

Mémoire de stage : Master 2 Sciences de l'Insecte

Axel TOUCHARD

Année : 2010-2011

Les peptides des venins de fourmis primitives



Photos : © Alex Wild



Stage effectué à **VenomeTech** en collaboration avec l'**UMR EcoFoG** de Guyane.

Maitre de stage : **Pierre Escoubas**

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Pierre Escoubas pour m'avoir encadré tout au long de ce stage et pour toute la confiance qu'il m'a accordée. Je le remercie également de m'avoir initié au monde des toxines et de la biochimie et pour tout ce qu'il m'a appris.

Un grand merci également à Mathieu Leblanc pour toute l'aide apportée au cours de ce stage et pour sa gentillesse.

Je remercie les stagiaires de VenomeTech Sébastien Vitale et Quentin Rousseau pour leur bonne humeur et les discussions passionnantes de biologie que nous avons pu avoir.

Un grand remerciement également à Jérôme Orivel et Alain Dejean sans qui ce projet n'aurait pu voir le jour. Grace à leur travail nous avons bénéficié d'une quantité importante d'échantillons de venin de fourmis.

Rapport bibliographique :

Les peptides dans les venins de fourmis



Photo: © Alex Wild

Sommaire

I. Introduction.....	7
II. Les peptides dans les venins de fourmis	9
1. Paraponerinae	9
2. Ponerinae	11
3. Ectatomminae	13
4. Pseudomyrmecinae	15
5. Myrmecinae.....	15
6. Myrmicinae.....	19
III. Rôles des venins chez les fourmis	21
1. Fonctions des venins	21
2. Adaptation à la vie arboricole	23
IV. Chimiotaxonomie des venins peptidiques	25
1. Les venins de fourmis	25
2. Les venins de serpents	27
3. Les venins de mygales	27
4. Les venins de scorpions	29
5. Les venins de cônes	29
V. Conclusion	31
VI. Références.....	33



Figure 1. Photo d'un aiguillon de fourmi (*Paraponera clavata*), photo www.antweb.org

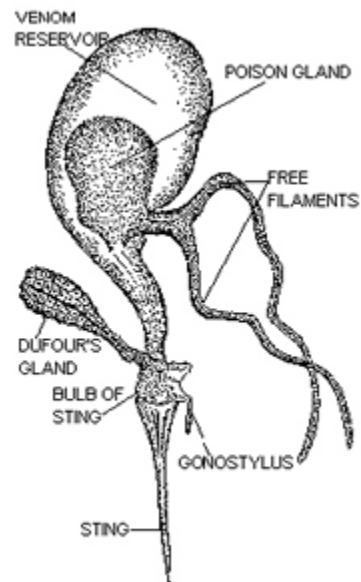


Figure 2. Schéma de l'appareil venimeux d'une fourmi

I. Introduction

Environ 175 000 espèces animales sont venimeuses. Les venins sont des mélanges de composés chimiques très complexes utilisés pour la capture des proies ou pour la défense. Ils contiennent des protéines de tailles variables, des peptides, des enzymes, mais aussi des composants non protéiques tels que des amines biogènes, des petites molécules organiques ou des sels. Les peptides et protéines assurent le plus souvent les fonctions neurotoxiques et cytotoxiques des venins et peuvent également être des allergènes. La phospholipase A2 qui a une action enzymatique peut également avoir une activité neurotoxique avec des modes d'action variés. L'activité enzymatique entraîne la lyse des parois cellulaires et agit comme facteur de diffusion tissulaire des autres composants actifs (Heurtault *et al.*, 1999). Les peptides qui sont des chaînes d'acides aminés contenant moins de 100 résidus sont retrouvés dans la plupart des venins d'animaux et ont des activités et des sélectivités diverses (Lewis *et al.*, 2003). Ainsi ces peptides peuvent être neurotoxiques, cytolytiques ou bien encore antimicrobiens.

Parmi les animaux venimeux les hyménoptères aculéates représentent le groupe le plus important avec environ 120 000 espèces. Les hyménoptères sont pourvus d'un aiguillon à l'extrémité de leur abdomen leur permettant d'injecter le venin (Fig 1). Cet aiguillon est une transformation secondaire de l'ovipositeur, ainsi seules les femelles sont capables de piquer. Parmi ces hyménoptères les fourmis représentent actuellement 14 123 espèces (AntWeb, 2011) à travers le monde et on estime qu'environ 8500 d'entre elles possèdent un aiguillon fonctionnel. Les fourmis des sous-familles formicinae et dolichoderinae ne possèdent plus d'aiguillon car il a régressé au cours de l'évolution. Cependant elles sont capables de se défendre en expulsant sous forme d'aérosol une substance principalement composée d'acide formique produite par les différentes glandes abdominales. Chez les fourmis c'est le mélange des productions de deux glandes qui constitue le venin : la glande à poison et la glande de Dufour. Le venin sécrété est stocké dans le sac à venin avant d'être injecté dans une proie ou un agresseur (Fig 2). Le venin des fourmis montre une plus grande variabilité dans sa composition que celui d'autres groupes d'hyménoptères ce qui est probablement une conséquence de la très grande diversité écologique des fourmis (Pluzhnikov *et al.*, 2000). On distingue deux types de venins chez les fourmis ; les venins alcaloïdiques et les venins protéiques. Les venins composés majoritairement d'alcaloïdes caractérisent essentiellement la sous-famille des myrmicinae, chez les genres *Solenopsis* et *Monomorium* (Blum, 1992).



Figure 3. *Paraponera clavata* (photo Alex Wild)

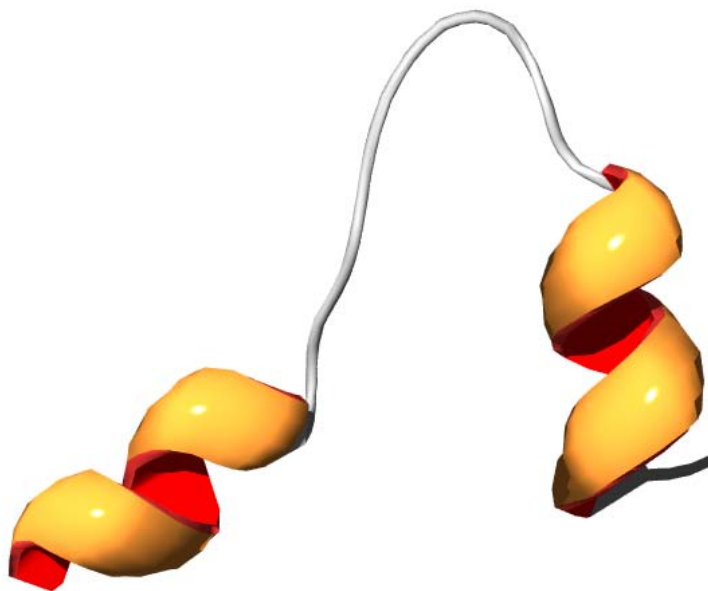


Figure 4. Structure de la poneratoxine en forme de V, avec deux hélices α .

Les venins protéiques sont les plus communs chez les fourmis et sont composés d'un cortège d'enzymes telles que les phospholipases A et B, des phosphatases, des hyaluronidases, des lipases ou encore des estérases. Ils contiennent également des peptides qui ont des activités biologiques diverses mais aussi des protéines, des acides aminés libres et divers sels (Pluzhnikov *et al.*, 2000).

II. Les peptides dans les venins de fourmis

Si les venins de composition peptidique sont majoritaires chez les fourmis, peu d'études ont été faites sur ces peptides. Nous proposons ici une synthèse des peptides découverts dans les différentes sous-familles de fourmis.

1. Paraponerinae

Le genre *Paraponera* était anciennement classé dans la sous-famille des ponerinae, mais il a été récemment révisé comme constituant une sous-famille à part entière.

Le venin neurotoxique de *Paraponera clavata* (Fig 3) permet à cette fourmi de capturer ses proies en les paralysant. La séquence d'un peptide de 25 résidus aminés apparenté aux kinines a été déterminée (Piek *et al.*, 1991) et cette nouvelle toxine a été nommée **poneratoxine** (Piek, 1991; Piek *et al.*, 1991). Les analyses sur les propriétés de cette toxine ont montré que le peptide induit un effet perturbateur de la transmission musculaire en augmentant le potentiel d'action (Piek *et al.*, 1991; Duval *et al.*, 1992; Hendrich *et al.*, 2002). La **poneratoxine** est une neurotoxine spécifique aux insectes qui module les canaux sodium et bloque la transmission synaptique (Szolajska *et al.*, 2004). La **poneratoxine** a une structure tridimensionnelle en forme de V et est composée de deux hélices α reliées par une boucle (Fig 4). Ce peptide est capable de se lier aux membranes cellulaires et de former des pores dans la bicouche lipidique ce qui provoque une fluctuation de la conductivité membranaire.

FLPLLILGSLMTTPVQIAIHDAQR

Poneratoxine, M 2755 Da

Table 1. Liste des peptides décrits dans la sous-famille des ponerinae

Peptide	Masse	Séquence
Ponericine G1	3212	GWKDWAKKAGGWLKKKGPGMAKAALKAAMQ
Ponericine G2	3306	GWKDWLKKGKEWLKAKGPGIVKAALQAATQ
Ponericine G3	3381	GWKDWLNKGKEWLKKKGPGIMKAALKAATQ
Ponericine G4	3163	DFKDWMTAGEWLKKKGPGILKAAMAAAT
Ponericine G5	3107	GLKDWVVKIAGGWLKKKGPGILKAAMAAATQ
Ponericine G6	1819	GLVDVLGKVGGLIKLLP
Ponericine G7	1876	GLVDVLGKVGGLIKLLPG
Ponericine W1	2709	WLGSALKIGAKLLPSVVGFLFKKKKQ
Ponericine W2	2709	WLGSALKIGAKLLPSVVGFLQKKKK
Ponericine W3	2863	GIWGTAKIGIKAVPRVISMLKKKKQ
Ponericine W4	2851	GIWGTALKWGVKLLPKLVGMAQIKKQ
Ponericine W5	2599	FWGALIKGAALIPSVVGFLPKKKQ
Ponericine W6	2030	FIGTALGIAAIPAIVKLFK
Ponericine L1	2595	LLKELWTKMKGAGKAVLGKIKGLL
Ponericine L2	2577	LLKELWTKIKGAGKAVLGKIKGLL
Dinoponeratoxine Da-1039	1039	GVVPHDFRI
Dinoponeratoxine Da-1585	1585	ALKAVPAVMGMIKKE
Dinoponeratoxine Da-3105	3105	GLKDWWNKHDKIIVAKEMGKAGLQAA
Dinoponeratoxine Da-3177	3177	GLKDWWNKHDKIIDVVKEMGKAGLQAA
Dinoponeratoxine Da-2501	2501	FWGTLAKLALKAVPAVMGMIKKE
Dinoponeratoxine Da-1837	1837	FLGGLIGPLMSLIPGLLK



Figure 5. *Dinoponera australis* (photo Alex Wild)

2. Ponerinae

Il s'agit d'une sous-famille de fourmis très primitive dans laquelle quelques études ont mis en évidence des peptides dans les venins. De récentes études ont porté sur le venin du genre *Pachycondyla* (Lopez *et al.*, 1997; Orivel *et al.*, 2001; Orivel *et al.*, 2001). L'étude de 12 espèces a montré que les venins étudiés avaient un effet physiologique similaire, ce qui laisse supposer que ces espèces possèdent des composés toxiques de même nature. Un dipeptide cyclique composé de phénylalanine et de leucine a été caractérisé chez *Pachycondyla apicalis* (Lopez *et al.*, 1997).

L'analyse de la composition du venin de *Pachycondyla goeldii* a permis de décrire 15 nouveaux peptides, les **ponericines**. Ces peptides linéaires adoptent des structures hélicoïdales dans un environnement polaire et ont une activité antimicrobienne, insecticide et hémolytique. Ils peuvent être classés en trois familles (G, W et L) selon leur structure primaire (Table 1). Les peptides G partagent des similitudes avec la cecropine, une famille de peptides antimicrobiens retrouvés dans l'hémolymph de papillons et divers insectes. Les peptides W ont des similitudes avec la gaegurine, un peptide isolé de la peau de la grenouille *Rana rugosa* et la melittine qui est le composant toxique principal du venin d'abeille. Les peptides L partagent des séquences similaires à celle de la dermaseptine qui est un peptide présent dans la peau de grenouille. (Orivel *et al.*, 2001).

Le venin de *Dinoponera australis* (Fig 5) contient 6 peptides majeurs, les **dinoponeratoxines** (Table 1). Deux de ces peptides partagent 50 % de similitude avec la ponericine G de *Pachycondyla goeldii*. Alors que les deux peptides les plus petits ont des similarités avec les kinines qui sont des peptides neurotoxiques retrouvés chez diverses espèces d'hyménoptères, un autre de ces peptides montre des homologies avec la **poneratoxine** de *Paraponera clavata* qui est un modulateur des canaux sodium (Johnson *et al.*, 2009).

Il est à noter qu'aucun peptide séquencé dans cette sous-famille ne contient de cystéine. Cela signifie que ces peptides ont des structures tertiaires non structurées par des ponts disulfures, et sont probablement hélicoïdaux.

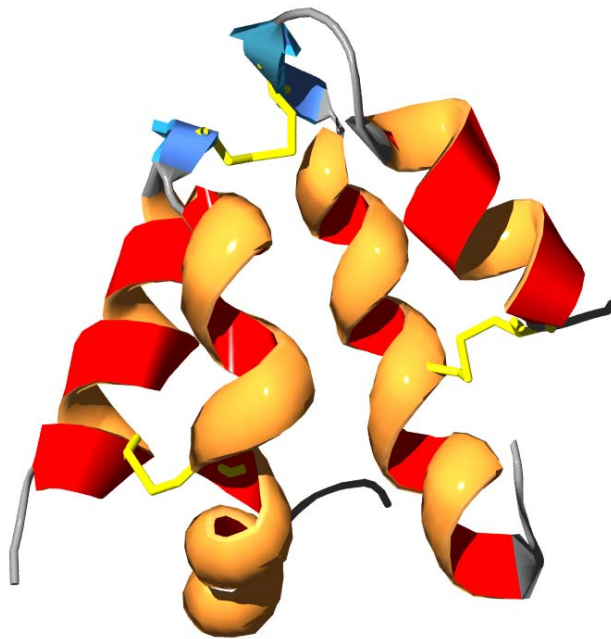


Figure 6. Structure de l'ectatamine Et-1.

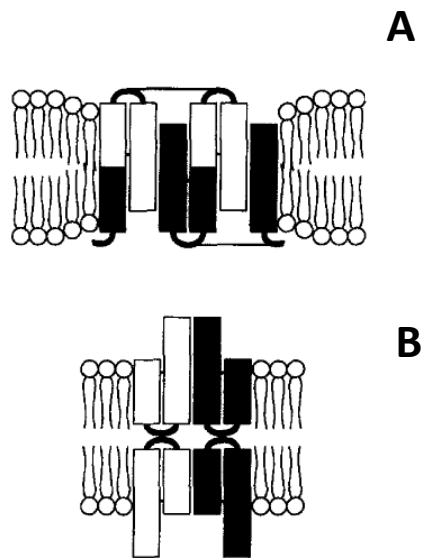


Figure 7. Deux conformations possibles de dimérisation de l'ectatamine, A et B et formation du pore membranaire.

3. Ectatomminae

Les études réalisées sur *Ectatomma tuberculatum* et *Ectatomma brunneum* (anciennement *E. quadridens*) ont permis de découvrir une nouvelle classe de toxines polypeptidiques, les **ectatomines**.

Le venin d'*Ectatomma tuberculatum* est l'un des venins les plus toxiques (DL50 1.7mg/Kg chez la souris et DL50 7mg/Kg chez la blatte) (Pluzhnikov *et al.*, 2000). Deux ectatomines ont été isolées à partir de ce venin, Et-1 et Et-2. Ce sont deux polypeptides bicaténaires possédant deux chaînes fortement homologues. Chaque chaîne possède un pont disulfure intracaténaire et les deux chaînes sont reliées par un pont disulfure intercaténaire. Et-1 est principalement responsable de l'effet toxique du venin chez les mammifères et chez les insectes. Ce peptide forme un paquet de quatre hélices alpha relié en son centre par le pont disulfure (Fig 6). Le grand nombre de lysines qui le constituent résulte en une surface chargée positivement. En conséquence, Et-1 est capable d'interagir avec des molécules négativement chargées telles que les lipides. Deux molécules d'Et-1 sont capables de se lier ensemble et de former une structure ayant la capacité de pénétrer dans les bicouches lipidiques des cellules. Cela entraîne la formation de pores membranaires qui perturbent la conduction calcique des cellules, avec deux conformations spatiales possibles (Fig 7) (Arseniev *et al.*, 1994; Pluzhinikov *et al.*, 1994; Nolde *et al.*, 1995).



Deux autres ectatomines Eq-1 et Eq-2 ont été découvertes chez *Ectatomma brunneum* (Pluzhnikov *et al.*, 2000). Ces peptides possèdent également un pont disulfure qui relie les chaînes entre elles mais à l'inverse de Et-1 et Et-2 ces deux peptides ne possèdent pas de ponts disulfure intracaténaires.

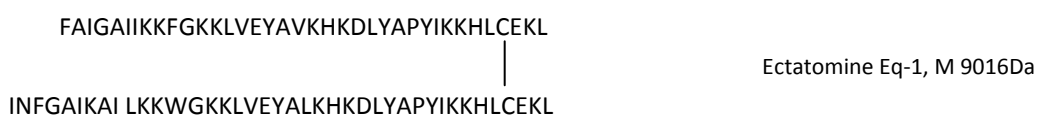




Figure 8. *Pseudomyrmex spinicola* (photo Alex Wild)



Figure 9. *Myrmecia pilosula* (photo Alex wild)

INFGAIKAILKKWGKKLVEYALKHKDLYAPYIKKHLCEKL
 |
 INFGAIKAILKKWGKKLVEYALKHKDLYAPYIKKHLCEKL

Ectatomine Eq-2, M 9429Da

4. Pseudomyrmeciinae

Le venin de *Pseudomyrmex triplarinus* (Fig 8) possède des propriétés anti-inflammatoires et est reconnu pour soulager les douleurs et les rhumatismes. Il empêche également les plaquettes humaines de s'agréger (Hink *et al.*, 1989; Hink *et al.*, 1994). Six polypeptides bicaténaires ont été identifiés et séquencés par couplage chromatographie liquide - spectrométrie de masse, ce sont les **myrmexines**. Ces molécules sont des hétérodimères composés d'une petite chaîne reliée par deux ponts disulfures intercaténaires à une chaîne plus longue (Pan *et al.*, 2000).

LFGGLLDKLKEIKKYCNKGNLDKACSKL
 |
 LILGAQKKLLQIIKQGLKAICDARDLIAKGCQA
 Myrmexine I, M 7069 Da

LFGNIIDKLREIKKYCNKGNLDKACSKL
 |
 LILGAQKKLLQIIKQGLKAICDARDLIAKGCQA
 Myrmexine IV, M 7143 Da

LFGGLLDKLKEIKKYCNKGNLDKACSKL
 |
 LSLGTIKKLLQILAQGLKAICNHRDLIAKGCQA
 Myrmexine II, M 6998 Da

LFGGLLDKLREIKKYCNKGNLDKACSKL
 |
 LSLGTIKKLLQILAQGLKAICNHRDLIAKGCQA
 Myrmexine V, M 7017 Da

LFGGLLDKLREIKKYCNKGNLDKACSKL
 |
 LILGAQKKLLQIIKQGLKAICDARDLIAKGCQA
 Myrmexine III, M 7090 Da

LFGNIIDKLREIKKYCNKGNLDKACSKL
 |
 LSLGTIKKLLQILAQGLKAICNHRDLIAKGCQA
 Myrmexine VI, M 7069 Da

Les venins des pseudomyrmeciinae peuvent également contenir des alcaloïdes. Dans le genre *Tetraponera* un nouveau groupe d'alcaloïdes a été identifié ; les tetraponerines (Merlin *et al.*, 1988).

5. Myrmeciinae

Il s'agit de l'une des sous-familles de fourmis les plus primitives. Les fourmis australiennes du genre *Myrmecia* sont reconnues pour être très agressives et être capable de sauter sur leurs proies (Matuszek *et al.*, 1992). Le venin du genre *Myrmecia* a été le premier venin protéique étudié et plusieurs espèces ont été analysées. Le venin de *Myrmecia gulosa* a révélé la présence de polypeptides (Cavill *et al.*, 1964) et des activités enzymatiques ont ensuite été rapportées, notamment des activités phospholipases, phosphatases et hyaluronidases (Lewis *et al.*, 1967; Lewis *et al.*, 1968; Matuszek *et al.*, 1994).

