sera libéré en phase gazeuse suite à l'évaporation totale du

solvant. La seconde, intitulée « évaporation ionique » a été suggérée par Iribarne et Thomson en 1976. Leur hypothèse est que les ions sont éjectés de la surface de la gouttelette multichargée lorsque le diamètre de celle-ci est suffisamment réduit (<10 nm).

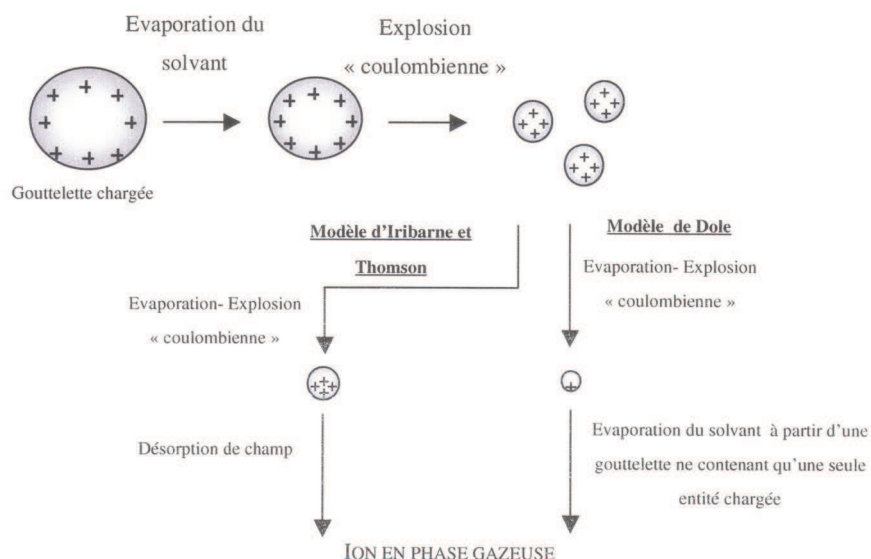


Figure 99 : Emission des ions en phase gazeuse en ESI.

Le mécanisme exact de l'électrospray n'a pas été encore résolu et certains auteurs s'accordent sur le fait que le passage des ions en solution en phase gazeuse est le résultat de plusieurs mécanismes associés (Kearle *et al.*, 2000).

### ⇒ La source MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation

L'ionisation par désorption laser assistée par matrice s'applique aux composés non-volatiles et thermosensibles tels que les peptides, les oligonucléotides et les composés inorganiques. Son principe se résume en deux étapes :

- L'échantillon à analyser est dispersé dans une matrice qui possède une forte absorption à la longueur d'onde du laser. Ce mélange est disposé sur une surface métallique appelée « cible MALDI » où le solvant sera évaporé pour laisser place à un dépôt de matrice/analyte co-cristallisé.
- L'irradiation laser se traduit par une excitation électronique et thermique des molécules de la matrice qui vont céder des protons aux molécules de l'échantillon conduisant à leur ionisation.

Le choix de la matrice, important dans la préparation de l'échantillon, est conditionné par la nature des molécules à analyser. Le Tableau 57 énumère les spécifications des principales matrices utilisées.



Matrice	Solvant de la matrice	Additif	Mode de dépôt	Analytes
$\alpha$ -CHCA	40% ACN, 0,001% TFA		Goutte séchée, sandwich	Peptides Protéines
	99% Acétone	nitrocellulose	Couche mince	Peptides
HABA	66% ACN, 0,001% TFA		Goutte séchée	Protéines
DHB	Eau, 0,001% TFA		Goutte séchée	Peptides
		acide 2-hydroxy-5- méthoxybenzoïque	Goutte séchée	Glycoprotéines
SA	50% ACN, 0,001% TFA		Goutte séchée, sandwich	Protéines
DHB	10% éthanol		Goutte séchée	oligosaccharides
THAP	éthanol	Citrate d'ammonium	Goutte séchée	Oligosaccharides acides
acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique ( $\alpha$ -CHCA) acide 2-(4-hydroxyphénylazo)benzoïque (HABA) acide dihydroxybenzoïque (DHB) acide 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapinique, SA) 2,4,6-trihydroxyacétophénone (THAP)				

Tableau 57 : Les différentes matrices utilisées en MALDI.

Les modes de dépôt les plus usuels :

- Méthode de la goutte séchée

Une solution acide de matrice est mélangée à l'échantillon à analyser et une goutte (1-2  $\mu$ L) de cette préparation est déposée sur la cible MALDI. Le mélange est soit réalisé au préalable dans un tube à centrifuger soit directement sur la cible. La cristallisation est obtenue après séchage de la goutte à température ambiante ou par ventilation ou chauffage. Ce mode de dépôt génère cependant une cristallisation hétérogène.

- Méthode en sandwich

Comme son nom l'indique, l'échantillon est disposé entre deux couches de matrice. La première étape consiste en la préparation d'une couche mince de matrice. La matrice a été solubilisée dans un solvant très volatil comme l'acétone, une goutte de cette solution est déposée sur la cible et l'évaporation du solvant va entraîner la formation d'une couche mince et homogène de cristaux. Quelques microlitres (1-2  $\mu$ L) d'une solution de 0,001% de TFA dans l'eau vont acidifier cette couche mince puis 0,5  $\mu$ L d'échantillon suivi de 0,5  $\mu$ L de matrice vont être ajoutés à l'ensemble. Le dépôt est séché à température ambiante.

### ⇒ Application

Lors de l'étude du venin du cône marin *Conus consors*, les auteurs ont comparé deux processus d'ionisation, le MALDI et l'ESI couplés à la spectrométrie de masse (Biass *et al.*, 2009). L'objectif étant de déterminer la technique la mieux adaptée pour la détection d'une large gamme de composés de différentes masses moléculaires et d'hydrophobicité variable. Les fractions du venin brut obtenues par RP-HPLC ont été analysées à la fois en MALDI-TOF-TOF et en ESI-Q-TOF. Parmi les 1628 composés recensés, 550 d'entre eux ont été détectés par MALDI-MS, 739 par ESI-MS et 339 par les deux techniques soit 20,8% des composés détectés. D'après les résultats obtenus par l'une et l'autre technique, l'ESI-MS a permis de détecter un nombre de masses plus important que celui analysé en MALDI-MS. Cependant l'utilisation du couplage MALDI-MS s'est avérée plus efficace et plus sensible dans la détection des masses comprises en 1000 et 2000 Da qui représentent la majorité des composés du venin. A la fin de cette étude, les auteurs ont conclu que les analyses effectuées en ESI-MS et MALDI-MS étaient complémentaires pour établir un profil complet du venin du cône *C. consors*.