GLGSVFGRLARILGRVIPKVAKKLGPKVAKVLPKVMKEAIPMAVEMAKSQEEQPPQ Pilosuline 1, M 6052 Da

IDWKKVDWKKVSKKTCKVML KACKF L Pilosuline 3a , M 3153 Da

LIGLV SKGT C VLVKT VCKKL LKQ Pilosuline 3b, M 2457 Da

IDWKKVDWKKVSKKTCKVML KACKF L
Pilosuline 3, M 5608 Da

LIGLV SKGT C VLVKT VCKKL LKQ

FDITK LNIKK LTKAT CKVIS KGASM CKVLF DKKKQE
Pilosuline 4, M 8198 Da

FDITK LNIKK LTKAT CKVIS KGASM CKVLF DKKKQE

DVKGMKKAIKEILD CVIEKGYDKLAAKLKKVIQQLWE Pilosuline 5a , M 42745 Da

DVKGMKKAIKEILD CVIEKGYDKLAAKLKKVIQQLWE
Pilosuline 5, M 8546 Da

DVKGMKKAIKEILD CVIEKGYDKLAAKLKKVIQQLWE

Figure 10. Séquences des principales pilosulines et leur masse.

Le venin de *Myrmecia pyriformis* montre une action hémolytique et un effet stimulateur des muscles lisses. Ces effets sont similaires à ceux de la melittine, un peptide de venin d'abeille (Lewis *et al.*, 1968; Wanstall *et al.*, 1974; Matuszek *et al.*, 1992).

Une autre étude révèle que le venin a des propriétés allergéniques et contient de l'histamine (Matuszek *et al.*, 1992). Le venin de *Myrmecia pilosula* (Fig 9) est principalement composé de peptides bicaténaires reliés par des ponts disulfures, et plusieurs peptides ont été séquencés (Fig 10). Deux de ces peptides ont été nommés Myr p1 et Myr p2 (Donovan *et al.*, 1995; Donovan *et al.*, 1996; Street *et al.*, 1996) puis renommés **pilosulines 1 et 2** (Wu *et al.*, 1998). La **pilosuline 1** est un peptide monomérique qui possède une forte action cytotoxique et forme des canaux ioniques dans les bicouches lipidiques des membranes (Wu *et al.*, 1998; Kourie *et al.*, 2000). On lui prête également une action allergénique (Davies *et al.*, 2004). Les **pilosulines 1 et 2** sont de nature basique et sont composées à 25 et 33% de lysine et d'arginine. La **pilosuline 2** n'est pas présente librement dans le venin de *Myrmecia pilosula* mais est une chaîne du peptide bicaténaire découvert par la suite, la **pilosuline 3** (Wiese *et al.*, 2006; Wiese *et al.*, 2007). Deux autres peptides ont été trouvés et caractérisés dans le venin de *Myrmecia pilosula*, la **pilosuline 3** et la **pilosuline 4**. Ces deux peptides ont des propriétés antimicrobiennes et pourraient avoir un rôle dans la stérilisation des proies capturées (Inagaki *et al.*, 2004). La pilosuline 3 est un peptide bicaténaire hétérodimérique alors que la pilosuline 4 est un peptide bicaténaire homodimérique. Les deux chaînes de la **pilosuline 3** peuvent être retrouvées séparément dans le venin et les deux chaînes sont nommées **pilosuline 3a et 3b**. La **pilosuline 5** est un peptide qui a un effet allergénique et provoque la libération d'histamine. Il s'agit d'un peptide bicaténaire homodimérique mais qui peut être également trouvé sous forme monomérique (Inagaki *et al.*, 2008). Dernièrement une étude sur les propriétés antimicrobiennes à large spectre a été effectuée sur une partie de la séquence de la **pilosuline 1** pour tenter de développer un nouvel antibiotique en séparant la séquence hémolytique de la séquence antimicrobienne du peptide (Zelezetsky *et al.*, 2005).



Figure 11. *Solenopsis invicta*, en position de défense (photo Alex Wild)



Figure 12. *Crematogaster cerasi*, en position de défense avec l'abdomen relevé au dessus de la tête (photo Alex Wild)



Figure 13. *Pogonomyrmex barbatus* (Photo Alex wild)

Table 2. Principaux peptides dans les sous familles de Formicidae

Sous-famille	Peptides	Structure	Type de toxine
Paraponerinae	poneratoxine	Linéaire, deux hélices α , en forme de V	neurotoxine
Ponerinae	ponericines	Linéaire, α -hélicoïdale	cytotoxine, insecticide, antibactérienne
	dinoponeratoxines	Linéaire, probablement α -hélicoïdale	-
Ectatomminae	ectatomines	Hétérodimérique	Neurotoxine
Pseudomyrmecinae	myrmexines	Hétérodimérique	-
Myrmecinae	pilosulines	pilosuline (3a,3b et 5a)	cytotoxine et antibactérienne
		Hétérodimérique (pilosuline 3)	antibactérienne
		Homodimérique (pilosuline 4 et 5)	antibactérienne
Myrmicinae	barbatolysine	-	cytotoxine, faiblement insecticide

6. Myrmicinae

Il s'agit de l'une des sous-familles de fourmis les plus évoluées avec les formicinae. Le venin de certains membres de cette sous-famille est de nature majoritairement alcaloïdique. C'est le cas dans le genre *Solenopsis* (Fig 11) qui a un venin composé à 95 % d'alcaloïdes tels que la piperidine, la solenopsine, ou l'indolizidine (Blum *et al.*, 1958; Baer *et al.*, 1979). Cependant ce venin contient également entre 0.1 et 1% de molécules de nature protéique. Les protéines Sol i I-IV se sont révélées être des enzymes (Hoffman, 1993; Hoffman, 1993; Schmidt *et al.*, 1993; Hoffman *et al.*, 2005). Cependant toutes les espèces de cette sous-famille n'ont pas un venin alcaloïdique. Le genre *Crematogaster* se démarque des autres genres par son aiguillon transformé en spatule (Fig 12). Celui-ci permet de déposer sur la cuticule des agresseurs un venin de contact issu des sécrétions des glandes de Dufour, qui contient diverses petites molécules telles que des diterpènes, ou des longues chaînes dérivées dotées de différentes fonctions biologiques (Daloze *et al.*, 1998; Leclercq *et al.*, 2000; Marlier *et al.*, 2004). Le venin de *Tetramorium caespitum* est lui essentiellement de nature protéique et contient une variété d'acides aminés libres (von Sicard *et al.*, 1989).

Un peptide a été identifié dans l'un des genres de myrmicinae. Le venin du genre *Pogonomyrmex* est considéré comme l'un des plus toxiques parmi tous les insectes avec une DL50 mesurée à 4.2mg/kg chez la souris pour *Pogonomyrmex badius* (Schmidt *et al.*, 1978) et qui atteint même 0.12mg/kg pour *P. maricopa* (Meyer, 1996). Ce venin hautement neurotoxique possède également une forte activité hémolytique. Ce venin riche en enzymes est composé de phospholipases A et B, de hyaluronidases, de phosphatase acide, d'estérases et de lipases, ce qui en fait l'un des venins possédant la plus grande diversité enzymatique (Schmidt *et al.*, 1978; Schmidt *et al.*, 1978). L'analyse des composants chimiques de *Pogonomyrmex barbatus* (Fig 13) a montré que l'activité hémolytique du venin était due à un polypeptide basique de 34 acides aminés de poids moléculaire d'environ 3500 Da, la **barbatolysine** (Bernheimer *et al.*, 1980). Si le nombre d'acide aminés de la **barbatolysine** est connu, sa séquence n'a pas été publiée.

Chez la fourmi *Strumigenys kumadori* (Fig 14) une étude récente a décrit des peptides appelés SKTXS, très homologues à des peptides d'araignée possédant une structure ICK (inhibitor cystin knot) (Fig 15). Ces SKTXs bloquent les canaux sodium de la drosophile (Inagaki *et al.*, 2008).

Les études antérieures sur les peptides de venin de fourmis montrent deux types de peptides (Table 2). On retrouve dans les sous-familles des paraponerinae, des ponerinae et des myrmeciinae des peptides linéaire hélicoïdaux, non structurés par des ponts disulfures. Ces petits peptides linéaires ont des masses comprises entre 1500 Da et 4000 Da à l'exception de la



Figure 14. *Strumigenys* sp (Photo Alex wild).

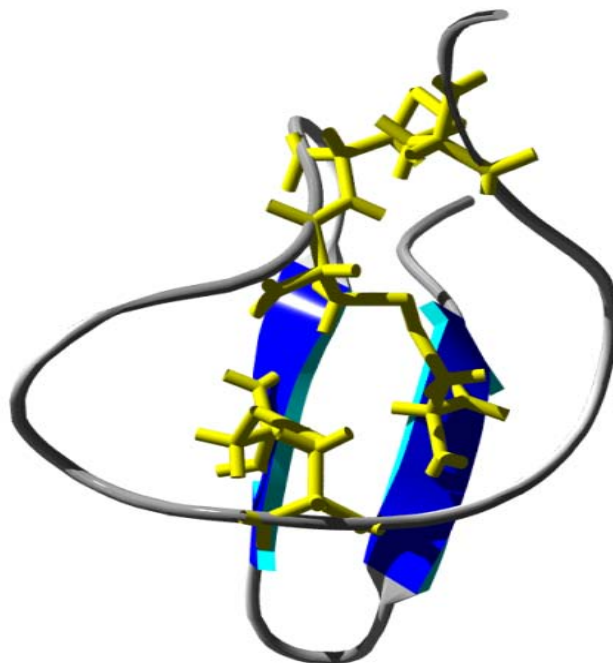


Figure 15. Structure de l'huwentoxine, peptide de mygale possédant une structure de type ICK homologue aux peptides SKTXs trouvés dans le venin de *Strumigenys kumadori*.

pilosuline 1 qui a une masse de 6052 Da. Ils ont des actions principalement cytolytiques et antibactériennes sauf la poneratoxine qui est une neurotoxine apparentée aux kinines. Dans le venin des ectatomminae, des pseudomyrmeicinae et des myrmeicinae on retrouve principalement des peptides bicaténaires homodimériques et hétérodimériques de poids moléculaire compris entre 5000 et 10000 Da qui ont des actions neurotoxiques et antibactériennes. Les venins des myrmeicinae sont très diversifiés et varient dans leur nature chimique selon les genres mais peu de peptides y ont été caractérisés. La bartolysine a été isolée du venin de *Pogonomyrmex barbatus*, mais aucune information sur sa structure n'a été publiée. Récemment des peptides apparentés aux ICK ont été trouvés chez *Strumigenys kumadori*.

III. Rôles des venins chez les fourmis

1. Fonctions des venins

Le rôle principal du venin est la capture des proies. Cependant il peut être également utilisé comme moyen de défense contre les prédateurs. Chez les hyménoptères le venin peut avoir trois fonctions : offensive, défensive et sociale (Schmidt, 1982).

La fonction offensive des venins est la fonction de base. C'est cette fonction qui permet la capture des proies en les paralysant ou en les tuant. Ce rôle est assuré par l'activité neurotoxique et insecticide des venins. Chez les fourmis ce rôle est retrouvé chez les espèces primitives alors que chez les fourmis plus évoluées le rôle offensif semble avoir été remplacé par d'autres méthodes de capture des proies.

Le venin est également une arme de défense et contient des composés capables de mettre en fuite les assaillants. Le genre *Pogonomyrmex* est un genre de fourmi exclusivement granivore. Bien que ces fourmis ne capturent pas de proie, elles ont un venin extrêmement neurotoxique contre les vertébrés dans un but défensif (Schmidt et al., 2009). Il a été montré que le venin de *Pogonomyrmex badius* a une toxicité élevée contre les vertébrés, mais est faiblement toxique pour les insectes (Schmidt et al., 1978). Les vertébrés étant les principaux prédateurs, le venin de *Pogonomyrmex badius* a évolué en réponse aux pressions de sélection.

Le venin des fourmis est également impliqué dans les interactions sociales au sein de la colonie. Le venin est utilisé comme phéromone de piste ou d'alarme (Schmidt, 1986) grâce aux petites molécules synthétisées par la glande de Dufour.



Figure 16. La morphologie des tarse de la fourmi *Azteca andreae* permet de capturer de très grosses proies, ici un papillon sphinx, (Dejean *et al.*, 2010).



Figure 17. Fourmis arboricole du genre *Pachycondyla*.

La présence de peptides linéaires hélicoïdaux antimicrobiens a été également montrée dans le venin de *Pachycondyla goeldii* (Ponericinae) (Orivel *et al.*, 2001) ainsi que dans le venin de *Myrmecia pilosula* (pilosuline) (Zelezetsky *et al.*, 2005). Ces peptides qui sont injectés dans les proies avec le venin pourraient avoir un rôle dans la conservation des proies en les protégeant contre les microorganismes pathogènes, ou pourraient favoriser la pénétration intracellulaire d'autres composés en lysant les membranes ou en créant des pores dans la bicouche lipidique.

2. Adaptation à la vie arboricole

Les fourmis sont parmi les organismes les plus diversifiés de la planète et ont colonisé presque tous les milieux terrestres dont le milieu arboricole. Les fourmis sont même plus abondantes dans les canopées que tous les autres arthropodes herbivores et représentent 94 % des arthropodes échantillonnés dans les canopées des forêts tropicales (Davidson *et al.*, 2003). Cette vie arboricole impose quelques contraintes et nécessite certaines adaptations de la part des fourmis. Du point de vue morphologique, toutes les espèces arboricoles du genre *Pachycondyla* possèdent sous leurs tarses des pelotes adhésives bien développées appelées arolium, leur permettant d'adhérer sur la surface lisse des feuilles. Les espèces terrioles elles n'ont pas toujours cette adaptation (Orivel *et al.*, 2001). La contrainte alimentaire est un autre facteur limitant. Les espèces de fourmis prédatrices rencontrent plus de difficulté à capturer des proies dans les arbres que sur le sol. Le nombre de proies est plus faible dans les arbres et les proies ont davantage de possibilités de fuite en se laissant tomber au sol. Les espèces prédatrices arboricoles ont donc développé des adaptations pour la capture des proies. Des fourmis du genre *Allomerus* construisent des pièges afin de pouvoir capturer leurs proies. D'autres comme le genre *Azteca* possèdent sous les tarses une adaptation morphologique qui permet aux fourmis de s'arrimer sous les feuilles par un système d'accrochage similaire au Velcro® (Dejean *et al.*, 2010). Ainsi ces fourmis sont capables d'attraper et de retenir des proies très lourdes (Fig 16). Chez les fourmis primitives arboricoles telles que les ponerinae qui n'ont développé ni adaptations morphologiques ni adaptations comportementales à la capture des proies, le venin pourrait avoir évolué en réponse aux contraintes liées à la vie arboricole. Les venins sont soumis aux pressions de sélection et pourraient donc avoir évolué vers une plus grande toxicité chez les espèces arboricoles, permettant ainsi aux fourmis de paralyser leurs proies plus rapidement pour éviter qu'elles ne leur échappent. La comparaison des venins de plusieurs espèces du genre *Pachycondyla* (Fig 17) a montré à l'exception de *Pachycondyla cavinodis*, que la toxicité des venins des fourmis arboricoles est significativement supérieure à celle des espèces terrioles (Orivel *et al.*, 2001). Ce type de différenciation a également pu être partiellement démontré pour les venins de mygales arboricoles,

plus neurotoxiques que ceux de leurs homologues terricoles (Escoubas *et al.*, 1998). Un résultat similaire a également été obtenu par la comparaison de 18 espèces d'aranéomorphes qui a montré des différences dans la toxicité entre les espèces. Les espèces vivant dans la végétation ont un venin avec une DL50 inférieure à celle des espèces terricoles et des espèces construisant des toiles (Nentwig *et al.*, 1992).

IV. Chimiotaxonomie des venins peptidiques

Pour la reproductibilité des études pharmacologiques l'identification des animaux à partir desquels les venins sont collectés est cruciale. Cependant il n'est pas toujours facile d'identifier une espèce, en particulier dans certains groupes taxonomiques complexes tels que les arachnides ou les insectes. L'identification reposant sur les caractères morphologiques est souvent affaire de spécialistes lesquels sont de moins en moins nombreux. De plus il est souvent nécessaire d'utiliser une méthode destructrice (dissection des genitalia) pour confirmer l'espèce, et parfois les données morphologiques ne suffisent même pas pour séparer deux espèces proches dans le cas d'espèces jumelles. Les nouvelles méthodes de biologie moléculaire reposant sur le séquençage de l'ADN (barcoding) répondent à ce problème mais restent une technique destructrice pour l'animal (impossibilité de récolter à nouveau du venin).

La chimiotaxonomie est une alternative et un complément à la taxonomie morphologique et moléculaire. C'est une méthode d'identification basée sur l'analyse des mélanges chimiques complexes. Chez les fourmis la chimiotaxonomie utilisant les profils d'hydrocarbures cuticulaires est reconnue comme une technique fiable d'identification (Lockey, 1991; Dahbi *et al.*, 2008). Cependant dans le cadre d'études sur des animaux venimeux une autre alternative utilisant l'analyse des compositions complexes des venins est envisageable.

1. Les venins de fourmis

Les seules études de chimiotaxonomie sur les venins de fourmis ont été menées sur les venins alcaloïdiques. Les travaux sur le genre *Solenopsis* ont montré que les composés alcaloïdiques de leur venin pouvaient être un outil taxonomique (MacConnell *et al.*, 1974). En Nouvelle-Zélande la chimiotaxonomie des alcaloïdes de plusieurs nids de *Monomorium* a permis de distinguer 4 espèces différentes qui étaient jusque là confondues (Jones *et al.*, 1988). Cependant il est parfois difficile de discriminer deux espèces proches par l'analyse de ces composés (MacConnell *et al.*, 1976). De plus les alcaloïdes sont des métabolites secondaires qui ne reflètent pas directement l'expression du génome.

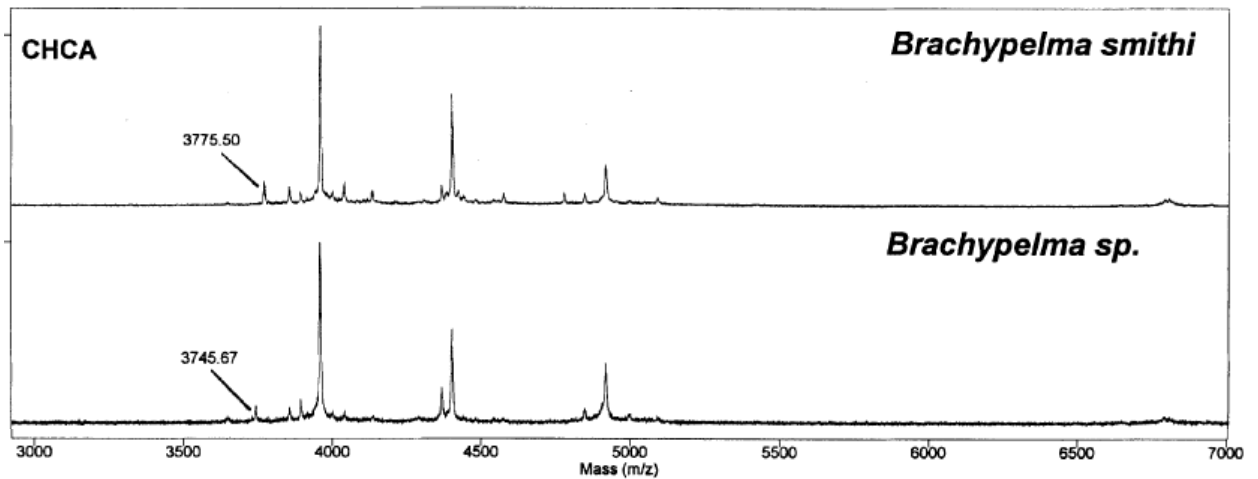


Figure 18. La comparaison des spectres de masse MALDI-TOF permet d'identifier des spécimens de mygales dont l'espèce était inconnue, ici le spécimen inconnu *Brachypelma sp* a un spectre qui correspond à celui de *Brachypelma smithi*.



Figure 19. Extraction du venin de mygale par électrostimulation des glandes à venin. Méthode non destructrice de récolte de venin (Photo Pierre Escoubas)

Si les composés alcaloïdiques du venin ne sont pas un bon outil de chimiotaxonomie, les peptides eux pourraient l'être. Contrairement aux alcaloïdes, les toxines protéiques sont directement issues de l'expression génique. De plus la majorité des espèces venimeuses de fourmis possèdent un venin protéique. La composition peptidique des venins est donc susceptible de servir d'empreinte biochimique caractéristique de chaque espèce.

La chimiotaxonomie reposant sur l'analyse des compositions peptidiques des venins n'a jamais été appliquée aux fourmis mais plusieurs études impliquant les animaux venimeux d'autres classes (serpents, scorpions, arachnides) ont montré l'applicabilité de la méthode.

2. Les venins de serpents

Une nouvelle méthode d'identification des serpents venimeux a été proposée (Gillard *et al.*, 1996). Cette méthode utilisant le couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse permet d'obtenir les cartes des masses des toxines présentes dans le venin brut qui sont utilisées comme empreinte spécifique. Cette technique repose sur le principe que les serpents d'une même espèce vont exprimer essentiellement des peptides avec les même séquences d'acides aminés et que la composition peptidique va différer entre espèces. Cette méthodologie a été appliquée à l'analyse du venin d'un serpent non identifié du genre *Naja sp.* en provenance du Vietnam. La carte des masses des toxines du venin a été comparée avec les cartes des masses du venin de deux cobras de Thaïlande, *Naja naja* et *Naja kaouthia*. L'empreinte du venin du cobra du Vietnam correspond exactement à l'empreinte de *Naja kaouthia* et n'a pas de similarité avec celle de *Naja naja* (Gillard *et al.*, 1996; Stöcklin, 1997; Stöcklin *et al.*, 2000). Cependant peu d'études de chimiotaxonomie ont été menées sur les serpents en raison de problèmes de taxonomie moins importants que pour les invertébrés.

3. Les venins de mygales

L'identification des mygales (Araneae, theraphosidae) est une tâche difficile et relève souvent de la compétence de quelques rares spécialistes. De plus les espèces génétiquement proches sont souvent morphologiquement très semblables. Plusieurs études ont montré l'intérêt du couplage HPLC/MALDI-TOF pour la taxonomie (Escoubas *et al.*, 1997; Escoubas *et al.*, 1998; Escoubas *et al.*, 1999; Escoubas *et al.*, 2002). La carte des masses moléculaires des peptides du venin est caractéristique de l'espèce (Fig 18), même pour des espèces proches.



Figure 20. *Buthus occitanus* (photo Joël Gauthier)



Figure 21. Les cônes sont des gastéropodes marins recherchés par les collectionneurs. Ce sont également de redoutables prédateurs de poissons et de vers grâce à leur venin très neurotoxique.

Le couplage HPLC/MALDI-TOF offre plusieurs avantages. C'est une méthode rapide et précise qui permet le profilage d'un grand nombre d'échantillons. Cette méthode est également reproductible car non destructrice pour l'animal (Fig 19). La spectrométrie de masse MALDI-TOF est donc un outil de taxonomie puissant qui peut être combiné avec les données morphologiques. L'application de cette méthode à diverses espèces de mygales a montré que les espèces proches partagent dans leur venin des séquences peptidiques homologues, ce qui suggère que ces molécules possèdent des propriétés pharmacologiques similaires (Escoubas *et al.*, 1997).

Cependant chez certaines espèces de mygales on a remarqué des différences de profils peptidiques entre les mâles et les femelles d'une même espèce (Escoubas *et al.*, 2002). Il est donc nécessaire de sexer les mygales avant d'appliquer la méthode. Cette méthode a également été testée avec un spectromètre de masse ESI-TOF. Une étude sur les mygales Australiennes du genre *Hadronyche* a démontré l'efficacité et la simplicité de la méthode de couplage HPLC/ESI-TOF pour l'identification des espèces (Wilson *et al.*, 2006).

4. Les venins de scorpions

Chez les scorpions du genre *Buthus* (Fig 20) la distribution des composés protéiques du venin a permis d'établir des relations phylogénétiques entre les espèces en concordance avec les données morphologiques (Nascimento *et al.*, 2006). Cette étude utilisant le principe de chromatographie liquide 2D-spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence chez cinq espèces de scorpions les différentes familles de peptides en fonction de leurs masses et de leur hydrophobicité.

5. Les venins de cônes

En utilisant la technique d'analyse des peptides des venins des cônes (conidae) (Fig 21) par spectrométrie de masse il a été montré qu'il existe non seulement des variations quantitatives et qualitatives entre les espèces mais également au sein d'une même espèce (Jones *et al.*, 1996; Krishnamurthy *et al.*, 1996). Ces variations étant trop importantes pour pouvoir caractériser chaque espèce, la méthode d'empreinte des masses peptidiques par LC-MS n'est apparemment pas applicable à la chimiotaxonomie des cônes.

La méthode d'analyse des venins par couplage LC-MS a permis d'obtenir des cartes des masses peptidiques des venins qui peuvent servir d'empreinte spécifique dans différentes classes

d'animaux venimeux (ophidiens, arachnides). Cependant la méthode n'est pas applicable aux conidae qui montrent trop de variations intraspécifiques dans la composition peptidique de leur venin. L'applicabilité de cette méthode à l'ordre des hyménoptères n'a à ce jour pas été évaluée. Cet ordre qui représente environ 70% de tous les animaux venimeux et dont la taxonomie est très souvent délicate pourrait donc bénéficier des avantages de cette méthode.

V. Conclusion

La biochimie des venins peptidiques des fourmis est un domaine largement méconnu en comparaison des autres animaux venimeux (serpents, scorpions, mygales, cônes). La très grande diversité de ces organismes laisse pourtant envisager une très grande diversité de leurs composés peptidiques, bien qu'à ce jour seul trois types de structures ait été caractérisés (peptides linéaires hélicoïdaux, peptides dimériques et peptides probablement ICK). Ainsi l'étude biochimique des peptides des venins de fourmis pourrait permettre d'expliquer les différences de toxicité observées entre les fourmis arboricoles et les fourmis terricoles. Les peptides pourraient également se révéler utiles dans la cadre de la chimiotaxonomie en étant utilisés comme marqueurs biochimiques de l'espèce comme cela a déjà été réalisé chez d'autres animaux venimeux. Par ailleurs la recherche dans les venins de fourmis de peptides possédant un potentiel thérapeutique peut également être envisagée.

VI. Références

- AntWeb. (2011). "AntWeb." Retrieved 11/03, 2011, from <http://www.antweb.org/>.
- Arseniev, A. S., K. A. Pluzhnikov, et al. (1994). "Toxic principle of selva ant venom is a pore-forming protein transformer." *FEBS Lett* **347**(2-3): 112-116.
- Baer, H., T. Y. Liu, et al. (1979). "Protein components of fire ant venom (*Solenopsis invicta*).¹" *Toxicon* **17**(4): 397-405.
- Bernheimer, A. W., L. S. Avigad, et al. (1980). "A hemolytic polypeptide from the venom of the red harvester ant, *Pogonomyrmex barbatus*." *Toxicon* **18**(3): 271-278.
- Blum, M. S. (1992). "Ant Venoms: Chemical and Pharmacological Properties." *Toxin Reviews* **11**(2): 115-164.
- Blum, M. S., J. R. Walker, et al. (1958). "Chemical, insecticidal and antibiotic properties of fire ant venom." *Science* **128**(3319): 306-307.
- Cavill, G. W., P. L. Robertson, et al. (1964). "Venom and Venom Apparatus of the Bull Ant, *Myrmecia Gulosa* (Fabr.)." *Science* **146**: 79-80.
- Dahbi, A., A. Hefetz, et al. (2008). "Chemotaxonomy of some Cataglyphis ants from Morocco and Burkina Faso." *Biochemical Systematics and Ecology* **36**(7): 564-572.
- Daloze, D., J.-C. de Biseau, et al. (1998). "(13E,15E,18Z,20Z)-1-Hydroxypentacos-13,15,18,20-tetraen-11-yn-4-one 1-acetate, from the venom of a Brazilian *Crematogaster* ant." *Tetrahedron Letters* **39**(26): 4671-4672.
- Davidson, D. W., S. C. Cook, et al. (2003). "Explaining the abundance of ants in lowland tropical rainforest canopies." *Science* **300**(5621): 969-972.
- Davies, N. W., M. D. Wiese, et al. (2004). "Characterisation of major peptides in 'jack jumper' ant venom by mass spectrometry." *Toxicon* **43**(2): 173-183.
- Dejean, A., C. I. Leroy, et al. (2010). "Arboreal Ants Use the Velcro[®] Principle to Capture Very Large Prey." *PLoS ONE* **5**(6): e11331.
- Donovan, G. R., M. D. Street, et al. (1995). "Separation of jumper ant (*Myrmecia pilosula*) venom allergens: a novel group of highly basic proteins." *Electrophoresis* **16**(5): 804-810.
- Donovan, G. R., M. D. Street, et al. (1996). "Expression of jumper ant (*Myrmecia pilosula*) venom allergens: post-translational processing of allergen gene products." *Biochem Mol Biol Int* **39**(5): 877-885.
- Duval, A., C. O. Malecot, et al. (1992). "Poneratoxin, a new toxin from an ant venom, reveals an interconversion between two gating modes of the Na channels in frog skeletal muscle fibres." *Pflugers Arch* **420**(3-4): 239-247.
- Escoubas, P., M.-L. Célérier, et al. (1997). "High-performance liquid chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry peptide fingerprinting of tarantula venoms in the genus *Brachypelma*: chemotaxonomic and biochemical applications." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **11**(17): 1891-1899.
- Escoubas, P., J. Chamot-Rooke, et al. (1999). "A comparison of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry methods for the analysis of crude tarantula venoms in the *Pterinochilus* group." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **13**(18): 1861-1868.
- Escoubas, P., G. Corzo, et al. (2002). "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography study of quantitative and qualitative variation in tarantula spider venoms." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **16**(5): 403-413.
- Escoubas, P. and C. M.-L. N. T. (1998). "Composition and neurotoxicity of tarantula venoms: biogeographic and taxonomic variations." *toxicon* **36**(12): 1737.

- Escoubas, P., B. J. Whiteley, et al. (1998). "Multidimensional peptide fingerprinting by high performance liquid chromatography, capillary zone electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of tarantula venom samples." Rapid Communications in Mass Spectrometry **12**(16): 1075-1084.
- Gillard, C., H. Virelizier, et al. (1996). Classification of the white Naja by on-line LC-ES-MS. Eighteenth International Symposium on Capillary Chromatography. III.
- Hendrich, A. B., J. W. Mozrzymas, et al. (2002). "The effect of poneratoxin on neuromuscular transmission in the rat diaphragm." Cell Mol Biol Lett **7**(2): 195-202.
- Heurtault, J., M. Goyffon, et al. (1999). "La fonction venimeuse et les venins." Annales de l'institut pasteur **10**(2): 147-160.
- Hink, W. F., P. W. Pappas, et al. (1994). "Partial biochemical characterization of venom from the ant, *Pseudomyrmex triplarinus*." Toxicon **32**(7): 763-772.
- Hink, W. F., K. J. Romstedt, et al. (1989). "Inhibition of human platelet aggregation and secretion by ant venom and a compound isolated from venom." Inflammation **13**(2): 175-184.
- Hoffman, D. R. (1993). "Allergens in Hymenoptera venom XXIV: the amino acid sequences of imported fire ant venom allergens Sol i II, Sol i III, and Sol i IV." J Allergy Clin Immunol **91**(1 Pt 1): 71-78.
- Hoffman, D. R. (1993). "Allergens in Hymenoptera venom. XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity." J Allergy Clin Immunol **92**(5): 707-716.
- Hoffman, D. R., R. H. Sakell, et al. (2005). "Sol i 1, the phospholipase allergen of imported fire ant venom." J Allergy Clin Immunol **115**(3): 611-616.
- Inagaki, H., M. Akagi, et al. (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**(2): 170-178.
- Inagaki, H., M. Akagi, et al. (2008). "Pilosulin 5, a novel histamine-releasing peptide of the Australian ant, *Myrmecia pilosula* (Jack Jumper Ant)." Arch Biochem Biophys **477**(2): 411-416.
- Inagaki, H., K. Masuko, et al. (2008). SKTXs: peptides identified from the ant *Strumigenys kumadori* that block sodium channel. The 8th IST-ASIA PACIFIC MEETING on Animal, plant and microbial toxins, Hanoi, Vietnam, Toxicon.
- Johnson, S. R., J. A. Copello, et al. (2009). "A biochemical characterization of the major peptides from the Venom of the giant Neotropical hunting ant *Dinoponera australis*." Toxicon **29**(2): 29.
- Jones, A., J.-P. Bingham, et al. (1996). "Isolation and Characterization of Conopeptides by High-performance Liquid Chromatography Combined with Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **10**(1): 138-143.
- Jones, T. H., S. M. Stahly, et al. (1988). "Chemotaxonomic implications of the venom chemistry of some *Monomorium antarcticum* populations." J Chem Ecol **14**(12): 2197-2212.
- Kourie, J. I. and A. A. Shorthouse (2000). "Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels." Am J Physiol Cell Physiol **278**(6): C1063-1087.
- Krishnamurthy, T., M. Prabhakaran, et al. (1996). "Mass spectrometric investigations on *Conus* peptides." Toxicon **34**(11-12): 1345-1359.
- Leclercq, S., J.-C. de Biseau, et al. (2000). "Furanocembranoid Diterpenes as Defensive Compounds in the Dufour Gland of the Ant *Crematogaster brevispinosa rochai*." Tetrahedron **56**(14): 2037-2042.
- Lewis, J. C., A. J. Day, et al. (1968). "Phospholipase A in the venom of the Australian bulldog ant *Myrmecia pyriformis*." Toxicon **6**(2): 109-112.
- Lewis, J. C. and I. S. De la Lande (1967). "Pharmacological and enzymic constituents of the venom of an Australian "bulldog" ant *Myrmecia pyriformis*." Toxicon **4**(4): 225-234.
- Lewis, R. J. and M. L. Garcia (2003). "Therapeutic potential of venom peptides." Nat Rev Drug Discov **2**(10): 790-802.

- Lockey, K. H. (1991). "Insect hydrocarbon classes: Implications for chemotaxonomy." Insect Biochemistry **21**(1): 91-97.
- Lopez, L. C. and E. D. Morgan (1997). "Explanation of Bitter Taste of Venom of Ponerine Ant, *Pachycondyla apicalis*." J Chem Ecol **23**(3): 705-712.
- MacConnell, J. G., M. S. Blum, et al. (1976). "Fire ant venoms: Chemotaxonomic correlations with alkaloidal compositions." Toxicon **14**(1): 69-78.
- MacConnell, J. G., R. N. Williams, et al. (1974). "New Alkaloids in the Venoms of Fire Ants." Annals of the Entomological Society of America **67**: 134-135.
- Marlier, J. F., Y. Quinet, et al. (2004). "Defensive behaviour and biological activities of the abdominal secretion in the ant *Crematogaster scutellaris* (Hymenoptera: Myrmicinae)." Behavioural Processes **67**(3): 427-440.
- Matuszek, M. A., W. C. Hodgson, et al. (1992). "Pharmacological studies of jumper ant (*Myrmecia pilosula*) venom: evidence for the presence of histamine, and haemolytic and eicosanoid-releasing factors." Toxicon **30**(9): 1081-1091.
- Matuszek, M. A., W. C. Hodgson, et al. (1994). "Pharmacological studies of the venom of an Australian bulldog ant (*Myrmecia pyriformis*)." Nat Toxins **2**(1): 36-43.
- Merlin, P., J. C. Braekman, et al. (1988). "Tetraponerines, toxic alkaloids in the venom of the Neo-Guinean pseudomyrmecine ant *Tetraponera* sp." J Chem Ecol **14**(2): 517-527.
- Meyer, W. L. (1996). Most toxic insect venom.
- Nascimento, D. G., B. Rates, et al. (2006). "Moving pieces in a taxonomic puzzle: Venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones)." Toxicon **47**(6): 628-639.
- Nentwig, W., T. Friedel, et al. (1992). "Comparative investigations on the effect of the venoms of 18 spider species onto the cockroach *Blatta orientalis* (Blattodea)." Zool. jb. physiol **96**: 279-290.
- Nolde, D. E., A. G. Sobol, et al. (1995). "Three-dimensional structure of ectatomin from *Ectatomma tuberculatum* ant venom." J Biomol NMR **5**(1): 1-13.
- Orivel, J. and A. Dejean (2001). "Comparative effect of the venoms of ants of the genus *Pachycondyla* (Hymenoptera: Ponerinae)." Toxicon **39**(2-3): 195-201.
- Orivel, J., M. C. Malherbe, et al. (2001). "Relationships Between Pretarsus Morphology and Arboreal Life in Ponerine Ants of the Genus *Pachycondyla* (Formicidae: Ponerinae)." Annals of the Entomological Society of America **94**(3): 449-456.
- Orivel, J., V. Redeker, et al. (2001). "Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*." J Biol Chem **276**(21): 17823-17829.
- Pan, J. and W. F. Hink (2000). "Isolation and characterization of myrmexins, six isoforms of venom proteins with anti-inflammatory activity from the tropical ant, *Pseudomyrmex triplarinus*." Toxicon **38**(10): 1403-1413.
- Piek, T. (1991). "Neurotoxic kinins from wasp and ant venoms." Toxicon **29**(2): 139-149.
- Piek, T., A. Duval, et al. (1991). "Poneratoxin, a novel peptide neurotoxin from the venom of the ant, *Paraponera clavata*." Comp Biochem Physiol C **99**(3): 487-495.
- Piek, T., B. Hue, et al. (1991). "Pharmacological characterization and chemical fractionation of the venom of the ponerine ant, *Paraponera clavata* (F.)." Comp Biochem Physiol C **99**(3): 481-486.
- Pluzhinikov, K. A., D. E. Nol'de, et al. (1994). "[Structure-activity study of the basic toxic component of venom from the ant *Ectatomma tuberculatum*]." Bioorg Khim **20**(8-9): 857-871.
- Pluzhnikov, K., L. Shevchenko, et al. (2000). Ant polypeptide toxins.
- Schmidt, J. O. (1982). "Biochemistry of Insect Venoms." Annual Review of Entomology **27**(1): 339-368.
- Schmidt, J. O. (1986). Chemistry, pharmacology and chemical ecology of ant venoms. Venoms of the hymenoptera : biochemical, pharmacological and behavioural aspects. T. Piek: 425-508.
- Schmidt, J. O. and M. S. Blum (1978). "The biochemical constituents of the venom of the harvester ant, *Pogonomyrmex badius*." Comp Biochem Physiol C **61C**(1): 239-247.

- Schmidt, J. O. and M. S. Blum (1978). "A harvester ant venom: chemistry and pharmacology." Science **200**(4345): 1064-1066.
- Schmidt, J. O. and M. S. Blum (1978). "Pharmacological and toxicological properties of harvester ant, *Pogonomyrmex badius*, venom." Toxicon **16**(6): 645-651.
- Schmidt, J. O. and G. C. Snelling (2009). "Pogonomyrmex arzensis Cole: Does an unusual harvester ant species have an unusual venom?" Journal of hymenoptera research **18**(2): 322-325.
- Schmidt, M., R. B. Walker, et al. (1993). "Nucleotide sequence of cDNA encoding the fire ant venom protein Sol i II." FEBS Lett **319**(1-2): 138-140.
- Stöcklin, R. (1997). "Fingerprints of crude venoms by mass spectrometry: from zoological to molecular investigations." Toxicon **35**(6): 818-818.
- Stöcklin, R., D. Mebs, et al. (2000). Identification of snake species by toxin mass fingerprinting of their venoms. Protein and peptide analysis. H. press. Totowa. **146**: 317-335.
- Street, M. D., G. R. Donovan, et al. (1996). "Molecular cloning and characterization of the major allergen Myr p II from the venom of the jumper ant *Myrmecia pilosula*: Myr p I and Myr p II share a common protein leader sequence." Biochim Biophys Acta **1305**(1-2): 87-97.
- Szolajska, E., J. Poznanski, et al. (2004). "Poneratoxin, a neurotoxin from ant venom. Structure and expression in insect cells and construction of a bio-insecticide." Eur J Biochem **271**(11): 2127-2136.
- von Sicard, N. A. E., D. J. Candy, et al. (1989). "The biochemical composition of venom from the pavement ant (*Tetramorium caespitum* L.)." Toxicon **27**(10): 1127-1133.
- Wanstall, J. C. and I. S. de la Lande (1974). "Fractionation of bulldog ant venom." Toxicon **12**(6): 649-655.
- Wiese, M. D., S. G. Brown, et al. (2007). "Myrmecia pilosula (Jack Jumper) ant venom: identification of allergens and revised nomenclature." Allergy **62**(4): 437-443.
- Wiese, M. D., T. K. Chataway, et al. (2006). "Proteomic analysis of Myrmecia pilosula (jack jumper) ant venom." Toxicon **47**(2): 208-217.
- Wilson, D. and P. F. Alewood (2006). "Taxonomy of Australian Funnel-web spiders using rp-HPLC/ESI-MS profiling techniques." Toxicon **47**(6): 614-627.
- Wu, Q. X., M. A. King, et al. (1998). "Cytotoxicity of pilosulin 1, a peptide from the venom of the jumper ant *Myrmecia pilosula*." Biochim Biophys Acta **1425**(1): 74-80.
- Zelezetsky, I., U. Pag, et al. (2005). "Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin." Arch Biochem Biophys **434**(2): 358-364.