## 1.2 Les analyseurs de l'étude

Comme les sources, il existe plusieurs types d'analyseurs (magnétiques, électrostatiques....) qui fonctionnent toujours sous une basse pression de l'ordre de  $10^{-9}$  mbar assurée par un système puissant de pompage. Le rôle de l'analyseur est de trier les ions formés par la source selon leur rapport masse sur nombre de charges,  $m/z$ . Trois analyseurs utilisés lors de cette étude sont présentés ci-après :

### 1.2.1 La trappe ionique 3D

La trappe ionique est un système à trois dimensions constitué d'une électrode annulaire et de deux électrodes « chapeaux » de sections hyperboliques (Figure 100).

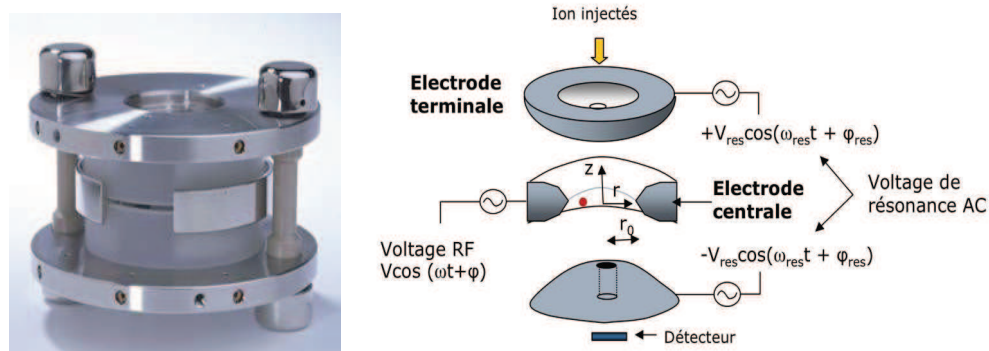


Figure 100: illustration d'une ion trap 3D.

### ⇒ Le piégeage des ions

Les ions issus de l'interface sont piégés dans l'analyseur sous l'effet d'un champ électromagnétique généré par une radiofréquence de type  $V\cos\omega t$  ( $V$  amplitude de la radiofréquence et  $\omega$  fréquence angulaire) appliquée sur l'électrode annulaire. Les ions vont acquérir un mouvement oscillatoire semblable à un huit en trois dimensions dont l'amplitude et la fréquence dépendent du rapport  $m/z$  de chaque ion et de la valeur  $V$ . Le champ quadripolaire est uniquement homogène au cœur de la trappe. Afin d'éviter que les ions ne s'approchent des électrodes et que leurs trajectoires ne deviennent instables, de l'hélium à une pression partielle de  $10^{-3}$  Torr soit  $1,3 \cdot 10^{-3}$  mbar est introduit en continu dans l'analyseur. La présence de ce gaz a pour effet de diminuer les amplitudes des trajectoires des ions et de confiner ces derniers au cœur de la trappe ionique. On parle de gaz de stabilisation.

Pour une amplitude  $V$  donnée, le cut-off est défini comme étant la valeur du plus petit  $m/z$  pouvant être piégé dans la trappe ionique. Tous les ions de  $m/z$  inférieur au cut-off adoptent une trajectoire instable et sont éjectés de la trappe.

Les mouvements des ions piégés par le champ électromagnétique exercé dans la trappe ionique sont décrits par l'équation différentielle de Mathieu selon les paramètres dimensionnels de stabilité  $a_z$  et  $q_z$  :

$$a_z = -2a_r = \frac{-16eU}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\omega^2} \text{ et } q_z = -2q_r = \frac{8eV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\omega^2}$$

$r$  = direction radiale

$z$  = direction axiale

$r_0$  = le rayon de l'électrode annulaire

$z_0$  = distance entre le centre de la trappe et une électrode « chapeau »

$e$  = charge d'un ion

$m$  = masse d'un ion

$U$  = amplitude du courant direct

$V$  = amplitude de la radiofréquence

$\omega$  = fréquence angulaire

A partir de ces paramètres, un diagramme de stabilité ( $a_z = f(q_z)$ ) a été établi afin de connaître les régions au niveau desquelles la trajectoire des ions sera stabilisée.

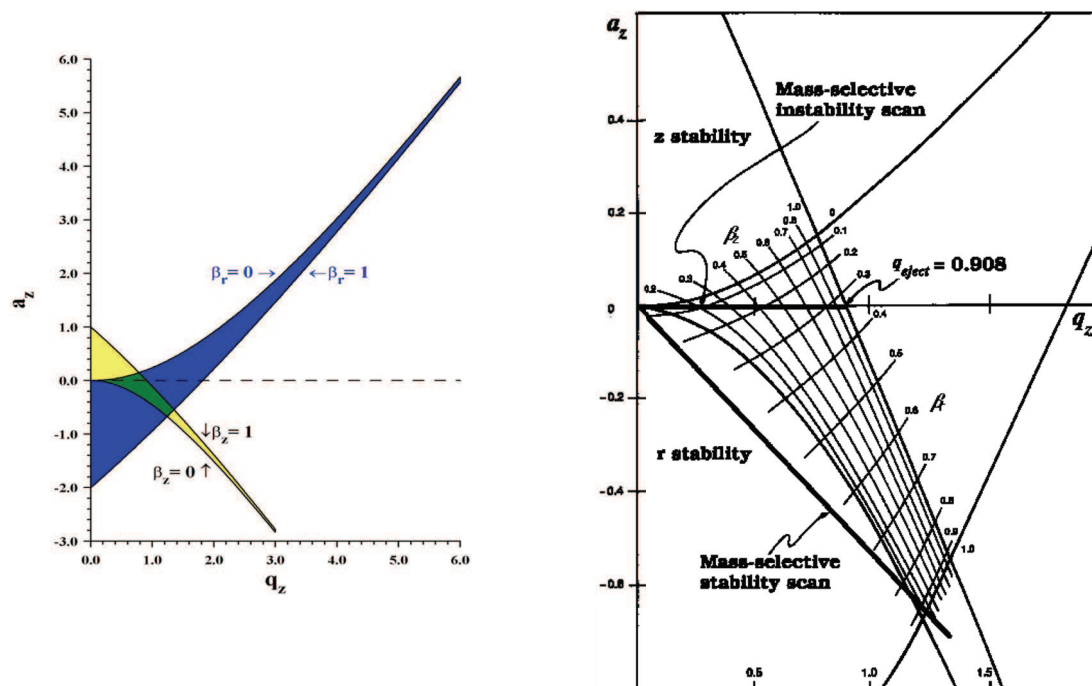


Figure 101 : Diagramme de stabilité de Mathieu ( $a_z = f(q_z)$ ) dans une trappe ionique.

La superposition des zones de stabilité axiale (jaune) et radiale (bleu) met en évidence la zone où les ions adopteront une trajectoire stable dans l'espace. Cette zone est délimitée par les courbes  $\beta_r = 0$ ,  $\beta_r = 1$  et  $\beta_z = 0$ ,  $\beta_z = 1$ . Les autres courbes iso- $\beta_r$  et iso- $\beta_z$  sont également tracées. Le paramètre  $\beta$  est une fonction de  $a$  et  $q$  et est relié à la fréquence propre des ions. Lorsque  $a_z = 0$  cas où le champ électromagnétique est généré uniquement par la composante radiofréquence du potentiel  $\Phi_0$ , la valeur maximale de  $q_z$  est de 0,908. Cette valeur correspond aux limites de stabilité des ions.