Rapport de stage :

Les peptides des venins de fourmis primitives



Photo : © Alex Wild

Liste des abréviations

ACN : Acétonitrile

CA : Acide cafféique

CHCA : Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique

Da : Dalton

DHB : Acide 2,5 dihydroxybenzoïque

DTT : Dithiothreitol

FA : Acide férulique

HPLC : High-performance liquid chromatography

LC-MS : Liquid chromatography- mass spectrometry

m/z : masse / charge électrique

MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight

PA : Phosphate d'ammonium

P. con : *Pachycondyla constricta*

P. cre : *Pachycondyla crenata*

P. goe : *Pachycondyla goeldii*

P. har : *Pachycondyla harpax*

P. inv : *Pachycondyla inversa*

P. lae : *Pachycondyla laevigata*

P. mes : *Pachycondyla mesonotalis*

P.obs : *Pachycondyla obscuricornis*

P. sti : *Pachycondyla stigma*

sDHB : Acide 2,5 dihydroxybenzoïque + acide 5-methoxysalicylique

TFA : Acide trifluoroacétique

THAP : 2,4,6 trihydroxyacetophenone monohydrate

Sommaire

I. Introduction.....	47
1. Généralités	47
2. Chimiotaxonomie des venins	49
3. Les peptides des venins de fourmis	51
4. Adaptation des venins à la vie arboricole	53
5. Objectifs de l'étude	55
6. VenomeTech.....	55
II. Matériels et méthodes	57
1. Collecte des échantillons.....	57
2. Spectrométrie de masse MALDI-TOF et MALDI-TOF/TOF.....	57
3. Préparation des échantillons et optimisation	59
4. Chromatographie en phase inverse	61
5. Réduction des ponts disulfure.....	61
6. Bioinformatique	63
III. Résultats	65
1. Optimisation.....	65
A. Choix de la matrice MALDI	65
B. Additifs	65
2. Chimiotaxonomie	65
A. Variation individuelle et intraspécifique	65
B. Variation interspécifique	69
C. Validation taxonomique	69
3. Caractérisation de la composition peptidique	71
A. Distribution des peptides	71
B. Variation écologique	75
C. Etude structurale	75
IV. Discussion.....	81
V. Conclusion	87
VI. Références.....	89

I. Introduction

1. Généralités

Les venins sont des cocktails complexes de molécules bioactives sélectionnées durant des millions d'années en vue d'une efficacité optimale. Ce sont de véritables armes chimiques utilisées pour la capture des proies et pour la défense contre les prédateurs. Ainsi les venins contiennent des molécules telles que des protéines, des enzymes et des peptides qui paralysent en agissant sur le système nerveux ou sont capables de lyser les parois cellulaires, provoquant alors nécrose, hémorragie, et douleur chez les victimes. Des acides aminés libres, des amines biogènes, divers sels et parfois même des alcaloïdes viennent compléter ces mélanges détonants. Parmi les molécules actives présentes dans les venins, les peptides sont majoritaires dans la plupart des espèces venimeuses. Ce sont de petites protéines de moins de 100 acides aminés qui possèdent une grande diversité de structures, de fonctions et de sélectivité et qui sont souvent stabilisées par des ponts disulfure. Ces peptides sont d'un intérêt grandissant pour l'industrie pharmaceutique car la diversité de leurs modes d'action et leur petite taille offrent l'espoir d'en dériver des agents thérapeutiques possédant des activités très ciblées et donc moins d'effets secondaires [1]. Certains venins peuvent contenir plusieurs centaines de peptides différents pour une seule espèce, comme le venin de l'araignée australienne *Atrax robustus* [2]. Les 175 000 espèces d'animaux venimeux représentent donc une ressource potentielle de plus de 40 millions de peptides, tous biologiquement actifs.

Pour pouvoir agir les venins ont besoin d'être injectés dans le milieu intérieur. Les animaux venimeux possèdent pour cela un appareil vulnérant, dont la nature et la localisation anatomique varient selon le groupe taxonomique : crochets venimeux, aiguillons ou cnidocystes sont quelques exemples.

L'ordre des hyménoptères est de loin le groupe taxonomique d'animaux venimeux le plus riche avec environ 120 000 espèces. L'appareil vulnérant des hyménoptères est localisé à l'extrémité de leur abdomen. Il est constitué d'un aiguillon, parfois barbelé comme chez les abeilles, qui est une transformation de leur ovipositeur, ce qui implique que seuls les hyménoptères femelles ont la possibilité de piquer. Si les venins des apidae et des vespidae ont été bien étudiés, les venins des formicidae restent quasiment inexplorés. Les fourmis comptent pourtant parmi les organismes les plus diversifiés de la planète avec actuellement 14 189 espèces et sous-espèces décrites [3]. Leur incroyable succès écologique leur a permis de conquérir quasiment tous les milieux terrestres de la planète, ce qui laisse présager d'une grande diversité dans la nature des composants de leurs venins. Cependant toutes les fourmis n'ont pas gardé la possibilité de piquer et chez certaines sous-familles l'aiguillon a régressé jusqu'à ne plus être fonctionnel. C'est le cas chez les dorylinae,

les aneuretinae, les dolichoderinae et chez les formicinae, ainsi seules quelques 8500 espèces environ possèdent un aiguillon fonctionnel. La production de venin est assurée par la glande à venin associée à la glande de Dufour, qui est principalement impliquée dans la synthèse de petites molécules assurant le rôle social du venin. Le venin, stocké dans un réservoir, est ensuite expulsé dans l'aiguillon par contraction musculaire. Si la majorité des venins de fourmis sont de nature protéique, il faut noter la particularité de l'importante sous-famille des myrmecinae dont les genres *Solenopsis* et *Monomorium* ont des venins composés principalement d'alcaloïdes [4]. Il est intéressant également de rapporter, toujours chez les myrmecinae, l'originalité du genre *Crematogaster* qui possède un aiguillon en forme de spatule qui lui sert à déposer son venin. Ce venin composé de petites molécules non protéiques agit comme un insecticide de contact et pénètre passivement dans l'organisme des agresseurs ou des proies.

Chez les fourmis le venin peut avoir trois rôles : en plus d'un rôle offensif et défensif comme chez les autres animaux venimeux, il a également un rôle social et est utilisé comme phéromone ce qui permet aux membres de la colonie de communiquer entre eux.

2. Chimiotaxonomie des venins

Pour des applications dans de nombreux domaines dont l'étude de la biodiversité, la biologie des interactions ou les études biochimiques et pharmacologiques, il est primordial d'identifier de façon indiscutable et reproductible les espèces étudiées. Chez les arthropodes cette tâche est bien souvent compliquée par le nombre important d'espèces et leur ressemblance morphologique. L'identification morphologique est la méthode la plus classique mais s'avère être une tâche relativement complexe et reste l'apanage de quelques rares spécialistes. Depuis plusieurs années les nouvelles méthodes de biologie moléculaire telle que le « molecular barcoding » complètent l'identification morphologique ou permettent de s'en affranchir. Mais une autre méthode est également utilisée notamment pour les insectes sociaux, il s'agit de la chimiotaxonomie. Depuis l'avènement de la chromatographie gazeuse cette méthode basée sur les empreintes d'hydrocarbures cuticulaires a démontré toute son efficacité pour l'étude des fourmis et des termites. De façon similaire, la chimiotaxonomie basée sur l'analyse des composés des venins peut également être envisagée comme une alternative. Les venins sont des mélanges complexes qui caractérisent les espèces qui les produisent car ils sont souvent liés par leur composition peptidique à une expression directe du génome. Cette méthode d'identification basée sur les profils peptidiques des venins a déjà démontré son applicabilité pour les serpents [5-7], les araignées [2, 8-12] ou encore

les scorpions [13]. Elle a également été testée pour les mollusques de la famille des conidae [14, 15], mais dans ce dernier cas les variations intraspécifiques et interindividuelles sont trop importantes pour permettre une discrimination fiable des espèces. Si la validité de la chimiotaxonomie des venins de fourmis a déjà été testée sur les venins alcaloïdiques des genres *Solenopsis* [16, 17][16, 17][16, 17] et *Monomorium* [17, 18], une méthode utilisant les profils de peptides des venins protéiques n'a encore jamais été mise en œuvre pour les fourmis.

3. Les peptides des venins de fourmis

La faible quantité de venin produite par une fourmi a longtemps été une contrainte pour l'analyse de la composition. Cependant le développement de nouvelles technologies de biochimie analytique telles que la nanochromatographie, ou la spectrométrie de masse permet désormais de faire pleine lumière sur la nature des composés. Quelques études ont ainsi permis de caractériser des peptides présents dans les venins de plusieurs espèces de fourmis.

La fourmi d'Amérique du Sud *Paraponera clavata* qui est connue pour le caractère douloureux de ses piqûres, possède dans son venin un peptide neurotoxique de 25 acides aminés. Ce peptide appelé poneratoxine monte une structure spatiale en forme de V constituée de deux hélices α reliées par une boucle. Il est capable de pénétrer les membranes cellulaires et de former des pores qui perturbent la transmission synaptique en modulant les canaux sodium, induisant ainsi une paralysie [19-23]. La fourmi primitive *Myrmecia pilosula* suscite en Australie la crainte et est considérée comme un problème de santé publique. Environ 2% de la population est allergique à son venin et l'espèce très agressive est impliquée chaque année dans plusieurs cas mortels de chocs anaphylactiques. Son venin contient des peptides très allergènes, les pilosulines. Il s'agit de peptides bicaténaires qui ont également des propriétés antimicrobiennes, cytotoxiques et insecticides [24-29]. Il ne s'agit pas de l'unique cas de peptides bicaténaires rapporté dans les venins de fourmis. En effet l'ectatomine est un peptide bicaténaire hétérodimérique présent dans le venin d'*Ectatomma tuberculatum*. A l'instar de la poneratoxine ce peptide est capable d'interférer avec la conduction ionique en formant des pores dans les membranes cellulaires [30-34]. Une étude récente a également caractérisé six peptides bicaténaires hétérodimériques dans le venin de *Pseudomyrmex triplarinus*, qui ont été nommés myrmexines. Le venin de cette fourmi était connu pour avoir des propriétés anti-inflammatoires en empêchant les plaquettes humaines de s'agréger et ces peptides pourraient en être la cause [35-37]. Dans le venin de la sous famille des ponerinae, les peptides des venins de deux espèces, *Pachycondyla goeldii* et *Dinoponera australis* ont été étudiés. Pour la première, quinze peptides linéaires possédant une structure hélicoïdale ont été séquencés et

nommés ponericines. Ils montrent des activités bactéricides et insecticides et possèdent des similitudes avec d'autres peptides découverts dans le venin d'abeille ou la peau de grenouille [38]. Les peptides découverts dans le venin de *Dinoponera australis* ont été nommés dinoponeratoxines et leurs structures primaires partagent des similitudes avec celles des ponericines et de la poneratoxine, ce qui pourrait suggérer des pharmacologies similaires [39]. Le venin des représentants de la sous famille des myrmicinae est connu pour être généralement composé de petites molécules non protéiques, cependant un peptide cytolytique de 34 résidus a été isolé du venin de *Pogonomyrmex barbatus*, et nommé barbatolysine [40].

4. Adaptation des venins à la vie arboricole

Le passage à la vie arboricole nécessite un certain nombre d'adaptations ou de pré-requis afin de passer outre à la contrainte verticale. Pour pouvoir se déplacer aisément sur le substrat végétal les fourmis doivent posséder une adhérence suffisante. Le genre *Pachycondyla* illustre bien cette adaptation. Il s'agit d'un genre de fourmi dans lequel les espèces arboricoles possèdent toutes sous leurs tarsi des pelotes adhésives bien développées qui leur confèrent une bonne adhérence aux surfaces lisses des feuilles [41]. Mais la contrainte du déplacement n'est pas le seul obstacle induit par la vie arboricole. Les espèces aux mœurs prédatrices doivent avoir la capacité d'immobiliser rapidement leurs proies afin que ces dernières ne s'échappent en se laissant tomber de la végétation. Certaines espèces ont donc développé des adaptations éthologiques comme les *Allomerus* qui construisent des pièges pour immobiliser leurs proies. Les espèces arboricoles du genre *Pachycondyla* n'ont quant à elles pas développé d'adaptations comportementales pour la capture de leurs proies. Toutefois il semblerait que le venin des espèces arboricoles soit plus toxique que celui de leurs consœurs terrestres même si l'ensemble des espèces de *Pachycondyla* étudiées ont des venins qui paralysent rapidement leurs proies [42]. Des observations similaires ont été faites pour les araignées chez lesquelles les espèces arboricoles ou vivant dans une végétation haute semblent posséder des venins plus neurotoxiques que les espèces terricoles ou construisant des toiles [43].

Une comparaison par analyse biochimique des venins des fourmis arboricoles et terrestres du genre *Pachycondyla* pourrait donc permettre d'isoler une ou plusieurs classes de toxines responsables de la différence de neurotoxicité observée.

Sous-famille	Genre
Ponerinae	<i>Pachycondyla</i>
	<i>Odontomachus</i>
	<i>Platythrea</i>
	<i>Leptogenys</i>
	<i>Diacamma</i>
Paraponerinae	<i>Paraponera</i>
Ectatomminae	<i>Ectatomma</i>
	<i>Gnamptogenys</i>
Myrmeciinae	<i>Myrmecia</i>
Myrmicinae	<i>Pogonomyrmex</i>
	<i>Solenopsis</i>
Pseudomyrmeciinae	<i>Pseudomyrmex</i>
	<i>Tetraaponera</i>
Ecitoninae	<i>Eciton</i>

Table 1. Liste des sous-familles et des genres de fourmis étudiés

5. Objectifs de l'étude

L'étude menée dans le cadre du stage s'inscrit dans un projet collaboratif (2010-2013) entre VenomeTech et l'UMR EcoFoG de Guyane (www.ecofog.gf/) dans le cadre d'un programme interdisciplinaire de valorisation des substances naturelles Amazoniennes (Financement CNRS / Région Guyane / FEDER). Ce projet constitue l'une des plus importantes études biochimiques et pharmacologiques entreprises sur les venins de fourmis à ce jour. Dans la première partie de l'étude, nous avons analysé 107 échantillons de venins de fourmis du genre *Pachycondyla* incluant 9 espèces différentes ; *Pachycondyla goeldii*, *Pachycondyla stigma*, *Pachycondyla unidentata*, *Pachycondyla mesonotalis*, *Pachycondyla obscuricornis*, *Pachycondyla crenata*, *Pachycondyla inversa*, *Pachycondyla harpax*, *Pachycondyla constricta*. Le premier objectif du stage était de tester l'applicabilité d'une méthode de chimiotaxonomie basée sur les profils peptidiques des venins et de comparer des venins en fonction du mode de nidification des espèces. La seconde partie du stage a étendu le travail à la caractérisation biochimique et structurale des peptides des venins de *Pachycondyla goeldii*, *Pachycondyla harpax*, *Pachycondyla unidentata* et *Pachycondyla constricta*. Une extension de cette étude à d'autres sous-familles de fourmis (Table 1) a été entreprise avec comme premiers exemples les venins de *Tetraponera sp.* (Pseudomyrmecinae) et d'*Ectatomma tuberculatum* (Ectatomminae). L'ensemble des résultats concernant l'ensemble des sous-familles de fourmis étudiées est trop important et sera présenté dans une publication ultérieure.

6. VenomeTech

La société VenomeTech est une start-up de biotechnologie basée à Sophia-Antipolis qui exploite les peptides issus des venins d'animaux pour développer de nouvelles molécules thérapeutiques. Créée en 2009 par Pierre Escoubas et Nicolas Gilles, VenomeTech compte actuellement 5 personnes : le président et fondateur Pierre Escoubas, Mathieu Leblanc, ingénieur de recherche, et trois stagiaires. En plus de ses propres équipements la société bénéficie d'un accès à des instruments de dernière génération dans le cadre de collaborations avec l'IPMC (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire - CNRS) à Sophia Antipolis, et le CEA de Saclay (Commissariat à l'Energie Atomique). La mission de VenomeTech est d'amener dans un processus de développement de nouvelles molécules dans les domaines de la douleur, du cancer et des maladies du système nerveux central, et la société ambitionne de devenir un leader mondial dans ce domaine. A l'heure actuelle VenomeTech développe deux molécules issues de venin d'araignée (VT001 et VT002) qui sont en phase d'optimisation pour le traitement de la douleur (www.venometech.com).

II. Matériels et méthodes

1. Collecte des échantillons

Les fourmis ont été collectées en Guyane française par Jérôme Orivel et Alain Dejean (UMR EcoFoG). Les sacs à venin ont été disséqués et leur contenu solubilisé dans une solution composée d'acétonitrile (ACN)/eau (H₂O)/acide trifluoroacétique (TFA) (30 :70 :0.1). Chaque échantillon contient le contenu de plusieurs sacs à venins (entre 2 et 20) correspondant à des individus d'une même colonie. Seuls les échantillons individuels correspondent à un seul sac à venin. Après extraction, les échantillons ont été lyophilisés et envoyés à VenomeTech, où ils ont été remis en solution (15 µL ACN/H₂O/TFA 15 :85 :0.1) et stockés à -20°C.

2. Spectrométrie de masse MALDI-TOF et MALDI-TOF/TOF

Un spectromètre de masse est un instrument utilisé pour séparer des molécules en fonction de leur rapport m/z (masse/charge) ce qui permet de déterminer la masse moléculaire des molécules étudiées. Un spectromètre de masse est composé de trois parties; la source dans laquelle les molécules sont chargées (formation d'ions), l'analyseur dans lequel les ions sont séparés en fonction de m/z , et le détecteur. Dans le cas d'un spectromètre de masse MALDI-TOF, la source MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) permet aux molécules de l'échantillon d'être ionisées et de passer en phase gazeuse (désorption) sous l'action d'un laser UV (337 nm). L'ionisation est facilitée par l'adjonction d'un acide organique faible donneur de protons appelé « matrice ». La matrice est co-cristallisée avec l'échantillon, formant un dépôt solide sur le support. Lors d'une irradiation par un laser UV la matrice absorbe l'énergie du laser ce qui permet la désorption (passage d'une phase solide en gazeuse) de l'échantillon et son ionisation (les ions hydrogène libérés par la matrice acide se fixent aux peptides, donnant des molécules chargées). Les peptides ionisés sous forme $[M+H]^+$ sont ensuite accélérés avec une haute énergie cinétique par un champ électrique (20-25 kV) et envoyés dans l'analyseur. L'analyseur TOF (Time-Of-Flight) est le cœur du spectromètre. Il s'agit d'un long tube sous vide poussé dans lequel les ions se déplacent sous l'effet de la phase d'accélération en sortie de source. Pour des ions de charge électrique égale à 1 ($z=1$) leur séparation dépend donc uniquement de leur masse. Les ions ont une vitesse dans l'analyseur qui est inversement proportionnelle à la racine carrée de leur rapport m/z donc le temps que met un ion à traverser le tube de vol pour arriver au détecteur est plus important pour les ions de masses plus importantes. Nous avons utilisé pour ce travail un spectromètre MALDI-TOF Voyager DE-PRO (Applied Biosystems).

	CHCA	SA	DHB	sDHB	CA	FA	THAP
Nom	Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique	Acide sinapinique	Acide 2,5 dihydroxybenzoïque	Acide 2,5 dihydroxybenzoïque + acide 5-methoxysalicylique	Acide caféique	Acide férulique	2,4,6 trihydroxyacetophenone monohydrate
Formule	$C_{10}H_7NO_3$	$C_{11}H_{12}O_5$	$C_7H_6O_4$	$C_7H_6O_4 + C_8H_8O_4$	$C_9H_8O_4$	$C_{10}H_{10}O_4$	$C_8H_8O_4$
Masse molaire	189.2	224.2	154.1	154.1+168.1	180.6	194.2	186.16

Table 2. Matrices MALDI-TOF

Les échantillons bruts de venins ont également été analysés avec un spectromètre MALDI-TOF/TOF 4800 (Applied Biosystems) afin d'obtenir des spectres de fragmentation des peptides majoritaires des venins. Le spectromètre MALDI-TOF/TOF utilise le même principe que le MALDI-TOF mais le système couple deux analyseurs TOF séparés par une cellule de collision. Les ions « parents » sont fragmentés dans cette cellule par collision avec des molécules de gaz, pour produire des ions « enfants ». La fragmentation des peptides génère une information structurale en particulier par la rupture de la liaison peptidique. L'ensemble de ces ruptures pour un même peptide permet de reconstituer sa séquence en calculant les différences de masses entre les ions fragments. Lorsqu'il n'existe aucune base de données génomique ou protéique pour l'espèce étudiée, on parle alors de séquençage « *de novo* ». Cette technique est aujourd'hui une nouvelle approche du séquençage de peptides, et la seule qui permet d'étudier des échantillons de faible abondance comme les venins de fourmis.