Pour des  $q_z$  inférieures à 0,908, les ions auront une trajectoire stable et seront piégés dans la trappe. Par contre pour des valeurs supérieures à cette limite, la trajectoire de ces ions sera instable ce qui entraînera leur éjection.

### ⇒ L'éjection des ions

Deux processus d'éjection des ions sont possibles en trappe ionique :

- l'éjection axiale par modulation de la radiofréquence
- l'éjection par résonance

#### L'éjection axiale par modulation de la radiofréquence

Ce mode consiste à déstabiliser le mouvement axial des ions en jouant sur l'amplitude de la radiofréquence ( $V$ ). Un balayage croissant de la radiofréquence va entraîner l'éjection des ions par ordre croissant de  $m/z$ . Cependant cette méthode est limitée par l'amplitude de la tension alternative maximale applicable (20 kV). Certains ions de  $m/z$  élevé pour lesquelles la tension alternative maximale ne sera pas suffisante, ne pourront

pas être éjectés hors de la trappe. Ce type d'éjection a pour conséquence de limiter la gamme de  $m/z$  analysable.

### L'éjection par résonance

L'éjection par résonance est réalisée en déplaçant sur le diagramme de stabilité la limite  $q_z = 0,908$  vers une valeur plus faible. Pour cela, de l'énergie cinétique est transférée aux ions suivant l'axe  $z$  à l'aide d'une tension alternative appliquée sur les électrodes « chapeaux ». Sous l'influence du potentiel croissant sur l'électrode annulaire et de la tension alternative sur les électrodes « chapeaux », les ions vont entrer en résonance et leur fréquence axiale va augmenter provoquant ainsi leur éjection.

### 1.2.2 Le système LTQ-Orbitrap Velos

Le LTQ-Orbitrap Velos est un spectromètre de masse hybride constitué d'une trappe à ions linéaire (linear quadrupole ion trap, LTQ) couplée à une trappe à ion électrostatique appelée la trappe orbitale à transformée de Fourier.

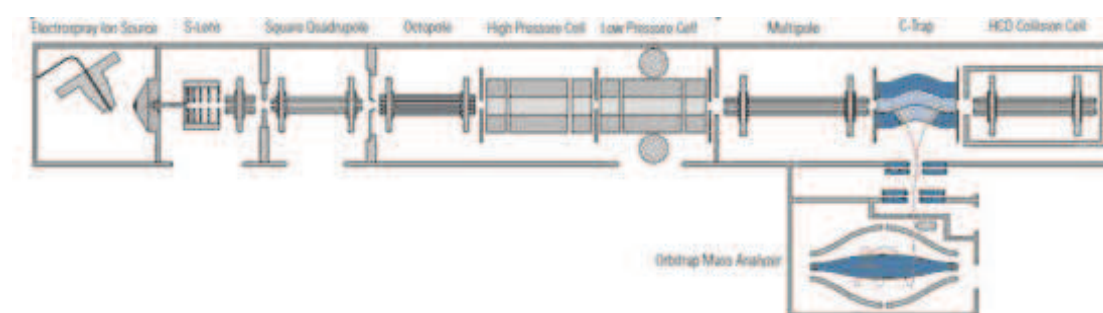


Figure 102 : Schéma du LTQ-Orbitrap Velos de Thermo Fisher.

#### ⇒ Premier analyseur : la trappe à ions linéaire

Cette trappe à ions est constituée d'un quadripôle hyperbolique qui est fermé par des électrodes d'entrée et de sortie. Ces électrodes permettent de conserver les ions à l'intérieur du quadripôle en appliquant soit des tensions continues positives pour piéger les ions positifs soit des tensions négatives pour piéger les ions négatifs. Les ions effectuent des allers-retours entre les électrodes terminales suivant l'axe  $z$  et oscillent. La capacité en ions de cette trappe est 40 fois supérieure à celle d'une trappe ionique 3D. Elle dispose également de deux fentes d'éjection radiales reliées chacune à un détecteur.

#### ⇒ La C-trappe

Après leur passage dans le LTQ, les ions sont ensuite stockés dans un quadripôle courbé à radiofréquence : la C-trappe.

---

La radiofréquence de cette trappe va diminuer et une tension continue va être appliquée sur les tiges de la C-trappe créant un champ orthogonal à l'axe incurvé de l'appareil. Les ions vont être éjectés et dirigés vers l'entrée de l'Orbitrap par le biais de lentilles incurvées.

#### ⇒ Deuxième analyseur : l'Orbitrap

L'Orbitrap est une trappe ionique à champ électrostatique composée d'une électrode creuse, à l'intérieur de laquelle est placée coaxialement une électrode en forme de fuseau. En sortie de la C-trap, les ions sont accélérés puis injectés tangentiellement vers l'électrode centrale suite à une tension croissante exercée sur celle-ci. Les ions sont piégés autour de l'électrode centrale par la force électrostatique qui compense les forces centrifuges et suivent un mouvement circulaire autour d'elle dans le plan xy ainsi qu'un mouvement oscillatoire de va et vient selon l'axe z. Les ions de même rapport  $m/z$  seront sur la même trajectoire circulaire qui oscille avec une fréquence indépendante de la vitesse ou de l'énergie des ions. Les oscillations des ions vont générer un courant induit qui par un calcul de transformée de Fourier permet d'accéder aux  $m/z$  des ions.

#### 1.2.3 L'analyseur à temps de vol (TOF : Time Of Flight)

Les ions expulsés de la source, sont accélérés vers le tube de vol maintenu sous vide. Leur temps de vol est proportionnel à leur vitesse, elle même en fonction du rapport masse/charge. Les analyseurs à temps de vol mesurent donc le temps que mettent les ions à franchir la distance qui sépare la source du détecteur.

#### ⇒ L'analyseur TOF en mode linéaire

Après irradiation laser, les ions sont expulsés de la source par paquets puis sont accélérés par une différence de potentiel appliquée entre une électrode et la grille d'extraction. Dans cette zone d'accélération, tous les ions acquièrent la même énergie cinétique mais une vitesse différente en fonction de leur masse. En entrant dans le tube de vol ces ions seront séparés en fonction de leur vitesse avant d'atteindre le détecteur placé à l'extrémité du tube de vol. Les ions de  $m/z$  élevé arriveront plus tardivement que ceux de faible  $m/z$  (Figure 103).

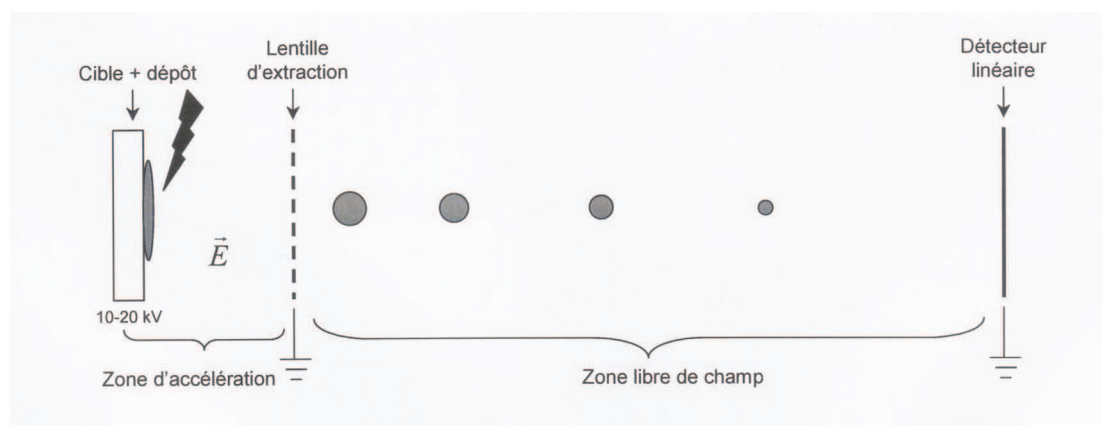


Figure 103 : Principe de fonctionnement du MALDI-TOF en mode linéaire.

Le principal inconvénient de ce type d'analyseur est leur faible résolution en masse due en partie à plusieurs facteurs (distributions temporelle, spatiale et en énergie cinétique) qui créent une dispersion du temps de vol des ions de même  $m/z$  :

- distribution temporelle : deux ions identiques, de même vitesse initiale et accélérés à partir de la même position mais engendrés dans la source à des moments différents entreront dans le tube de vol à des temps différents.
- distribution spatiale : deux ions identiques, de même vitesse initiale, engendrés au même moment mais accélérés à partir de deux positions différentes, entreront dans le tube de vol avec des vitesses et temps différents.
- distribution en énergie cinétique : deux ions identiques engendrés au même moment et accélérés à partir de la même position mais caractérisés par des vitesses initiales différentes entreront dans le tube de vol avec des vitesses et temps différents.

#### ⇒ Extraction retardée

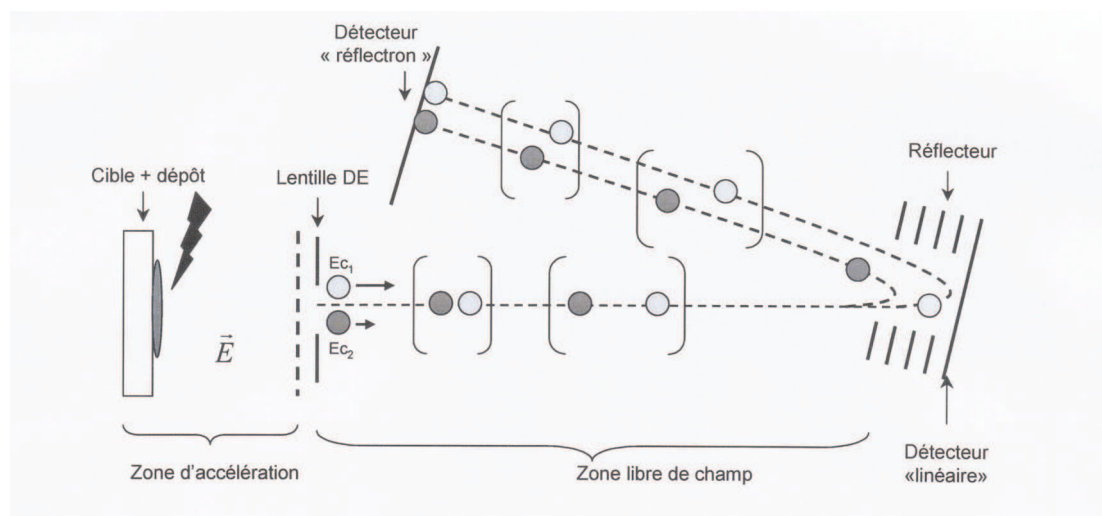
L'objectif de l'extraction retardée est de réduire la dispersion du temps de vol des ions de rapports  $m/z$  identiques. Ce mode de fonctionnement est basé sur le concept de la focalisation des ions de vitesses initiales différentes par l'application de potentiels d'accélération appropriés.

#### ⇒ L'analyseur TOF en mode réflecteur

Afin d'améliorer la résolution en masse de ce type d'analyseur, des miroirs électrostatiques, nommés réflectrons, sont placés sur le trajet ionique, compensant ainsi les différences de vitesse pour des ions de même  $m/z$  en imposant des trajets à parcourir d'autant plus longs que les ions sont plus rapides. Cela permet de focaliser



tous les ions de même  $m/z$  sur un plan, quelles que soient leurs énergies cinétiques initiales (Figure 104). Dans ce cas, la résolution devient suffisamment élevée pour faire de la haute résolution.



**Figure 104 : Principe de fonctionnement du MALDI-TOF muni d'un réflecteur électrostatique.**

*Prenons deux ions de même masse  $m/z$  et d'énergies cinétiques différentes ( $E_{c1} > E_{c2}$ ), l'ion le plus rapide ont un trajet plus long et donc un temps de vol corrigé. L'ion le plus lent atteint le réflecteur plus tard mais en sort plus tôt avec la même énergie cinétique qu'à l'entrée. Au final, nos deux ions arriveront simultanément au détecteur.*

Tous des détecteurs sont utilisés en association avec les sources d'ionisation décrites précédemment. En général, en fonction des propriétés des composés recherchés, on assiste aux associations suivantes :

- IC/IE couplé à un analyseur de type trappe à ions ou quadripôle
- ESI couplé à une trappe à ion, LTQ, TOF ou Orbitrap
- Maldi couplé à un TOF

### 1.3 Spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en tandem, désignée par l'acronyme MS/MS, est une méthode qui permet une fragmentation des ions afin d'obtenir une meilleure identification du composé à analyser.

L'expérience MS/MS la plus courante consiste à isoler un ion précurseur et à analyser les ions fragments obtenus suite à la dissociation spontanée ou activée de ce dernier.

La MS/MS comprend deux catégories de spectromètres de masse en tandem : les instruments à séparation spatiale et ceux basés sur une séparation temporelle. Les premiers sont généralement constitués d'analyseurs successifs comme le triple quadripôle ou des instruments hybrides comme le Q-Tof. Dans ce cas, les différentes



étapes de la MS/MS (isolement et fragmentation des ions) sont réalisées dans des analyseurs physiquement distincts. Les instruments de type trappe à ions permettent de réaliser une MS/MS par séparation temporelle ce qui signifie que les différentes étapes sont réalisées successivement dans le même analyseur.