3. Préparation des échantillons et optimisation

L'élimination des sels dans les échantillons permet aux peptides de mieux co-cristalliser avec la matrice et améliore la qualité des spectres. Nous avons utilisé un procédé de microchromatographie en phase inverse (Ziptip® C18) pour éliminer les sels. Le Ziptip® est un embout de micro pipette dans lequel une couche de résine greffée avec des chaînes aliphatiques C18 capture les molécules apolaires. Les peptides sont capturés par adsorption sur la résine dans l'embout, puis les sels et autres éléments polaires sont éliminés par des lavages à l'eau. Les peptides sont élués par un solvant apolaire (ACN 50%) puis déposés avec 0.5 µl de matrice sur la cible MALDI.

La matrice est très importante dans les analyses en MALDI-TOF. Elle permet la désorption et l'ionisation des peptides et toutes les matrices ne réagissent pas de la même façon avec les différents peptides. Afin de déterminer quelles matrices sont les plus efficaces pour détecter les peptides des venins de fourmis nous avons testé sept matrices différentes, le CHCA, le SA, le DHB, le sDHB, le CA, le FA et le THAP (Table 2). Le CHCA est préparé à une concentration de 5mg/mL dans 50% ACN/H₂O / 0.1% TFA. Les autres matrices sont en concentration 10 mg/mL ; dans une solution 40% ACN/H₂O / 0.1% TFA pour le SA et le FA; dans une solution 50% ACN/H₂O / 0.1% TFA pour le THAP et le CA et dans une solution 20% ACN/H₂O / 0.1% TFA pour le DHB et le sDHB. Cette étude pilote a été réalisée sur quatre échantillons de venin de trois espèces différentes; *Pachycondyla obscuricornis* (P. obs1 et P. obs2), *P. laevigata* (P. lae) et *P. goeldii* (P. goe). Le nombre de masses détectées ainsi que l'intensité des ions ont été les deux critères principaux de sélection des deux matrices utilisées pour la suite de l'étude. La présence d'ions métalliques parfois présents dans la

verrerie ou dans les solvants peut entraîner en analyse MALDI-TOF des adduits notamment de potassium et de sodium. Ce phénomène crée des masses parasites pouvant être confondues avec celles de peptides et accentue le phénomène de suppression du signal par une compétition pour les protons libérés par la matrice, qui empêche certains peptides d'être ionisés. L'ajout de certains additifs dans les matrices permet de réduire ce phénomène d'adduits. Ainsi l'ajout de 10mM de phosphate d'ammonium et l'ajout de 100mM de sérine ont été décrits comme des méthodes de réduction des adduits [44, 45]. Nous avons donc testé l'effet de ces deux additifs sur les deux matrices choisies, et sur un venin modèle.

Pour des mesures exactes, une calibration de chaque spectre doit être réalisée, en utilisant des peptides « standards » de masses connues, qui servent de référence. Nous avons réalisé pour toutes les mesures des calibrations dites « close external » avec des calibrants déposés sur une position proche de l'échantillon. Le mélange de calibration était composé de : bradykinine (573.31 Da), angiotensine II humaine (1046.54 Da), neurotensine (1672.91 Da), fragment ACTH 18-39 (2465.19 Da) et chaîne B oxydée de l'insuline (3494.65 Da).

4. Chromatographie en phase inverse

Les échantillons ont été fractionnés par chromatographie HPLC en phase inverse avec une colonne Waters Xterra c18 5 μ m (2.1 x 100mm). Le signal était enregistré par un détecteur UV à 215 nm. Nous avons utilisé un gradient de 90 min avec un débit à 0.3ml/min : solvant A H₂O/0.1% TFA et solvant B ACN/ 0.1 % TFA. Gradient de 0 à 5 min en condition isocratique (100% A). De 5 min à 65 min gradient 0-60% de solvant B. De 65min à 75min gradient 60- 90% de solvant B et de 75min à 90 min gradient 90-0% B. Chaque pic observé sur le chromatogramme a été collecté séparément dans un tube afin de caractériser tous les composants du venin.

5. Réduction des ponts disulfure

La réduction des ponts disulfure a été réalisée en mélangeant 2 μ l de venin avec 23 μ l d'une solution 10mM DTT (Dithiothreitol)/ 100mM bicarbonate d'ammonium pH 8. Après 30 min à 56°C l'échantillon a été dessalé par Ziptip®. La réduction d'un pont disulfure résulte dans la liaison de deux hydrogènes sur le peptide (un sur chaque atome de soufre des deux cystéines impliquées dans le pont) ce qui résulte en une augmentation de 2 unités de masse atomique de la

masse du peptide pour chaque pont disulfure réduit, par rapport à la masse du peptide non réduit ($S-S \rightarrow SH + SH$).

6. Bioinformatique

Les spectres obtenus ont été analysés à l'aide du logiciel Data Explorer™ (Applied Biosystems) et les listes de masses ont été exportées et analysées dans Microsoft Office Excel 2007. Les graphiques ont été générés avec le logiciel SigmaPlot 12

échantillon	CHCA		SA		DHB		sDHB		CA		FA		THAP	
	# peptides	*Intensité	# peptides	*intensité	# peptides	*intensité	# peptides	*intensité	# peptides	*intensité	# peptides	*intensité	# peptides	*intensité
P. obs1	50	4508	54	5473	24	5576	53	4877	22	3573	36	29000	31	1062
P. obs2	31	4777	41	5327	32	11000	31	6430	18	4773	36	7894	26	1134
P. lae	21	16000	16	14000	46	5596	42	8833	12	2070	16	15000	21	1695
P. goe	104	4405	119	6087	38	5925	28	5362	27	12000	94	7250	37	4877
moyenne	51.5	7422.5	57.5	7721.75	35	7024.25	38.5	6375.5	19.75	5604	45.5	14786	28.75	2192

Table 3. Nombre de peptides détectés et intensité du pic de base en fonction des différentes matrices testées pour quatre échantillons de venin de *Pachycondyla*.

peptides signifie nombre de peptides

* intensité signifie intensité du pic de base

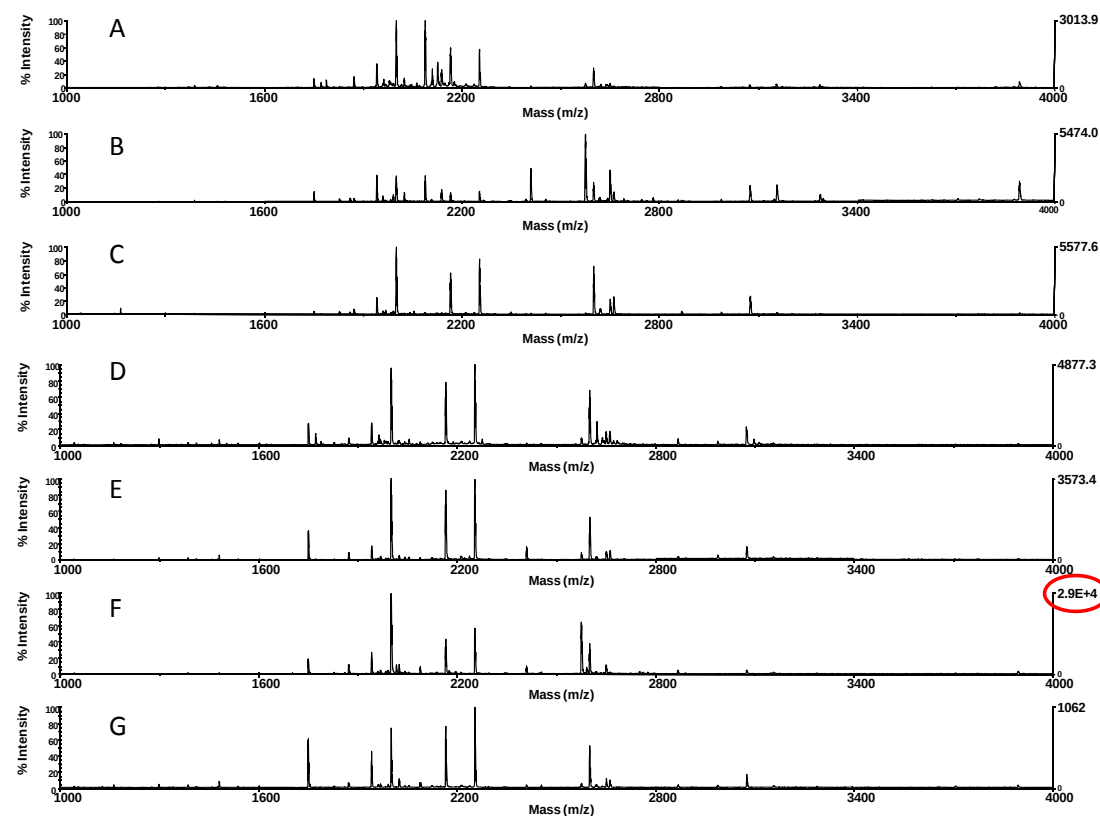


Figure 1. Spectres MALDI-TOF de *Pachycondyla obscuricornis* (Pobs1) avec les sept matrices testées. A) CHCA B) SA C) DHB D) sDHB E) CA F) FA G) THAP

III. Résultats

1. Optimisation

A. Choix de la matrice MALDI

Le CHCA, le SA et le FA sont les matrices qui ont permis en moyenne la détection du plus grand nombre de peptides avec respectivement 51.5, 57.5 et 45.5 peptides pour les quatre échantillons (Table 3). Le CHCA est le plus efficace pour les masses comprises entre 1500 et 2500 Da, alors que les autres matrices vont avoir une gamme de détection décalée (Fig 1). Le DHB et encore plus le sDHB, sont les matrices qui permettent la détection du plus grand nombre de peptides dans la gamme de masse 1000-1500 Da. Le CA et le THAP sont les matrices les moins efficaces avec respectivement 20 et 29 peptides détectés en moyenne. La matrice FA donne les meilleures intensités avec un pic de base d'une intensité moyenne de 14786. Le CHCA et le FA semblent donc être les deux matrices les plus pertinentes pour l'analyse des venins de fourmis. De plus la cristallisation de ces deux matrices est plus homogène que celle des autres matrices testées, ce qui permet d'obtenir de meilleurs résultats en mode automatique. Ces deux matrices ont donc été retenues pour la suite de l'étude.

B. Additifs

L'ajout des additifs Phosphate d'ammonium et Sérine dans les matrices CHCA et FA a clairement amélioré la qualité des spectres en diminuant les adduits sodium et potassium (Annexe 1). La diminution des adduits métalliques permet d'augmenter l'intensité des ions et a même permis de détecter d'autres peptides avec la matrice FA. Toutes les mesures de l'étude ont donc été réalisées en utilisant ces combinaisons matrices/additifs optimisées.

2. Chimiotaxonomie

A. Variation individuelle et intraspécifique

Les profils individuels des venins de 10 fourmis appartenant à une colonie de *P. goeldii* ont été comparés avec celui d'un échantillon regroupant 8 fourmis de cette même colonie (pool). Des variations qualitatives ont pu être observées, et quelques peptides retrouvés dans l'échantillon pool ne sont pas retrouvés dans tous les échantillons individuels. Cependant ces différences ne sont pas très importantes, les profils individuels gardent au minimum 67.4% de similarité avec l'échantillon pool (Fig 2). Les variations quantitatives sont certainement plus importantes et des changements de proportions ont été observés.

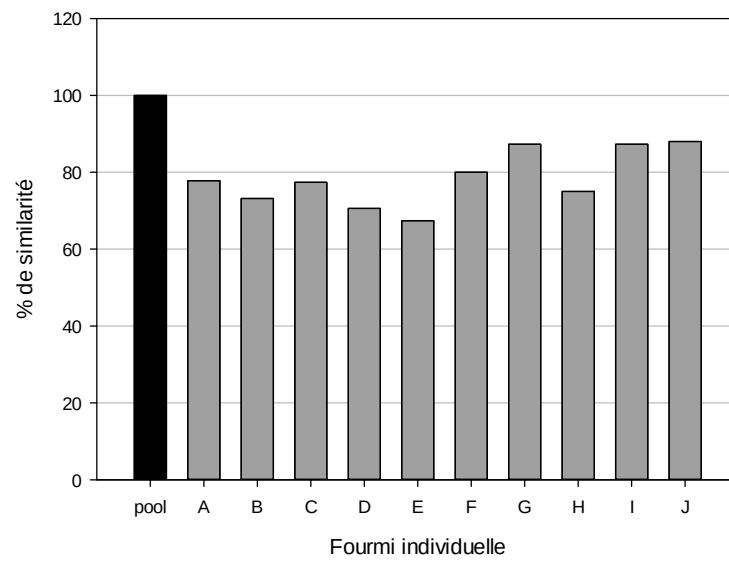


Fig 2. Pourcentage de similarité des échantillons individuels de fourmis d'une colonie de *P. goeldii* avec l'échantillon pool regroupant 8 fourmis de cette même colonie.

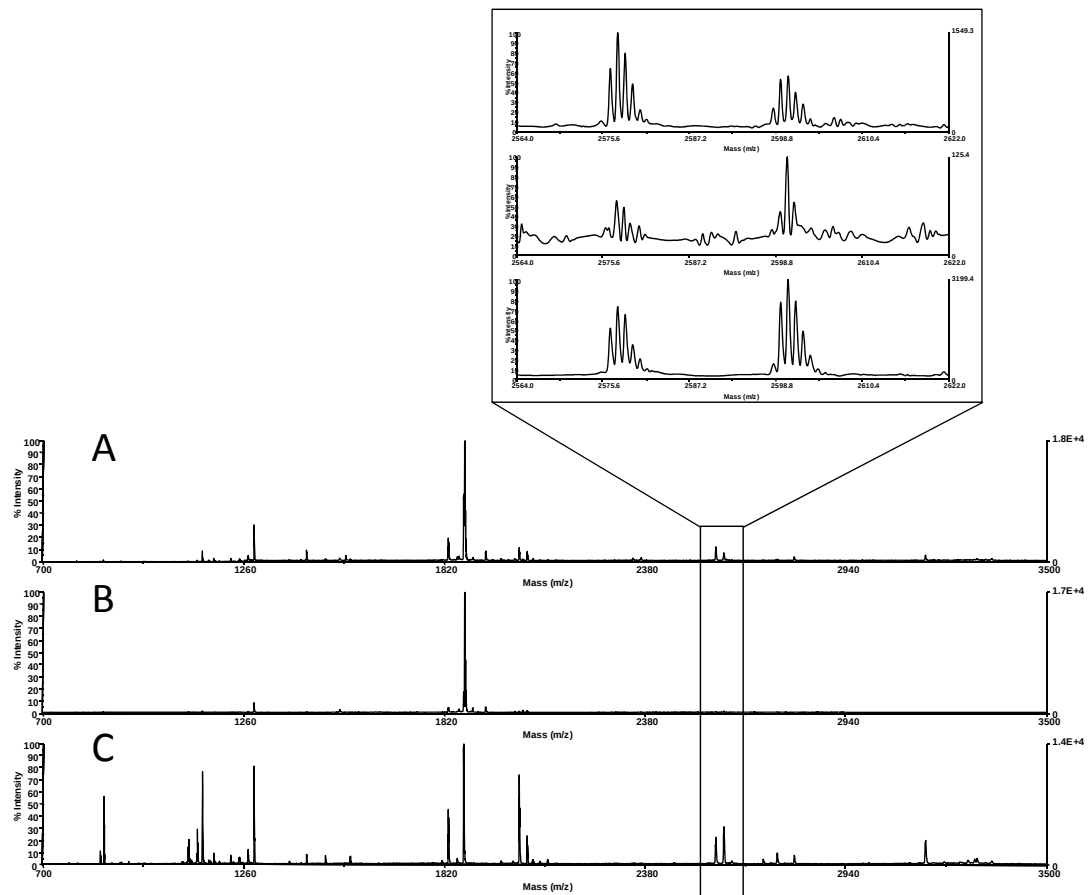


Fig 3. Variation d'intensité des ions pour des échantillons d'une même colonie de *P. goeldii* traduisant des différences quantitatives. A) Pool de 8 fourmis ; B) fourmi individuelle E ; C) fourmi individuelle I.

Il existe en effet des variations d'intensité de certains ions entre les spectres individuels. Ainsi les profils des fourmis C, D, E, G et J montrent seulement 2 ou 3 ions majoritaires, les autres peptides générant des ions minoritaires. Les profils des fourmis A, B, F, H et I montrent par contre une vingtaine d'ions majoritaires. L'échantillon pool de 8 fourmis possède un profil qui est intermédiaire. Ainsi des ions très intenses dans certains profils individuels et qui sont très faibles pour les autres profils ont dans l'échantillon pool des intensités moyennes (Fig 3). Les venins individuels des fourmis d'une colonie de *Pachycondyla goeldii* montrent donc de petites variations qualitatives et d'importantes variations quantitatives. Le regroupement dans un échantillon de plusieurs fourmis d'une colonie permet d'obtenir un profil intermédiaire par rapport aux profils individuels observés et donc une empreinte peptidique plus fiable. L'analyse combinée de plusieurs individus permet donc d'homogénéiser le profil colonial.

L'analyse MALDI-TOF avec la matrice CHCA de chaque échantillon pour toutes les espèces a permis de réaliser une liste de 15 masses caractéristiques (« empreinte peptidique ») pour chaque espèce sauf pour *P. stigma* pour laquelle il n'a pas été possible de trouver plus de 13 masses caractéristiques (Table 4). Les masses caractéristiques ont été choisies en fonction de leur abondance pour les échantillons de chaque espèce. Seuls les échantillons dont l'identification taxonomique était certaine ont été utilisés pour la réalisation de cette liste. Dans les échantillons de chaque espèce on retrouve au minimum 62 % (*P. stigma*) en moyenne de masses caractéristiques de l'espèce. Dans les échantillons de *P. mesonotalis* ce pourcentage atteint les 100% c'est-à-dire que l'on retrouve dans tous les échantillons de *P. mesonotalis* les 15 masses caractéristiques de l'espèce. (Fig 4). On retrouve chez *P. goeldii*, *P. obscuricornis*, *P. unidentata*, *P. inversa*, *P. crenata*, *P. harpax* et *P. constricta* respectivement 91%, 76%, 83%, 68%, 87%, 71% et 80% en moyenne des masses caractéristiques de leur espèce.

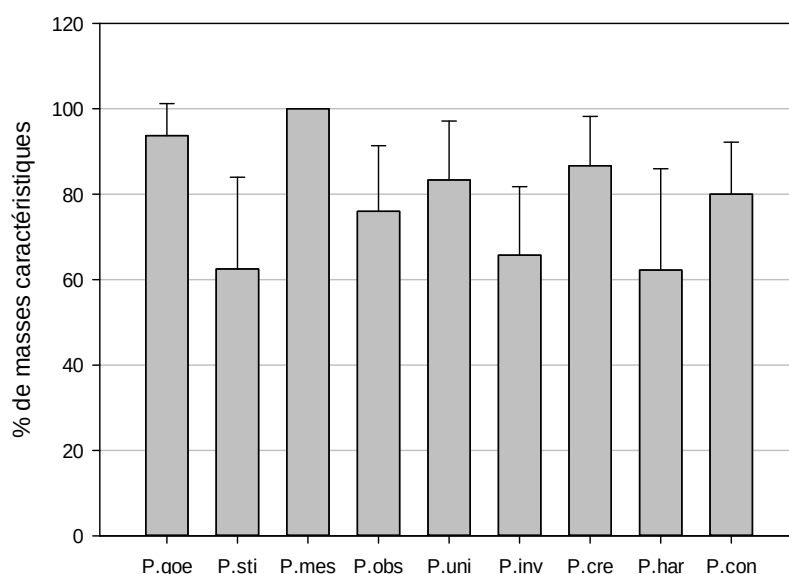


Fig 4. Pourcentage moyen des masses caractéristiques retrouvées dans les différents échantillons de chaque espèce.