### 1.3.1 La fragmentation des ions

#### ⇒ Dissociation induite par collision (CID)

Son principe consiste à faire entrer en collision les ions précurseurs accélérés à basse ou haute énergie avec des molécules de gaz inerte comme l'argon ou l'hélium. La collision entre un ion et une molécule neutre équivaut à un choc inélastique qui entraîne la transformation d'une partie de l'énergie cinétique de cet ion en énergie interne. Cette fraction d'énergie est donnée par l'équation suivante :

$$E_{\text{com}} = E_{\text{lab}} \frac{M_t}{M_i + M_t}$$

$E_{\text{com}}$  : énergie maximale pouvant être convertie en énergie interne

$E_{\text{lab}}$  : énergie cinétique de l'ion dans le référentiel du laboratoire

$M_t$  : masse du gaz cible

$M_i$  : masse de l'ion

D'après cette équation, une augmentation de l'énergie cinétique de l'ion ou de la masse du gaz de collision augmente l'énergie disponible à la conversion en rendant ainsi la collision plus efficace.

En spectrométrie de masse, il existe deux régimes de collision : les collisions à haute énergie se produisant à des énergies cinétiques allant de 100 électronvolts (eV) à plusieurs kiloélectronvolts (keV) et les collisions à basse énergie se produisant à des énergies cinétiques allant de 1 à 100 eV. Les analyseurs électromagnétiques et à temps de vol sont les seuls capables de travailler à haute énergie. Le principe de la collision à haute énergie ne sera pas évoquée ici car nous n'avons pas utilisé ce type d'appareils durant cette thèse.

#### Collision à basse énergie

Cette activation des ions précurseurs à basse énergie est réalisée à l'aide de triple quadripôle, de trappe ionique et du FT-ICR, spectromètre de masse « Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance ».

A basse énergie, l'excitation des ions est de nature vibrationnelle puisque le temps d'interaction entre un ion et une molécule de gaz est de l'ordre de la période de vibration des liaisons.

### La fragmentation dans une trappe ionique

La fragmentation des ions est provoquée par l'ajustement de la fréquence de la tension alternative sur les électrodes « chapeaux » de manière à ce qu'elle coïncide avec la fréquence propre de résonance de l'ion d'intérêt. Cet ion résonne et va percuter les molécules d'hélium présentes dans la trappe. Au fur et à mesure des collisions, l'énergie cinétique de l'ion précurseur est convertie en énergie interne qui induira la fragmentation de ce dernier. Les « ions fils » générés n'ont pas la même fréquence de résonance que celle de l'ion précurseur. Afin de les maintenir au centre de la trappe, l'amplitude de résonance du signal est maintenue à une valeur inférieure à l'amplitude d'éjection de ces ions. Après accumulation des « ions fils » au cœur de la trappe, des étapes supplémentaires de spectrométrie de masse peuvent être réalisées ( $MS^n$ ). Parmi les « ions fils », un ion précurseur est isolé puis de nouveau soumis au phénomène de fragmentation. Les étapes d'isolement, d'excitation et fragmentation peuvent être répétées  $n$  fois mais le nombre de cycles est limité par la capacité maximale de la trappe avant la fragmentation.

#### ⇒ **Fragmentation Higher-energy Collision Dissociation HCD**

Le LTQ-Orbitrap vélos possède à la suite de la C-trappe, une cellule de collision pressurisée sous forme d'octopôle. Cette cellule permet de réaliser des fragmentations à plus haute énergie.

### **1.3.2 Séquençage peptidique par MS/MS**

Parmi les multiples applications de la MS/MS, l'élucidation structurale des biomolécules occupe une place importante. Cette partie traite de la détermination des séquences peptidiques à l'aide de l'outil MS/MS.

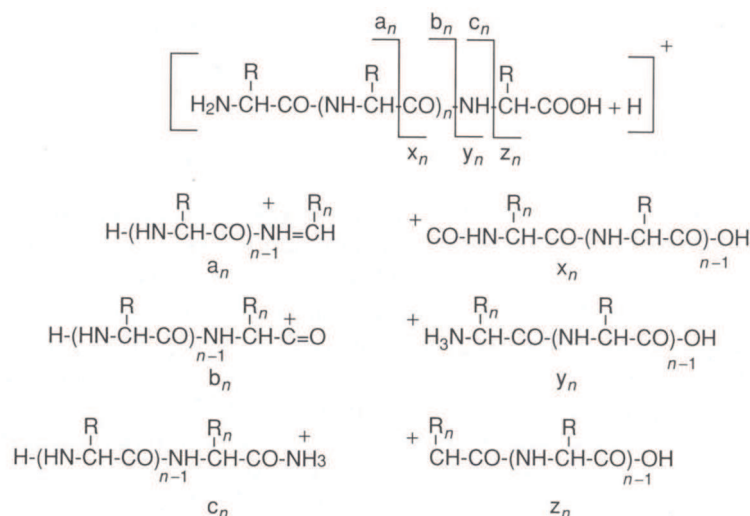
#### ⇒ **Fragmentation des peptides**

Les différentes techniques d'ionisation douce, mentionnées précédemment, sont caractérisées par la formation d'ions stables ne donnant pas de fragments. Pour induire la fragmentation de ces ions, il est nécessaire de leur apporter un supplément d'énergie. Ce transfert d'énergie est couramment réalisé par CID.

### Nomenclature des peptides

Les fragments peptidiques peuvent être classés en deux catégories : ceux issus du clivage d'une ou deux liaisons peptidiques et ceux qui subissent en plus un clivage de la chaîne latérale de l'acide aminé. Pour caractériser les différents fragments obtenus en

MS/MS CID à basse énergie de collision, nous nous basons sur la nomenclature proposée par Roepstorff et Fohlman complétée ultérieurement par Biemann (Figure 105).



**Figure 105 : Principales voies de fragmentation des peptides par MS/MS CID**

Schéma issu de l'ouvrage « *Mass Spectrometry, Principles and Applications* » 3<sup>ème</sup> édition de E. de Hoffmann et V. Stoobant p.312. R correspond à la chaîne latérale de l'acide aminé.

Le clivage d'une liaison de la chaîne peptidique peut s'établir au niveau de trois types de liaisons C $\alpha$ -C, C-N ou N-C $\alpha$  pour donner six fragments désignés respectivement a<sub>n</sub>, b<sub>n</sub>, c<sub>n</sub>, s'ils proviennent de l'extrémité N-terminale en la conservant et x<sub>n</sub>, y<sub>n</sub>, z<sub>n</sub>, s'ils proviennent de l'extrémité C-terminale. L'indice « n » correspond au nombre d'acides aminés contenus dans le fragment.

La séquence primaire d'un peptide est déterminée à l'aide du calcul de la différence de masse entre les ions consécutifs d'une même série (y ou b). Cette dernière permet d'identifier les acides aminés consécutifs (Tableau 58).