P. sti	P. goe	P. uni	P. mes	P. obs	P. cre	P. inv	P. har	P. con
1004.56	869.50	1074.59	1134.61	1982.84	1200.50	673.33	1293.82	1728.04
1087.63	1104.70	1202.83	1244.70	1999.13	1227.56	1533.88	1348.82	1926.16
1103.65	1106.71	1228.46	1605.95	2023.45	1244.53	2043.29	1545.95	1939.20
1130.66	1128.47	1244.70	1681.97	2045.45	1359.64	2067.25	1838.20	1961.16
1210.61	1130.68	1533.88	2031.99	2122.32	1384.66	2532.67	1863.89	2074.25
1288.66	1144.70	2029.25	2048.25	2147.61	1401.63	2590.68	1880.22	2096.22
1298.69	1244.68	2581.34	2135.34	2163.89	1780.00	2725.36	2807.47	2247.26
1320.69	1272.43	2634.47	2223.36	2186.33	1939.18	2728.25	2822.70	2269.17
1336.77	1288.69	2791.64	2384.35	2210.17	2045.91	2895.45	2849.20	2645.59
1381.66	1831.91	2850.44	2557.54	2235.89	2063.88	2909.40	2858.70	2694.54
3098.66	1874.92	2977.50	2904.54	2252.30	2143.94	2925.75	2872.71	2714.43
3112.60	1879.93	3320.88	3072.48	2599.79	2160.86	3205.91	3300.99	2722.47
3388.20	2029.27	3332.91	3088.83	2649.73	2759.12	3292.83	3535.16	2752.62
-	2863.81	3381.38	3238.96	3073.77	3310.16	3332.96	3599.90	2839.38
-	3107.87	4437.79	3631.79	3893.73	3437.29	3339.11	4349.54	3064.84

Table 4. Liste des masses caractéristiques des 9 espèces du genre *Pachycondyla*. *Pachycondyla stigma* (P. sti), *Pachycondyla goeldii* (P. goe), *Pachycondyla unidentata* (P. uni), *Pachycondyla mesonotalis* (P. mes), *Pachycondyla obscuricornis* (P. obs), *Pachycondyla crenata* (P. cre), *Pachycondyla inversa* (P. inv), *Pachycondyla harpax* (P. har) et *Pachycondyla constricta* (P. con).

P. ???	P. con	P. har	P. ???	P. con	P. har
-	-	1293.82	<u>2694.60</u>	<u>2694.54</u>	-
-	-	1348.82	<u>2714.46</u>	<u>2714.43</u>	-
-	-	1545.95	<u>2722.68</u>	<u>2722.47</u>	-
<u>1728.09</u>	<u>1728.04</u>	-	<u>2752.66</u>	<u>2752.62</u>	-
-	-	1838.20	-	-	2807.47
-	-	1863.89	-	-	2822.70
-	-	1880.22	-	2839.37	-
	1926.16	-	-	-	2849.20
<u>1939.26</u>	<u>1939.20</u>	-	-	-	2858.70
-	1961.16	-	-	-	2872.71
-	2074.25	-	<u>3064.87</u>	<u>3064.84</u>	-
-	2096.22	-	-	-	3300.99
<u>2247.31</u>	<u>2247.26</u>	-	-	-	3534.41
-	2269.17	-	-	-	3599.90
<u>2645.63</u>	<u>2645.59</u>	-	-	-	4349.54
			60% 0%		

Table 5. Comparaison des masses d'un échantillon de détermination incertaine identifié comme *P. harpax* avec la liste de masses caractéristiques de *P. harpax* et *P. constricta*. Les masses soulignées sont les masses communes avec l'échantillon non déterminé.

B. Variation interspécifique

Afin d'utiliser la liste caractéristique des 15 masses comme empreinte spécifique de chaque espèce il est nécessaire que les 15 masses marqueurs ne soit pas partagées par les autres espèces ou au moins suffisamment peu pour discriminer les espèces. En comparant tous les échantillons avec la liste caractéristique de *P. goeldii* on remarque que le pourcentage moyen d'ions marqueurs de *P. goeldii* retrouvé dans les échantillons des autres espèces n'excède pas 14% (*P. mesonotalis*) alors qu'il atteint 90% avec les échantillons de *P. goeldii* (Fig 5). Il convient également de noter que les espèces *P. obscuricornis*, *P. inversa*, *P. harpax* et *P. constricta* ne partagent aucun peptide commun avec *P. goeldii* (Annexe 2 : Spectres MALDI-TOF typiques des 9 espèces de *Pachycondyla*). On retrouve des résultats similaires avec la liste caractéristique des 9 espèces (Annexes 3 et 4). La liste caractéristique de chaque espèce est donc clairement plus proche des échantillons de son espèce que des échantillons des autres espèces.

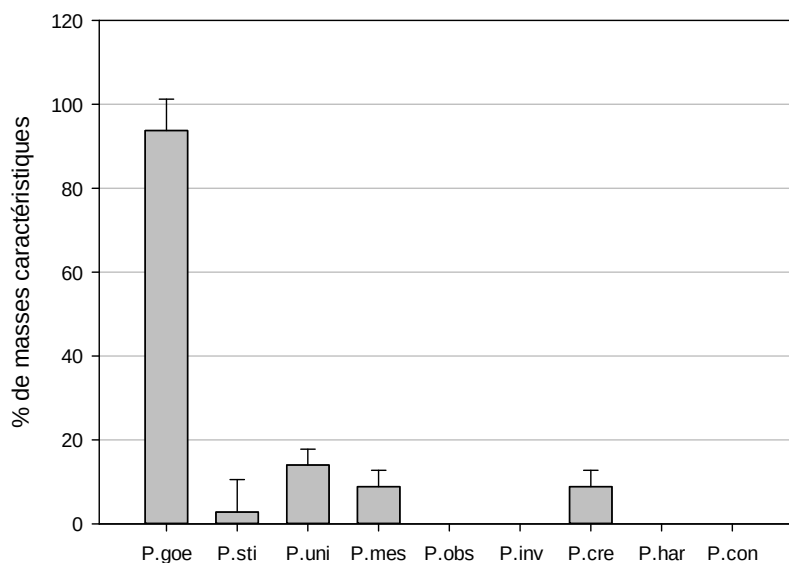


Fig 5. Pourcentage moyen de masses caractéristiques de *P. goeldii* trouvées dans les échantillons de *P. goeldii* et des 9 autres espèces.

C. Validation taxonomique

Certains échantillons de venin de *Pachycondyla* n'étaient pas identifiés de façon certaine par l'examen de leur morphologie, et n'ont pas été utilisés pour la réalisation de la liste des masses caractéristique de chaque espèce. Cependant ces échantillons sont devenus un matériel de choix pour tester la méthode de chimiotaxonomie mise au point précédemment. Nous avons ainsi

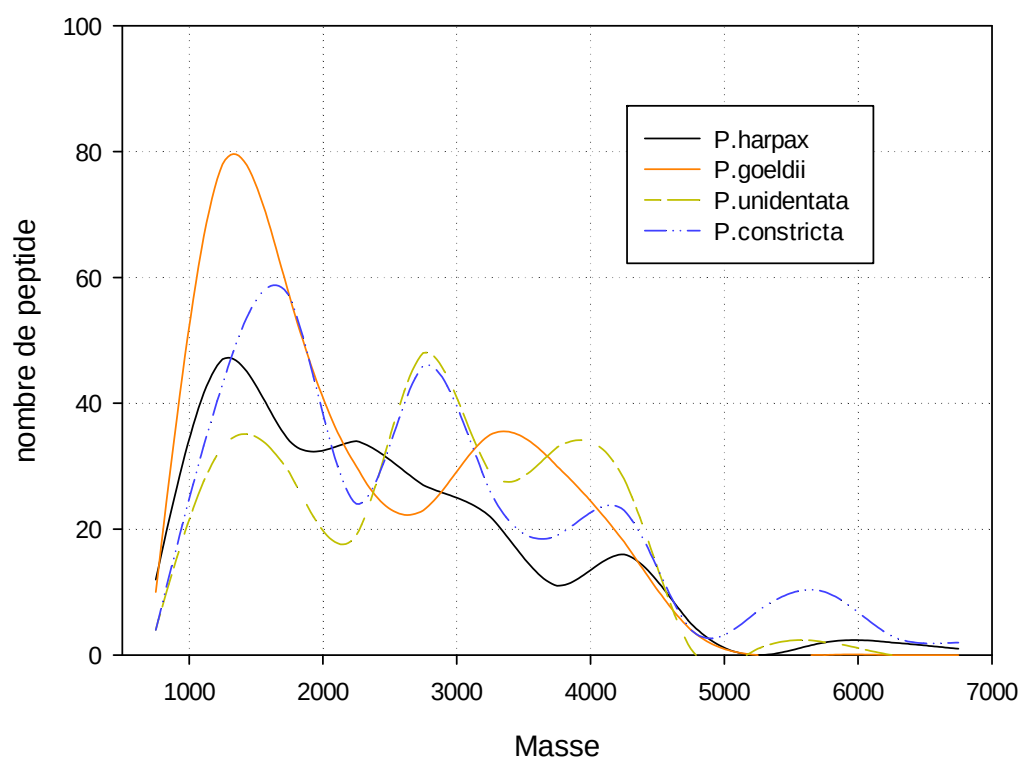


Fig 7. Nombre de peptides du venin de quatre espèces de *Pachycondyla* en fonction de leur masse.

comparé les ions marqueurs des échantillons inconnus avec les listes de référence des 9 espèces de *Pachycondyla*, afin d'identifier ces échantillons. Nous présentons ici les résultats pour un échantillon identifié de façon incertaine par analyse morphologique comme étant *P. harpax*. Cependant, l'identification biochimique basée sur les profils peptidiques ne confirme pas cette espèce comme une *P. harpax* puisqu'aucune des masses marqueurs de *P. harpax* n'est retrouvée parmi les masses de l'échantillon. Par contre 9 masses marqueurs sur 15 caractéristiques de *P. constricta* sont retrouvées, soit 60% (Table 5). La comparaison des spectres MALDI-TOF de *P. harpax*, *P. constricta* avec celui de l'échantillon inconnu confirme le résultat obtenu à l'aide des masses caractéristiques (Annexe 5). De cette manière 9 échantillons ont été réidentifiés avec succès par cette méthode.

3. Caractérisation de la composition peptidique

A. Distribution des peptides

La fragmentation des venins bruts par chromatographie HPLC en phase inverse du venin de quatre espèces, *P. goeldii*, *P. constricta*, *P. harpax*, *P. unidentata* et l'analyse par spectrométrie de masse de chacune des fractions a permis de détecter 286 masses différentes pour *P. goeldii*, 281 pour *P. constricta*, 217 pour *P. harpax* et 253 pour *P. unidentata* (profils HPLC des venins brut en Annexe 6). La répartition des masses de *P. goeldii* suit une distribution bimodale avec un grand nombre de peptides dans deux classes de masse, 1000-2000 Da et 2500-4000 Da. Les distributions des peptides de *P. unidentata* et de *P. constricta* se ressemblent beaucoup et partagent un grand nombre de peptides dans trois gammes de masse, 1000-2000 Da, 2000-3500 Da et 3500-4500 Da. Le venin de *P. constricta* montre également des masses au delà de 5000 Da. Les masses de *P. harpax* se concentrent plutôt dans les gammes 1000-2000 Da et 3500-4500 Da. La répartition des masses de ces peptides (Fig 7) montre un nombre important de petits peptides pour ces quatre espèces, avec des masses comprises entre 1000 et 2000 Da. Les venins de *P. harpax*, *P. constricta* et *P. unidentata* possèdent un nombre important de peptides de masses comprises entre 3500 et 4500 Da alors que *P. goeldii* possède davantage de peptides dans la gamme comprise entre 2500-4000 Da. *P. unidentata* et *P. harpax* possèdent également un grand nombre de peptides de masses 2000 et 3500 Da. *P. constricta* est la seule espèce à montrer un nombre important de peptides de masses comprises entre 5000 et 6000 Da.

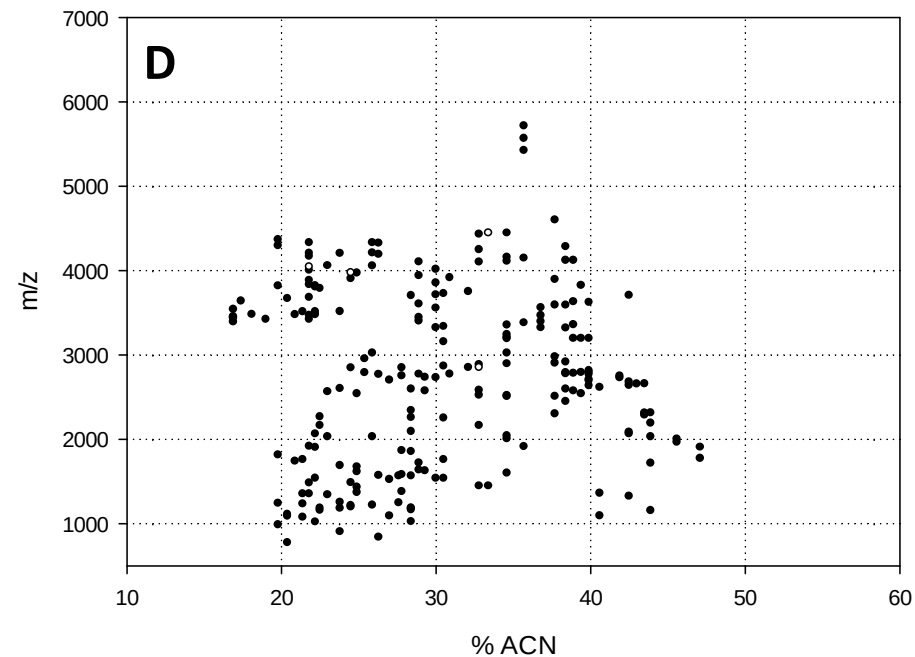
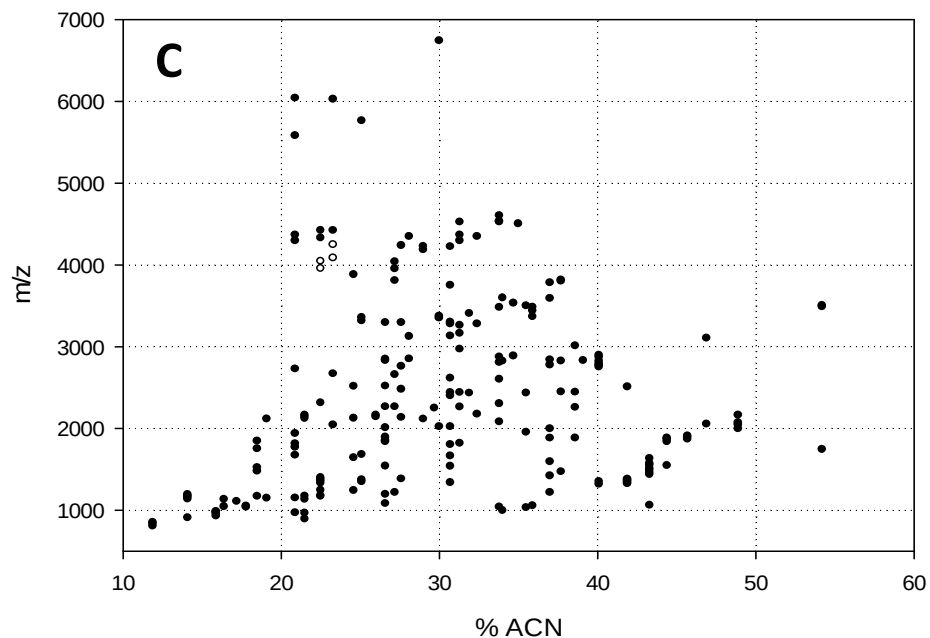
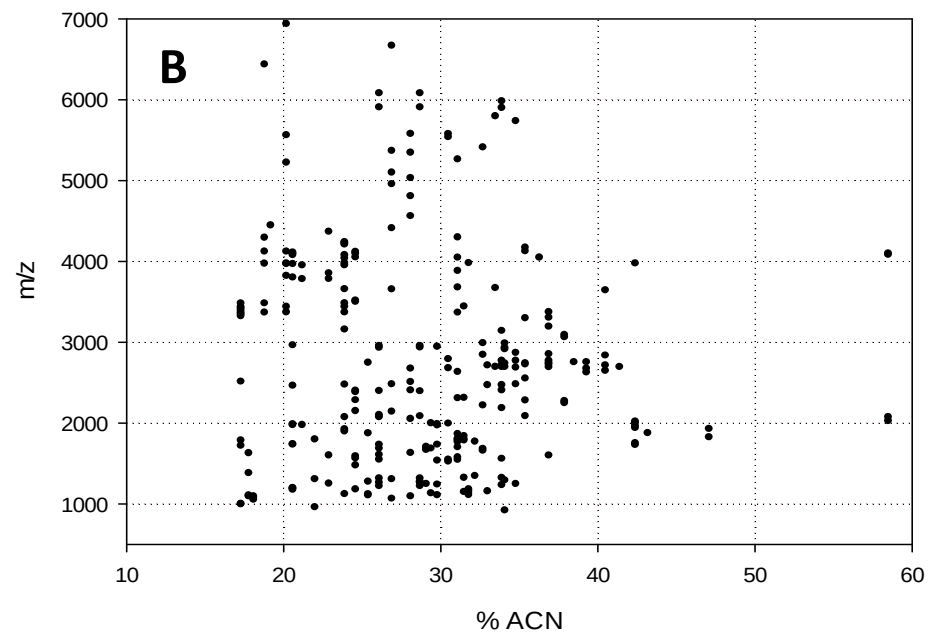
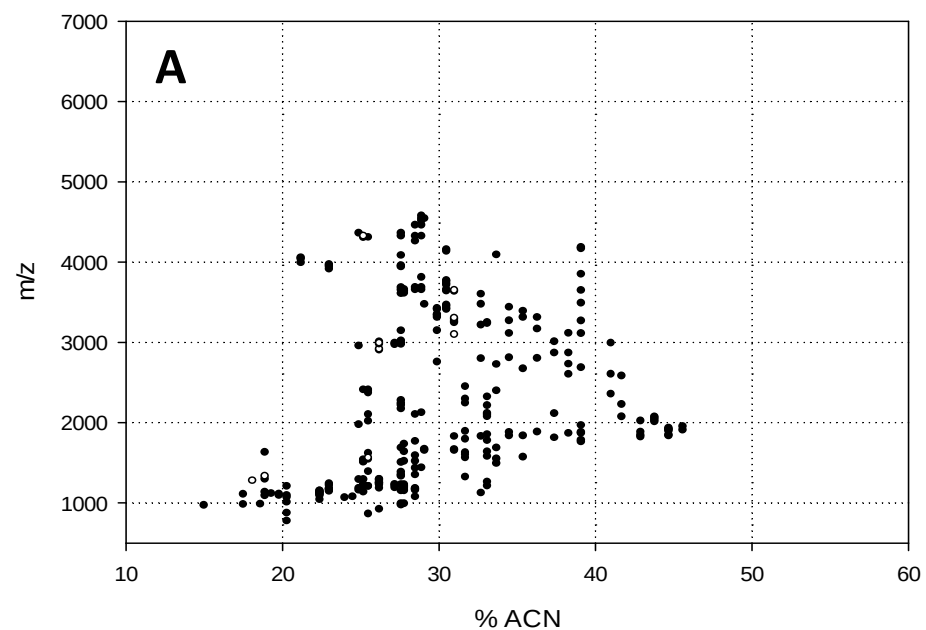


Fig 8. « Landscapes 2D » de quatre espèces de *Pachycondyla*. A) *P. goeldii*. B) *P. constricta*. C) *P. harpax*. D) *P. unidentata*. Les points blancs sont les peptides pour lesquels la présence de ponts disulfure a été montrée par réduction chimique.

Le « landscape 2D » est la représentation de la répartition des masses des peptides en fonction de leur hydrophobicité, nommée par homologie aux « venom landscapes » précédemment décrits pour les venins d'araignées [2]. Lors de l'élution, plus le pourcentage d'acétonitrile est important, plus le peptide est hydrophobe. Les landscapes 2D nous apportent donc ainsi des informations structurales sur les peptides notamment une indication sur leur taille (masse) et sur leur hydrophobicité (%ACN). Les expériences de réduction chimique de quelques fractions complètent ces informations structurales par une indication de la présence et du nombre de ponts disulfure. Les landscapes 2D des venins des quatre espèces (Fig 8) ne montrent pas distinctement de groupes de peptides qui correspondraient à des familles de toxines différentes. Cependant trois zones concentrent davantage de peptides pour les quatre espèces étudiées, et à un degré moindre pour *P. harpax*. On distingue un groupe de peptides de masses comprises entre 1000 et 2000 Da très hydrophiles puisqu'ils éluent entre 15 et 30% d'ACN. Quelques peptides structurés par un pont disulfure unique ont été trouvés dans ce groupe de peptides dans le venin de *P. goeldii*. Le deuxième groupe comprend des peptides de masses comprises entre 3500 et 4500 Da plutôt hydrophiles qui sont élués par 15 à 30 % d'ACN. Nous avons pu montrer par ailleurs que certains de ces peptides sont structurés par un à trois ponts disulfure. Le troisième groupe correspond à des peptides de masses comprises entre 2000 et 3500 Da, assez hydrophobes et éluant en HPLC entre 30 et 45% d'ACN. Certaines de ces masses dans le venin de *P. goeldii* correspondent aux masses des ponerocines qui ont été isolées et caractérisées par LC-MS dans le venin de *P. goeldii* [38] (Table 6).