Acides aminés	Nomenclature		Masse mono isotopique (uma)
	Code 3 lettres	Code 1 lettre	
Glycine	Gly	G	57,0215
Alanine	Ala	A	71,0371
Sérine	Ser	S	87,0320
Proline	Pro	P	97,0530
Valine	Val	V	99,0684
Thréonine	Thr	T	101,0477
Cystéine	Cys	C	103,0092
Isoleucine	Ile	I	113,0841
Leucine	Leu	L	113,0841
Asparagine	Asn	N	114,0429
Aspartate	Asp	D	115,0269
Glutamine	Gln	Q	128,0586
Lysine	Lys	K	128,0950

Glutamate	Glu	E	129,0426
Méthionine	Met	M	131,0405
Histidine	His	H	137,0589
Phénylalanine	Phe	F	147,0684
Arginine	Arg	R	156,1011
Tyrosine	Tyr	Y	163,0633
Tryptophane	Try	W	186,0793

Tableau 58 : Incrémentes des masses des différents acides aminés.

Cependant cette méthode de séquençage ne permet pas de distinguer la leucine de l'isoleucine qui sont des isomères, ni la glutamine de la lysine qui sont des « isobares ».

### Les ions immoniums

Les ions immoniums sont les produits de clivages multiples de la chaîne peptidique et apparaissent dans les basses masses du spectre. Les mécanismes de formation de ces ions sont représentés dans la Figure 106:

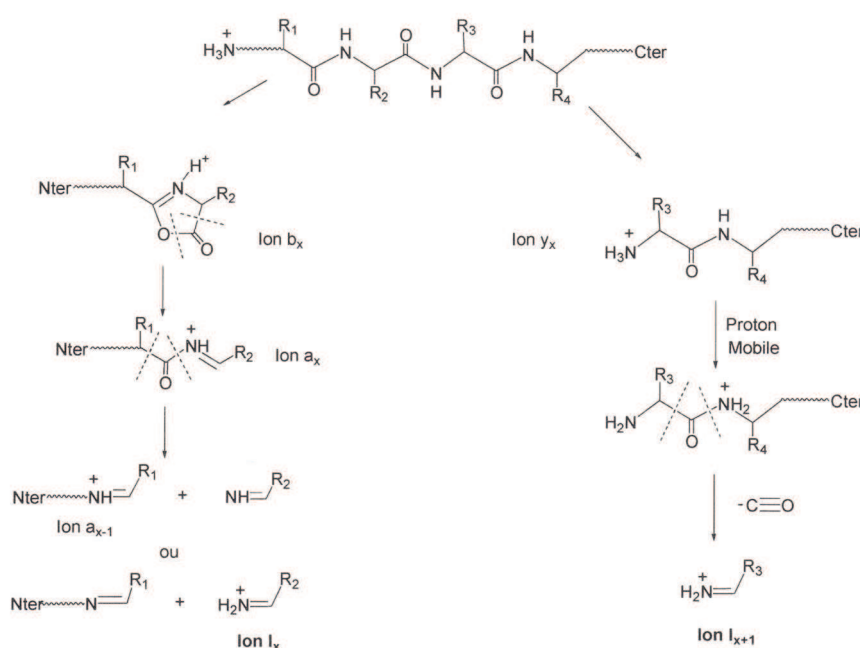


Figure 106 : Mécanismes de formation des ions immoniums.

D'après le cours de Julia Chamot-Rooke intitulé « Fragmentation de peptides : mécanismes et application au séquençage de novo. »

L'étude de ces ions fournit une information sur la nature des acides aminés présents dans la séquence peptidique quelle que soit leur position. Les ions immoniums sont représentés par une lettre correspondant au code des acides aminés dont ils dérivent (Tableau 59).

Acides aminés	Code 1 lettre	Masse caractéristique de l'ion immonium m/z
Proline	P	70
Valine	V	72
Leucine	L	86
Isoleucine	I	86
Méthionine	M	104
Histidine	H	110
Phénylalanine	F	120
Tyrosine	Y	136
Tryptophane	W	159

Tableau 59 : Masses d'ions immoniums correspondant

La masse de l'ion immonium d'un acide aminé = la masse de l'acide aminé - 27

### Fragment interne

Des fragments internes, présents en faible intensité, peuvent être observés dans les spectres. Ces fragments ont la particularité d'avoir perdu les extrémités N et C terminales et initiales (Figure 103).

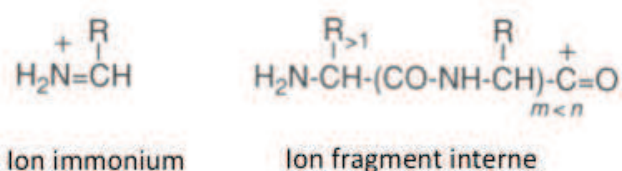


Figure 107 : Ions fragments résultant d'un double clivage de la chaîne peptidique

### ⇒ Exemple de séquençage *de novo*

### Rappel des règles de base pour l'analyse des spectres MS/MS

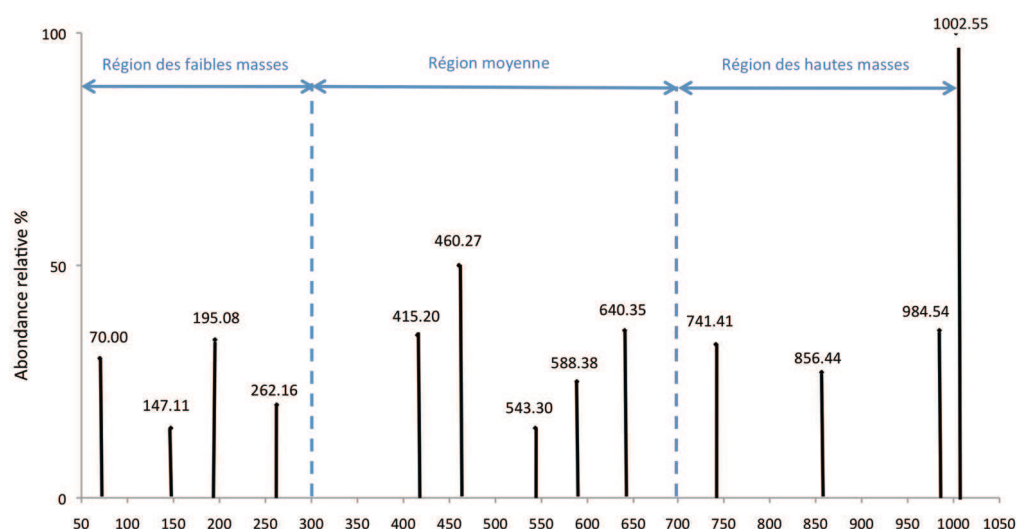


Figure 108 : Spectre théorique de l'Orprotine (HGGYKPTDK).

La fragmentation a été réalisée à l'aide de l'outil Protein prospector et le programme MS-product, l'intensité de chaque fragment est aléatoire.

-Dans la région des faibles masses  $m/z$ :

Dans cette partie du spectre, l'objectif est de repérer et identifier les ions immoniums susceptibles d'être présents. Par exemple dans la Figure 108, l'ion immonium de la proline ( $m/z = 70,00$ ) est visible dans cette région. L'identification des ions  $b_2$  ( $m/z = 195,08$ ) et  $y_1$  ( $m/z = 147,11$ ) facilite le processus de séquençage. La masse  $m/z$  de l'ion  $b_2$  permettra de calculer la masse  $m/z$  de l'ion  $y_{n-2}$  correspondant et de localiser ce dernier dans la région des hautes masses. La recherche de l'ion  $y_1$  permet d'identifier l'extrémité C-terminale du peptide. La masse  $m/z$  de cet ion servira pour la détermination de la masse  $m/z$  de l'ion  $b_{n-1}$  correspondant et de le localiser dans les hautes masses.

- Dans la région moyenne :

Le calcul des différences de masse entre chaque ion permettra de distinguer les ions d'une série de l'autre.

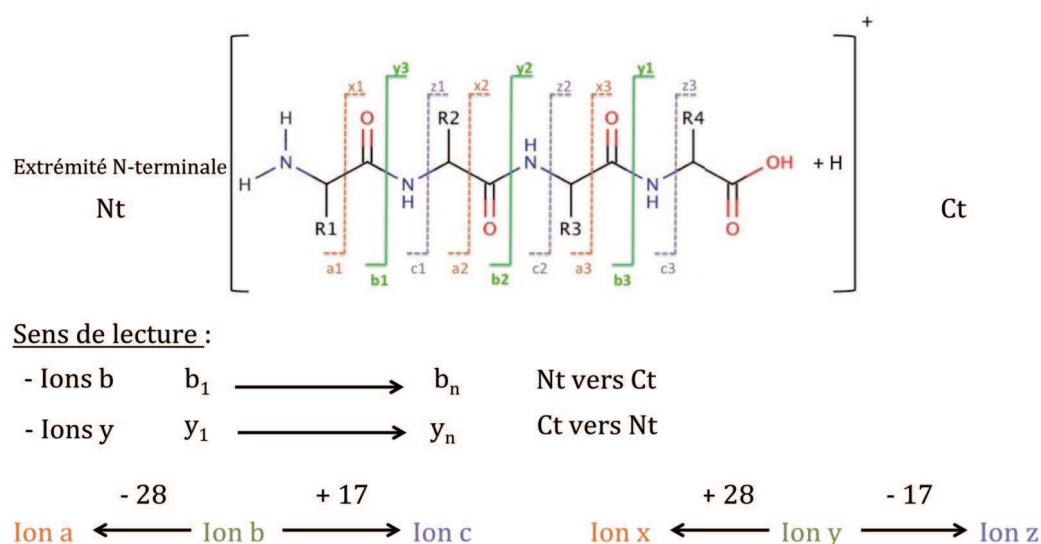
Il est nécessaire d'essayer d'identifier tous les ions du spectre. Pour cela, il faut prendre en compte les pertes d'ammoniac et de molécules d'eau.

- Dans la région des hautes masses :

Dans un spectre MS/MS, lorsque l'ion moléculaire  $[M+H^+]$  représentant le peptide est encore visible, les derniers fragments « y » et « b » peuvent être déterminés :

-  $y_{\max} = \text{peptide } [M+H^+]$

-  $b_{\max} = \text{MW peptide} - 17$



Calcul des ions y et b correspondants :

$$y_1 = (M+H^+) - b_{n-1} + 1$$

$$b_2 = (M+H^+) - y_{n-2} + 1$$

Figure 109 : Résumé des règles de base du séquençage *de novo*.

### Détermination de la séquence primaire de l'osmine, peptide isolé du venin de l'abeille *Osmia rufa*

Cet exemple est issu de l'article :

“Structural identification by mass spectrometry of a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary bee *Osmia rufa* (Hymenoptera: Megachilidae)”. (Toxicon 55:20-27; Stöcklin, 2010)

La séquence en acides aminés de l'osmine a été identifiée à l'aide du spectre MS/MS représentant la fragmentation de l'ion dichargé  $m/z$  963,1. A partir de cet ion les auteurs ont estimé la masse moléculaire du peptide à 1924,2 Da. Supposons que ce peptide présente une structure primaire plus simple, c'est à dire sans modifications post-traductionnelles, nous pouvons déterminer le nombre total d'acides aminés qui le composent :

$$1924,2 \text{ Da} / 118,8 = 16 \text{ acides aminés environ.}$$

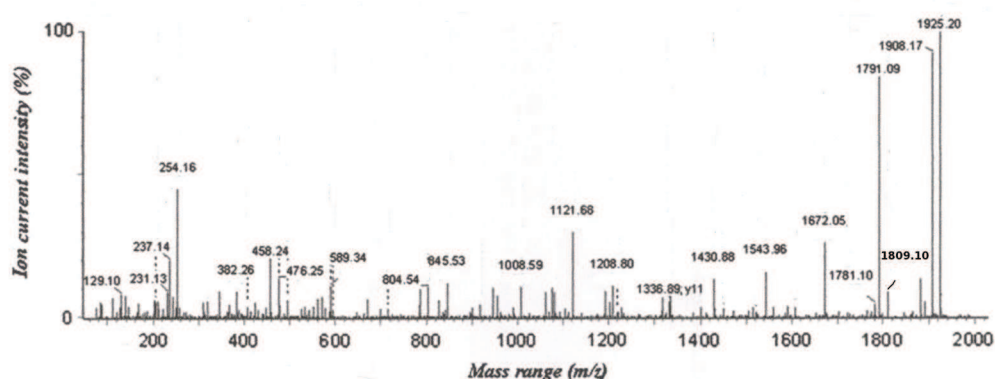


Figure 110 : Spectre MS/MS de l'ion doublement chargé  $m/z$  963.1.

On observe sur ce spectre de la Figure 110, la présence de l'ion moléculaire du peptide :  $[M+H^+] = 1925,20$ , il représente l'ion  $y_{\max}$ .

A proximité de cet ion se trouve l'ion  $m/z$  1908,17, la différence de masse entre la masse moléculaire calculée du peptide et cet ion est de 17 Da. L'ion  $m/z$  1908,17 représente donc le fragment  $b_{\max}$ .

Les ions suivants de masse  $m/z$  1809,1 et 1791,09 présentent respectivement une faible et une haute intensité.

Calcul des différences de masse  $m/z$  :

Si nous nous intéressons à l'ion de haute intensité et de masse  $m/z$  1791,09, nous obtenons :

-  $1925,20 - 1791,09 = 134,11 \rightarrow$  ne correspond à aucune masse d'acide aminé ni à une association d'acides aminés.

-  $1908,17 - 1791,09 = 117,08 \rightarrow$  même observation que précédemment.

Le calcul des différences de masse devient intéressant avec l'ion de masse  $m/z$  1809,10. En effet, la différence entre l'ion  $m/z$  1908,17 et l'ion  $m/z$  1809,10 correspond à la masse mono isotopique de la valine (99,07 u). La valine est donc le premier acide aminé de l'extrémité C-terminale.

Une fois l'ion  $m/z$  1809,10 définit comme étant le fragment  $b_{n-1}$ , il est nécessaire d'identifier les autres ions de la même série et de calculer simultanément les fragments « y » correspondants.