Ponerocines	MH calculé	CHCA	FA
		MH mesuré	MH mesuré
G1	3212.76	-	-
G2	3306.88	-	-
G3	3381.89	3382.25	3382.10
G4	3163.67	-	-
G5	3107.78	3107.76	3107.67
G6	1818.19	1818.17	1818.26
G7	1876.19	-	-
L1	2594.62	2594.75	2594.48
L2	2576.67	2576.70	2576.62
W1	2709.68	-	2709.65
W2	2709.68	-	-
W3	2863.77	2863.82	2863.74
W4	2851.67	-	-
W5	2599.58	2599.61	2599.71
W6	2029.25	2029.26	2029.29

Table 6. Liste de ponerocines trouvées chez *P. goeldii* par LC-MS (Orivel 2001) et masses correspondantes mesurées dans nos échantillons de *P. goeldii*.

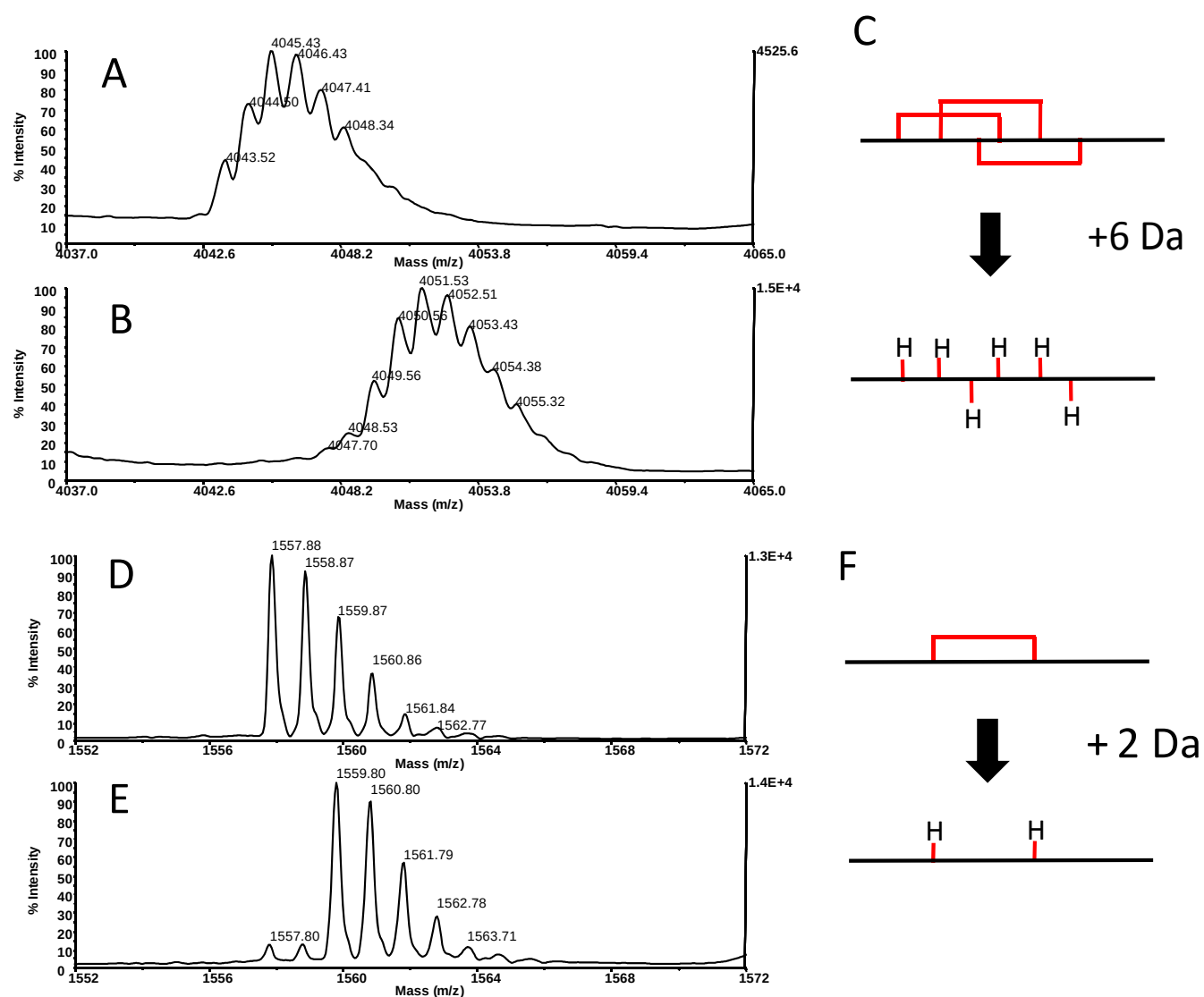


Fig 10. Spectres MALDI-TOF avec la matrice FA de deux fractions du venin de *Pachycondyla unidentata* et de *Pachycondyla goeldii* après réduction par le DTT. A) Fraction non réduite de *P. unidentata* B) Fraction réduite de *P. unidentata*. C) Schéma de la réduction d'un peptide à trois ponts disulfures. D) Fraction non réduite de *P. goeldii* E) Fraction réduite de *P. goeldii*. F) Schéma de la réduction d'un peptide à un pont disulfure.

B. Variation écologique

Sur les quatre espèces de *Pachycondyla* analysées par LC-MS, *P. goeldii* et *P. unidentata* ont un mode de vie arboricole alors que *P. constricta* et *P. harpax* sont strictement terricoles. La comparaison de la répartition des peptides par classes de masses selon le mode de vie arboricole ou terricole montre peu de différences (Fig 9). Les deux espèces arboricoles n'ont plus de peptides que les deux espèces terricoles que dans la gamme de masse 3500-4500 Da avec 48 et 61 peptides respectivement pour *P. goeldii* et *P. unidentata* alors que *P. constricta* et *P. harpax* ont 42 et 27 peptides. On remarque également que ce sont les espèces terricoles qui possèdent toujours plus de peptides dans les gammes de masses 4500-5500 Da et 5500-6500 Da.

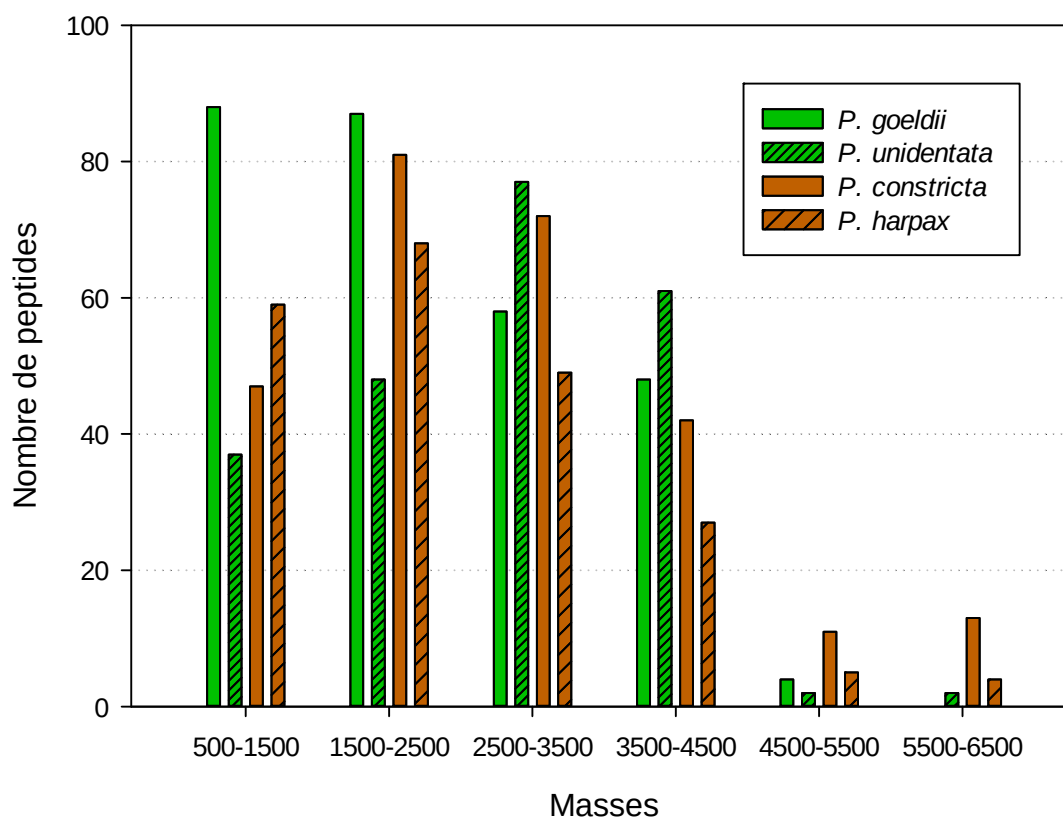


Figure 9. Comparaison du nombre de peptides par classe de masses pour *P. goeldii*, *P. unidentata*, *P. constricta* et *P. harpax*. Les espèces aux mœurs arboricoles sont en vert et les espèces aux mœurs terricoles sont en marron.

C. Etude structurale

La réduction chimique de certaines fractions permet de mettre en évidence les peptides structurés par des ponts disulfure. La comparaison des fractions non réduites avec les fractions

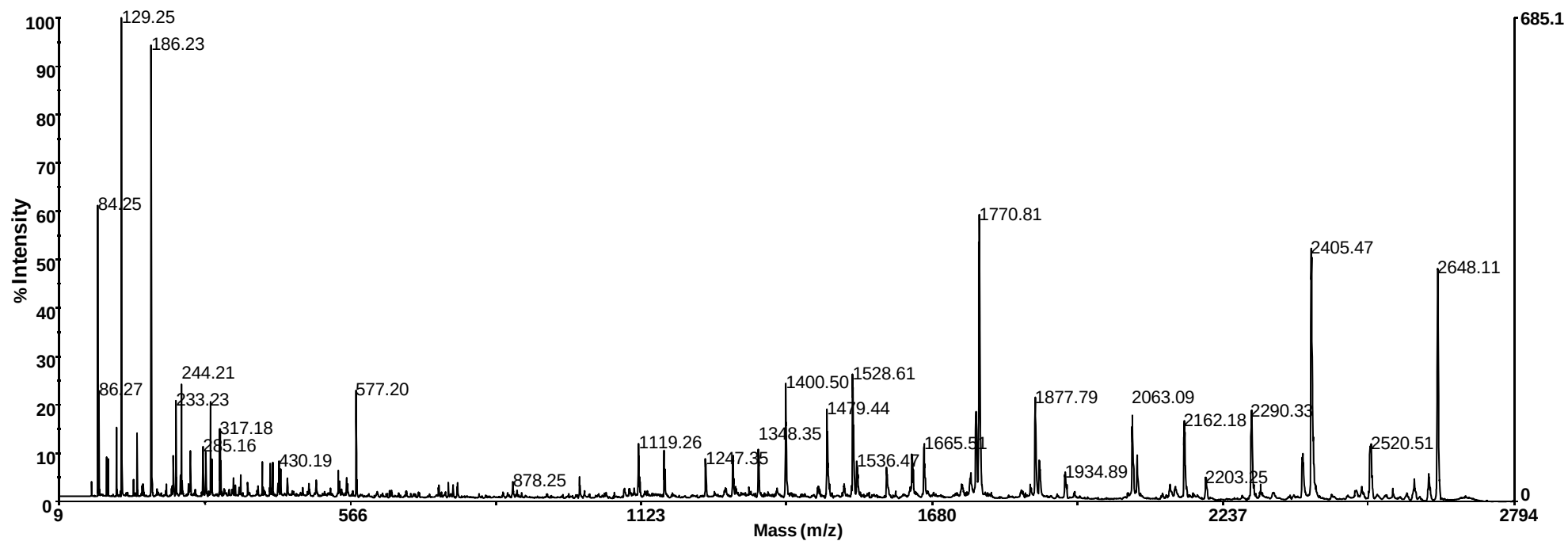


Figure 11. Spectre de fragmentation MS/MS par MALDI-TOF/TOF d'un peptide de 2646.44 Da du venin de *Pachycondyla goeldii*.

réduites a montré pour certains peptides un gain de masse de 6 Dalton ce qui correspond donc à 3 ponts disulfure (Fig 10, A, B, C) et un gain de 2 Dalton pour d'autres peptides, ce qui indique la présence d'un seul pont disulfure (Fig 10, D, E, F).

Les fractions réduites de *P. constricta* n'ont pas permis de trouver des peptides structurés par des ponts disulfure mais dans les trois autres venins, six peptides avec trois ponts disulfures ont été mis en évidence. Nous avons trouvé trois peptides avec trois ponts disulfure chez *P. unidentata* avec des masses de 4434.24 Da, 4043.50 Da et 3974.59 Da. Deux ont été trouvés chez *P. harpax* avec des masses de 4041.76 Da et 3954.83 Da et un peptide de 4317.10 Da avec trois ponts a été trouvé chez *P. goeldii*.

Nous avons trouvé huit peptides possédant un pont disulfure. Ces peptides structurés par un pont ont des masses de 2849.93 Da chez *P. unidentata*, 4086.43 Da et 4248.45 Da chez *P. harpax* et 1274.70 Da, 1331.66 Da, 1557.78 Da, 2914.55 Da et 2987.53 Da chez *P. goeldii*.

Les venins de *Pachycondyla* possèdent donc des peptides structurés par 1 et 3 ponts disulfure. Les six peptides avec 3 ponts disulfure se situent tous dans une gamme de masse 3900-4500 Da alors que les huit peptides avec un pont disulfure unique se situent plutôt dans une gamme de masse plus étendue de 1200-4300 Da.

Le séquençage *de novo* de certains peptides des venins de fourmis peut apporter des informations sur les structures primaires de ces peptides. Nous avons obtenu 450 spectres de fragmentation en MALDI-TOF/TOF (Fig. 11) mais la complexité de l'analyse individuelle de ces spectres ne nous a pas permis de procéder à leur analyse complète dans le temps imparti à cette étude.

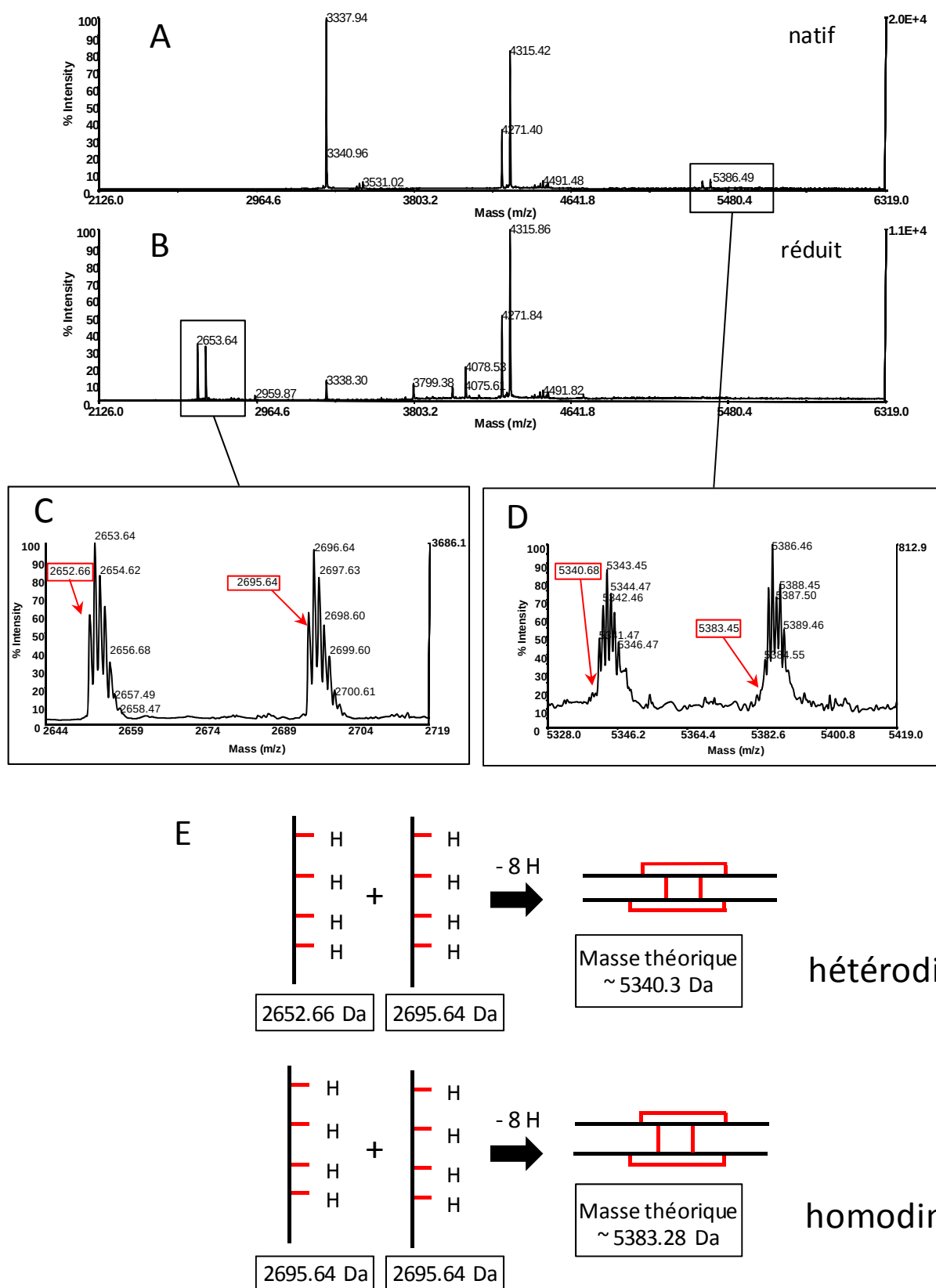


Fig 12. Spectres MALDI-TOF du venin de *Tetraponera* sp (matrice FA). A) Echantillon non réduit. B) Echantillon réduit par le DTT. On observe suite à la réduction des ponts disulfure la disparition des peptides à 5339.68 et 5382.45 Da et l'apparition des peptides à 2652.66 et 2695.64 Da. C) Détermination des masses monoisotopiques des deux principaux peptides apparus. D) Détermination des masses monoisotopiques des peptides disparus. E) Test de l'hypothèse de deux peptides dimériques possédant chacun quatre ponts disulfure.

L'extension de l'étude à d'autres espèces de fourmis appartenant à d'autres sous-familles que celle des ponerinae nous a conduit à analyser les deux espèces *Tetraponera sp* (pseudomyrmeceinae) et *Ectatomma tuberculatum* (ectatomminae). Les résultats concernant les autres sous-familles sont trop importants et ne sont pas présentés dans cette étude. La réduction du venin *Tetraponera sp* fait disparaître deux masses de 5340.3 et 5383.28 Da et fait apparaître plusieurs masses, principalement 2652.66 Da, 2695.64 Da et également 3797.39 Da, 4005.51 Da, et 4075.60 Da. L'addition des masses des peptides 2652.66 Da avec 2695.64 Da et de 2695.64 Da avec 2695.64 Da donne deux masses similaires à 8 Da près aux masses détectées à 5340.68 Da et 5383.45 Da ce qui correspond à la présence de 4 ponts disulfure (Fig 12). Ces observations laissent supposer que les deux masses qui disparaissent indiquent la présence de deux peptides dimériques réticulés par quatre ponts disulfure et composés de deux chaînes de longueur similaire reliées entre elles par des ponts disulfure intercaténaires. Cette hypothèse est confirmée par l'apparition de deux ions de masses correspondant aux chaînes individuelles.

Le profil d'*Ectatomma tuberculatum* montre une majorité de peptides compris entre 4000 et 6000 Da et quelques peptides à 8000 Da environ. La réduction de ce venin provoque la disparition de la quasi totalité des masses du venin natif et l'apparition d'une multitude de masses comprises entre 1000 et 4000 Da (Fig 13). Cette observation laisse donc supposer que le venin de cette espèce est principalement composé de peptides dimériques, dont la réduction génère ces différences de profils.