-  $1809,10 - 1672,05 = 137,05$  qui équivaut à la masse mono isotopique de l'histidine.

-  $1672,05 - 1543,96 = 128,09$  qui équivaut à la masse mono isotopique de la lysine.

L'ion y calculé correspondant à l'ion b  $m/z$  1672,05 =  $(1925,20 - 1672,05) + 1 = 254,15$ .



---

L'ion y calculé correspondant à l'ion b  $m/z$  1543,96 aurait une masse  $m/z$  de 382,24.

Ces ions de la série y sont observables sur le spectre au niveau des basses masses.

Au fur et à mesure des calculs et à l'aide du logiciel PepSeq, les auteurs ont pu identifier la séquence :

« G-F-L-S-A-L-K-K-Y-L-P-I-V-L-K-H-V-NH<sub>2</sub> »

### ⇒ **Caractérisation des modifications post-traductionnelles par MS/MS**

Les modifications post-traductionnelles (MPTs) se définissent comme les modifications chimiques réalisées après l'incorporation des acides aminés dans la structure primaire d'une protéine. Ces MPTs ne sont pas codées par l'ADN cellulaire et sont pour une majorité catalysées par de nombreuses enzymes. Elles peuvent modifier les propriétés physico-chimiques d'une protéine par :

- l'addition ou le clivage d'un ou plusieurs acides aminés dans la séquence primaire.
- la fixation d'un groupement au niveau de l'extrémité N ou C-terminales.
- la fixation covalente d'un groupement sur la chaîne latérale d'un acide aminé.
- un clivage protéolytique.

La présence de MPTs sur une protéine peut influencer son activité, sa localisation, sa stabilité et ses interactions avec d'autres protéines.

Le Tableau 60 résume les principales modifications post-traductionnelles et la différence de masse qui les caractérise par rapport à l'acide aminé non modifié.

Nature des modifications post-traductionnelles	Variation de masse (Da)	Nature des modifications post-traductionnelles	Variation de masse (Da)
Pyroglutamique à partir de Gln	-17,03	Ethylpyridylation	+105,12
Réduction d'un pont disulfure	-2,02	Cystéinylation	+119,14
Déamidation de Asn ou Gln	+0,98	Pentoses (Xyl, Ara)	+132,12
Méthylation	+14,03	Déoxyhexoses (Fuc)	+146,14
Hydroxylation	+16,00	Hexoses (Glc, Gal, Man)	+162,14
Oxydation de la Met	+16,00	Hexosamines (GlcN, GalN)	+161,16
Hydrolyse d'une liaison peptidique	+18,02	Acide lipoïque	+188,30
Formylation	+28,01	N-acétylhexosamines (GlcNac, GalNac)	+203,19
Acétylation	+42,04	Farnesylation	+204,36
Propylation	+42,08	Myristoylation	+210,36
Carboxylation de Asp ou Glu	+44,01	Biotinylation	+226,29
Carbamidométhylation	+57,03	Pyridoxal phosphate	+231,14
Carboxyméthylation	+58,04	Palmitoylation	+238,41
Phosphorylation	+79,98	Stéaroylation	+266,47
Sulfonation	+80,06	Acide sialique (NeuNac)	+291,26

Tableau 60 : Nature des modifications post-traductionnelles courantes et leur masse associée.

---

## Abstract

Animal venoms, by their biochemical richness and diversity of molecular targets, are a highly significant source of new molecules, with numerous potential applications. A major thrust of present pharmacological research now concerns drugs to replace certain antibiotics, proven ineffective due to the appearance of resistant strains. And discoveries of animal toxins over the past 40 years or more, have shown that venomous species could be the « pharmacists of the future », with only a few species of ants' venoms having been studied, but each time resulting in the description of original toxins. The aim of this thesis has been to study the venom of tropical ants using a multidisciplinary approach combining biochemical analysis and toxinology, centred on two main areas: (1) Research into their biological activity on insects and bacteria; (2) Fractionation of venoms using separative techniques, plus biochemical analysis of the peptides isolated using mass spectrometry. Two species of ant have been chosen based on their lifestyles: *Crematogaster striatula* is arboricolous and *Tetramorium bicarinatum*, terricolous, and the different biological activities of their crude venoms have been investigated using the MTT test. The Dufour liquid of *C. striatula*, in addition to its ability to scare away competitors, can definitively paralyse termites. For the venom of *T. bicarinatum*, two peptides have been isolated, and identified using mass spectrometry. Bicarinalin, a short 20 amino acid residues C-terminally amidated peptide, was notable for its wide spectrum antibacterial activity which, when tested on two *Staphylococcus* strains, proved to be at least if not more potent than mellitin, the antimicrobial peptide from bee venom. Bicarinalin would thus appear to be a good candidate for the development of new antibiotic drugs.

Keywords : *T. bicarinatum*, ant venom, bicarinalin, AMPs, *C. striatula*, Dufour's gland.

---

## Résumé

Les venins animaux, par leur richesse biochimique et la diversité de leurs cibles moléculaires, sont une source importante de molécules dont les applications potentielles sont nombreuses. La recherche de nouveaux médicaments pour remplacer certains antibiotiques devenus inefficaces face à l'apparition de résistances, est un axe fort de la recherche pharmacologique. Depuis plus de 40 ans, la découverte de toxines animales montre que les animaux venimeux peuvent être les « pharmaciens du futur ». Le venin de fourmis est encore peu étudié. Seul celui de quelques espèces a été exploré, avec à chaque fois la mise en évidence de toxines originales. L'objectif de cette thèse a été l'étude du venin de fourmis exotiques sur la base d'une approche pluridisciplinaire qui combine l'analyse biochimique et la toxinologie. Les travaux se sont articulés autour de deux axes principaux : (1) Recherche d'activités biologiques sur insectes et bactéries ; (2) Fractionnement des venins par des techniques séparatives et analyse biochimique des peptides isolés par spectrométrie de masse. Deux espèces de fourmis ont été choisies en fonction de leur mode de vie : *Crematogaster striatula*, une espèce arboricole et *Tetramorium bicarinatum*, une espèce terricole. Les différentes activités biologiques de leurs sécrétions venimeuses ont été conduites par test MTT. Le liquide de Dufour de *C. striatula* en plus de sa capacité à éloigner les espèces concurrentes montre une capacité à paralyser les termites de manière irréversible. Concernant le venin de *T. bicarinatum*, deux peptides ont été isolés et identifiés par spectrométrie de masse. La bicarinaline, peptide de 20 acides aminés et amidé à son extrémité C-terminale, s'est démarqué par son action antibactérienne à large spectre. Testée sur deux souches de staphylocoques, ce peptide se révèle aussi efficace voire plus puissant que la méllitine, peptide antimicrobien du venin d'abeille. La bicarinaline apparaît comme un candidat potentiel pour la conception de nouveaux traitements antibiotiques.

Mots-clef : *T. bicarinatum*, venin de fourmis, bicarinaline, PAMs, *C. striatula*, glande de Dufour.