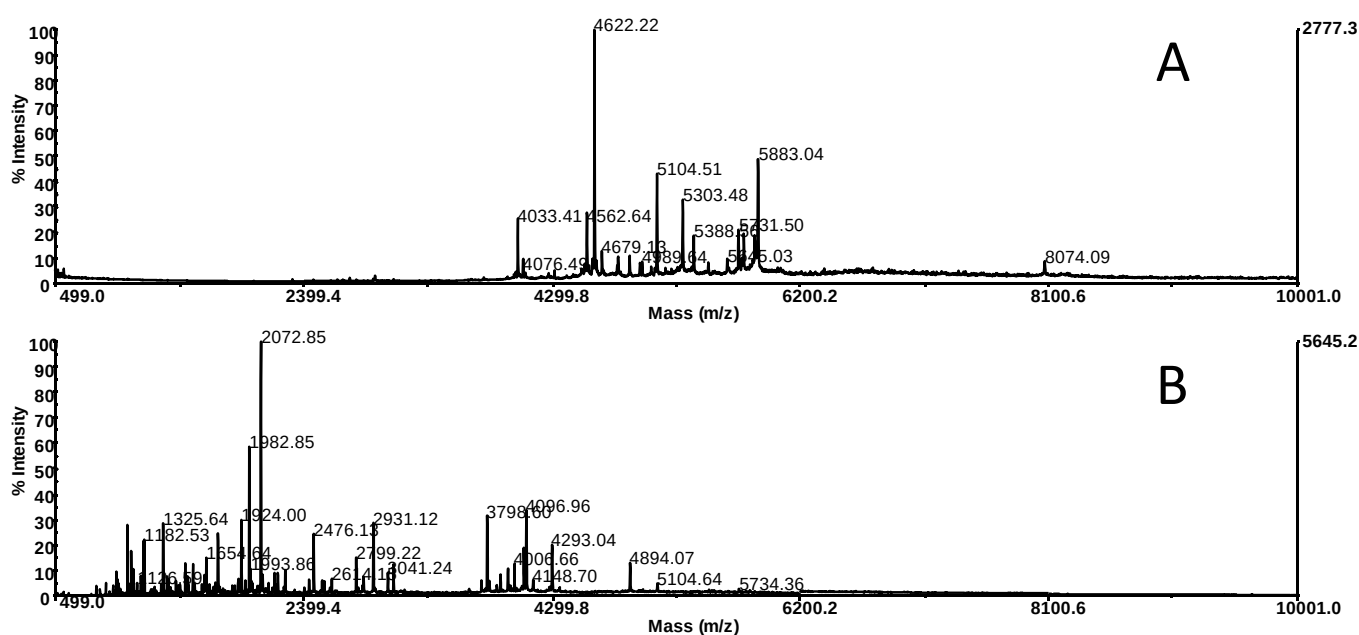


Fig 13. Spectre MALDI-TOF du venin d'*Ectatomma tuberculatum* (matrice FA). A) Echantillon non réduit. B) Echantillon réduit par le DTT. La réduction provoque la disparition des masses entre 4033 Da et 5883 Da et l'apparition de masses entre 1000 Da et 4000 Da.

IV. Discussion

L'optimisation de l'analyse des peptides des venins de fourmis par spectrométrie de masse MALDI-TOF nous a permis de sélectionner deux formulations originales de matrice; le CHCA avec du phosphate d'ammonium et le FA avec de la sérine. Les peptides de venin de fourmis requièrent visiblement une préparation d'échantillon un peu différente des conditions standard, afin d'obtenir de meilleurs signaux. Le CHCA est l'une des matrices les plus utilisées en analyse MALDI-TOF cependant son association avec du phosphate d'ammonium pour réduire les ions métalliques n'est pas courante. Cette combinaison est bien adaptée à l'analyse des venins bruts de *ponerinae* et permet d'obtenir une bonne détection des peptides présents dans le venin, dans une large gamme de masse. Le FA est une matrice très peu utilisée et son association avec la sérine n'a pas été décrite auparavant. Cette combinaison originale permet d'obtenir des spectres de venin de très bonne qualité avec des intensités très élevées et dans une gamme de masse assez complémentaire de celle couverte par la matrice CHCA. Cette combinaison semble très bien adaptée pour des échantillons contenant peu de matériel comme c'est le cas pour les venins de fourmis. Ces deux méthodes, fruit d'une optimisation rationnelle de la préparation des venins de fourmis, nous ont permis d'obtenir de façon reproductible le maximum d'information à partir des venins étudiés, en permettant de générer des spectres de très haute qualité.

Nous avons développé une nouvelle méthode de chimiotaxonomie des fourmis basée sur les profils peptidiques des venins. Une liste de 15 peptides caractéristiques des venins de chaque espèce, utilisée comme une empreinte chimique, est suffisante pour pouvoir discriminer des espèces génétiquement proches comme celles appartenant au genre *Pachycondyla*. Bien que toutes les espèces de fourmis ne possèdent pas de venin ou n'aient pas un venin de composition peptidique cette nouvelle méthode d'identification pourrait être appliquée à plusieurs milliers d'espèces dont l'identification morphologique est souvent délicate. Il s'agit d'une méthode fiable et reproductible car les faibles variations qualitatives des peptides entre les colonies d'une même espèce permettent aisément de discriminer les différents échantillons appartenant à des espèces différentes. Le venin d'une seule fourmi est en quantité suffisante pour pouvoir générer un spectre MALDI-TOF mais il est néanmoins nécessaire de regrouper le venin de plusieurs individus d'une colonie afin d'homogénéiser le profil colonial. En effet si les profils individuels montrent peu de variations qualitatives, ils sont cependant sujets à des variations quantitatives des différents composants du venin entre les individus d'une même colonie. Ces variations peuvent s'expliquer par des différences génétiques entre individus ou par les différences de fonction occupées par les fourmis dans la colonie. Chez les *Pachycondyla* comme chez la plupart des fourmis les tâches

allouées à chaque individu sont réparties en fonction de l'âge [46]. Les fourmis jeunes restent confinées à l'intérieur du nid pour s'occuper du couvain alors que les fourmis plus âgées prennent davantage de risque et s'aventurent à l'extérieur du nid pour récolter la nourriture. Ainsi seules les fourmis âgées se servent de leur venin pour capturer des proies et la synthèse de tous les peptides du venin chez les fourmis jeunes qui ne sont pas impliquées dans la prédation serait une dépense énergétique coûteuse et inutile. Les fourmis jeunes pourraient donc synthétiser uniquement certains peptides en grandes quantités tels que des antibactériens mais il ne s'agit que d'une hypothèse qui nécessite d'être testée par une étude complémentaire de l'ontologie des profils de venin.

L'analyse des masses de *P. goeldii* a permis de retrouver des masses identiques à celles des ponerines identifiées précédemment par LC-MS dans une étude du venin de *P. goeldii* [38] ce qui montre une bonne stabilité du profil peptidique de *Pachycondyla goeldii* collecté à des endroits différents et à plusieurs années d'écart. Ceci indique une excellente reproductibilité génétique et temporelle des profils, assurant une identification fiable au fil du temps, sans dérive de composition intraspécifique.

Cette nouvelle méthode d'identification est plus puissante et moins complexe que l'identification morphologique et a été utilisée avec succès pour déterminer des échantillons dont l'identification morphologique était incertaine. Nous pouvons également suggérer que cette méthode pourrait être un outil de phylogénie moléculaire, utilisant les quelques peptides communs entre chaque espèce comme cela a été avancé pour les scorpions [13].

Nous n'avons pas montré de réelles différences dans la répartition des masses des peptides des venins entre les espèces arboricoles et les espèces vivant au sol, qui pourraient être corrélées avec la différence de neurotoxicité observée chez les fourmis [42]. Cependant l'étude de la gamme de masse des peptides n'est pas suffisante et il est nécessaire d'obtenir davantage d'informations structurales et pharmacologiques pour expliquer la neurotoxicité plus élevée des venins d'espèces arboricoles. Des peptides de tailles similaires peuvent avoir des pharmacologies et des activités complètement différentes. Les informations de séquence obtenues par l'analyse des spectres MS/MS permettront de compléter les informations structurales des peptides des venins et de mieux définir la présence éventuelle de différentes classes pharmacologiques.

Les venins de ponerinae possèdent une importante diversité de peptides qui était jusqu'alors insoupçonnée. Les venins de *Pachycondyla* étudiés possèdent entre 200 et 300 peptides, et une telle richesse dans les venins de fourmis est montrée pour la première fois. Parmi ces peptides quelques uns possèdent des tailles similaires à celle des ponerines [38] et des dinoponeratoxines [39] mais la découverte d'autres peptides avec des masses supérieures à 3500 Da ne correspond à

rien de connu à l'heure actuelle. Certains de ces peptides sont réticulés par un ou trois ponts disulfure ce qui n'avait jamais été montré dans les venins de ponerinae et ces résultats viennent enrichir la diversité structurale très méconnue des peptides des venins de fourmis. Les peptides structurés par trois ponts disulfure appartiennent tous à une gamme de masse comprise entre 3500 et 4500 Da ce qui suggère une possible appartenance au type ICK (Inhibitor Cystin Knot). Les ICK sont des neurotoxines décrites dans les venins des autres groupes taxonomiques (conidae, arachnides) qui provoquent des paralysies rapides en modulant le fonctionnement des canaux ioniques. Si la présence de tels composés dans les venins de ponerinae était avérée ils pourraient jouer un rôle prépondérant dans la neurotoxicité des venins. La confirmation par RMN de la structure ICK de ces peptides réticulés par trois ponts disulfure et des tests pharmacologiques sont néanmoins nécessaires. La présence de peptides de 40 acides aminés homologues à des peptides ICK de mygale qui modulent les canaux sodium des insectes a récemment été montrée dans le venin de *Strumigenys kumadori* (myrmicinae) [47]. La découverte dans les venins des *Pachycondyla* de peptides monocaténaires possédant un pont disulfure est également une nouveauté chez les fourmis puisqu'aucun peptide de ce genre n'avait encore été décrit. Des études de leurs activités biologiques doivent être envisagées.

Avant cette étude seuls des peptides linéaires de masse 1000 à 3500 Da, non structurés par des ponts disulfure avaient été décrits dans les venins de ponerinae [38, 39]. Une simple étude combinant spectrométrie de masse et réduction du venin de quatre espèces d'un seul genre de fourmis a permis d'obtenir des résultats originaux montrant une richesse structurale et potentiellement pharmacologique bien plus grande que celle décrite à ce jour.

L'étude de l'ensemble des sous-familles permettra de révéler une diversité encore plus importante. Les exemples préliminaires des venins de *Tetraponera sp* et d'*Ectatomma tuberculatum* le montrent. La mise en évidence dans le venin de *Tetraponera sp* de deux peptides bicaténaires rappelle la structure des myrmexines. Les myrmexines sont des peptides bicaténaires trouvés dans le venin de *Pseudomyrmex triplarinus* qui sont formés par la combinaison de plusieurs chaînes fortement homologues reliées entre elles par deux ponts disulfure [37]. La réduction des deux peptides bicaténaires de *Tetraponera* suggère la présence de quatre ponts disulfures. A ce jour aucun peptide possédant quatre ponts disulfure n'a encore été décrit dans les venins de fourmis. De plus les genres *Pseudomyrmex* et *Tetraponera* appartiennent tous les deux à la sous-famille des pseudomyrmecinae et la découverte de peptides de structures presque similaires (à la différence que les peptides de *Tetraponera* possèdent quatre ponts disulfure au lieu de deux chez *Pseudomyrmex triplarinus*) est donc cohérente avec les résultats antérieurs. La réduction du venin de *Tetraponera sp* montre aussi l'apparition de trois autres masses qui pourraient indiquer des chaînes appartenant à d'autres peptides bicaténaires de masses supérieures à 7000 Da.

Le venin d'*Ectatomma tuberculatum* semble être principalement composé de peptides dimériques ce qui en fait un venin tout à fait original comparé aux autres espèces venimeuses. Les peptides possédant une structure bicaténaire sont plutôt rares dans les venins des différents animaux venimeux alors qu'ils semblent être assez courants dans les venins de certaines sous-familles de fourmis. Ils sont retrouvés dans au moins trois sous-familles différentes ; les myrmeciinae [25, 26], les pseudomyrmeciinae [37] et les ectatomminae [32]. La synthèse de tels peptides pourrait être une stratégie puissante de diversification moléculaire adoptée par certaines sous-familles de fourmis leur permettant de s'adapter rapidement à un nouvel environnement. Par combinaison des chaînes peptidiques, la synthèse de seulement deux peptides peut aboutir à cinq peptides différents.

La diversité structurale des peptides de fourmis est donc beaucoup plus importante que ce que les connaissances actuelles ne laissaient suggérer. Grâce aux techniques de biochimie analytique modernes la découverte future de peptides originaux dans les venins de fourmis ne laisse aucun doute compte tenu de l'immense diversité des fourmis et de leur incroyable capacité d'adaptation. La grande diversité des peptides mise en évidence dans les venins de fourmis pourrait être une nouvelle piste de recherche de molécules thérapeutiques ou insecticides qui viendraient se rajouter à la chimiothèque conséquente déjà représentée par les venins des autres animaux venimeux.

V. Conclusion

Les résultats originaux et innovants de cette étude donneront lieu à deux publications. Une publication sur le travail effectué sur le genre *Pachycondyla* et une autre publication concernant les diverses sous-familles de formicidae. Ce travail se poursuivra dans le cadre d'une thèse à l'UMR EcoFoG de Guyane en collaboration avec VenomeTech. Les diverses familles de peptides seront étudiées au niveau pharmacologique et structural afin d'élucider la présence de nouvelles classes structurales de peptides dans les venins animaux, mais également dans un objectif de valorisation de la biodiversité, par l'investigation de leurs propriétés pharmacologiques.

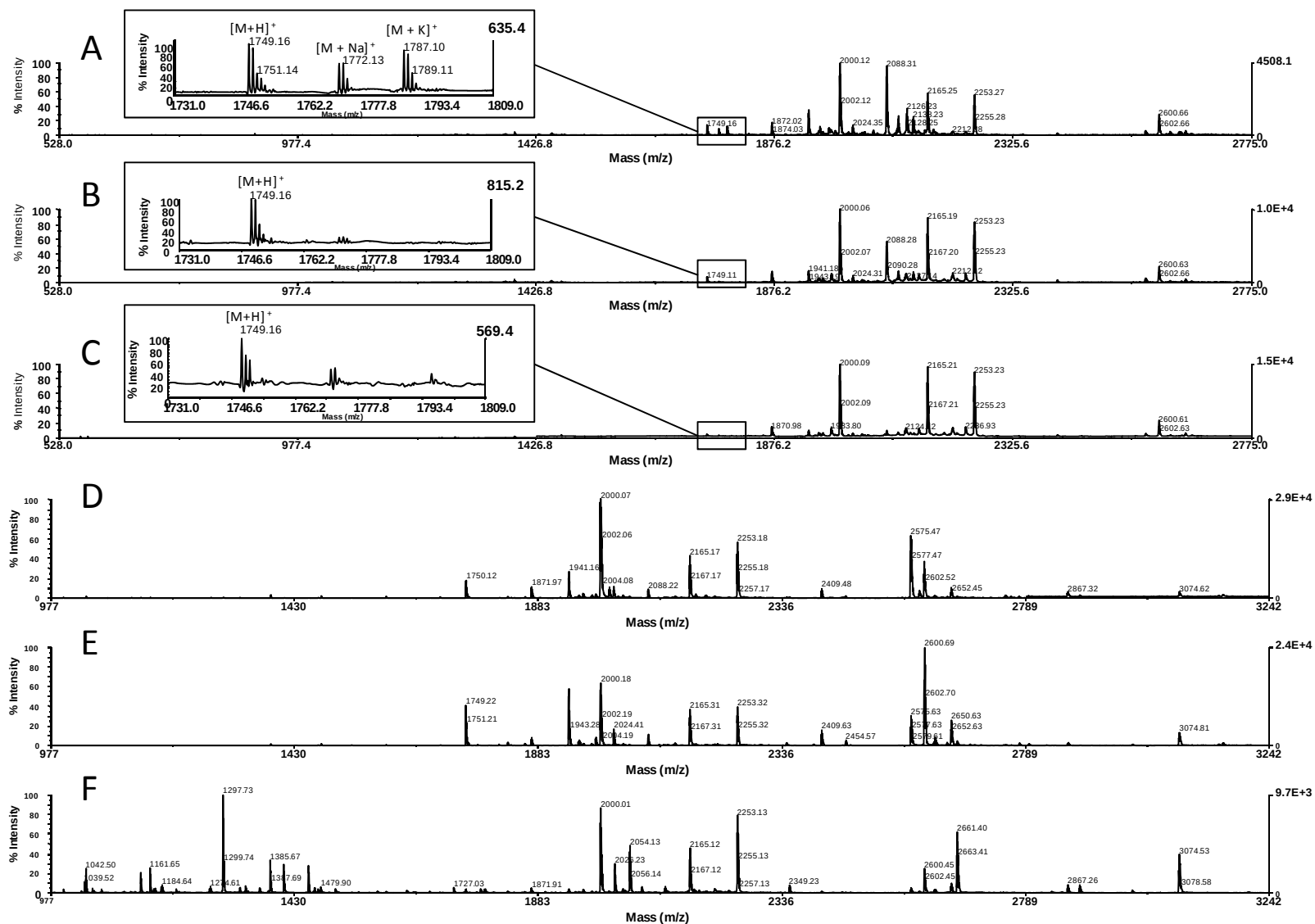
VI. Références

1. Lewis, R.J. and M.L. Garcia, Therapeutic potential of venom peptides. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003. **2**(10): p. 790-802.
2. Escoubas, P., B. Sollod, and G.F. King, Venom landscapes: mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology, 2006. **47**(6): p. 650-63.
3. AntWeb. AntWeb. 2011 [cited 2011 11/03]; Available from: <http://www.antweb.org/>.
4. Blum, M.S., Ant Venoms: Chemical and Pharmacological Properties. *Toxin Reviews*, 1992. **11**(2): p. 115-164.
5. Gillard, C., et al., Classification of the white Naja by on-line LC-ES-MS,, in *Eighteenth International Symposium on Capillary Chromatography*. 1996.
6. Stöcklin, R., Fingerprints of crude venoms by mass spectrometry: from zoological to molecular investigations. *Toxicon*, 1997. **35**(6): p. 818-818.
7. Stöcklin, R., et al., Identification of snake species by toxin mass fingerprinting of their venoms, in *Protein and peptide analysis*, H. press, Editor. 2000: Totowa. p. 317-335.
8. Escoubas, P., M.-L. Célrier, and T. Nakajima, High-performance liquid chromatography matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry peptide fingerprinting of tarantula venoms in the genus Brachypelma: chemotaxonomic and biochemical applications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1997. **11**(17): p. 1891-1899.
9. Escoubas, P., et al., A comparison of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry methods for the analysis of crude tarantula venoms in the Pterinochilus group. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1999. **13**(18): p. 1861-1868.
10. Escoubas, P., et al., Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography study of quantitative and qualitative variation in tarantula spider venoms. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002. **16**(5): p. 403-413.
11. Escoubas, P., et al., Multidimensional peptide fingerprinting by high performance liquid chromatography, capillary zone electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of tarantula venom samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998. **12**(16): p. 1075-1084.
12. Wilson, D. and P.F. Alewood, Taxonomy of Australian Funnel-web spiders using rp-HPLC/ESI-MS profiling techniques. *Toxicon*, 2006. **47**(6): p. 614-627.
13. Nascimento, D.G., et al., Moving pieces in a taxonomic puzzle: Venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). *Toxicon*, 2006. **47**(6): p. 628-639.
14. Jones, A., et al., Isolation and Characterization of Conopeptides by High-performance Liquid Chromatography Combined with Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1996. **10**(1): p. 138-143.
15. Krishnamurthy, T., M. Prabhakaran, and S.R. Long, Mass spectrometric investigations on Conus peptides. *Toxicon*, 1996. **34**(11-12): p. 1345-1359.
16. MacConnell, J.G., et al., Fire ant venoms: Chemotaxonomic correlations with alkaloidal compositions. *Toxicon*, 1976. **14**(1): p. 69-78.
17. MacConnell, J.G., et al., New Alkaloids in the Venoms of Fire Ants. *Annals of the Entomological Society of America*, 1974. **67**: p. 134-135.
18. Jones, T.H., et al., Chemotaxonomic implications of the venom chemistry of some Monomorium antarcticum populations. *J Chem Ecol*, 1988. **14**(12): p. 2197-2212.
19. Duval, A., et al., Poneratoxin, a new toxin from an ant venom, reveals an interconversion between two gating modes of the Na channels in frog skeletal muscle fibres. *Pflugers Arch*, 1992. **420**(3-4): p. 239-47.

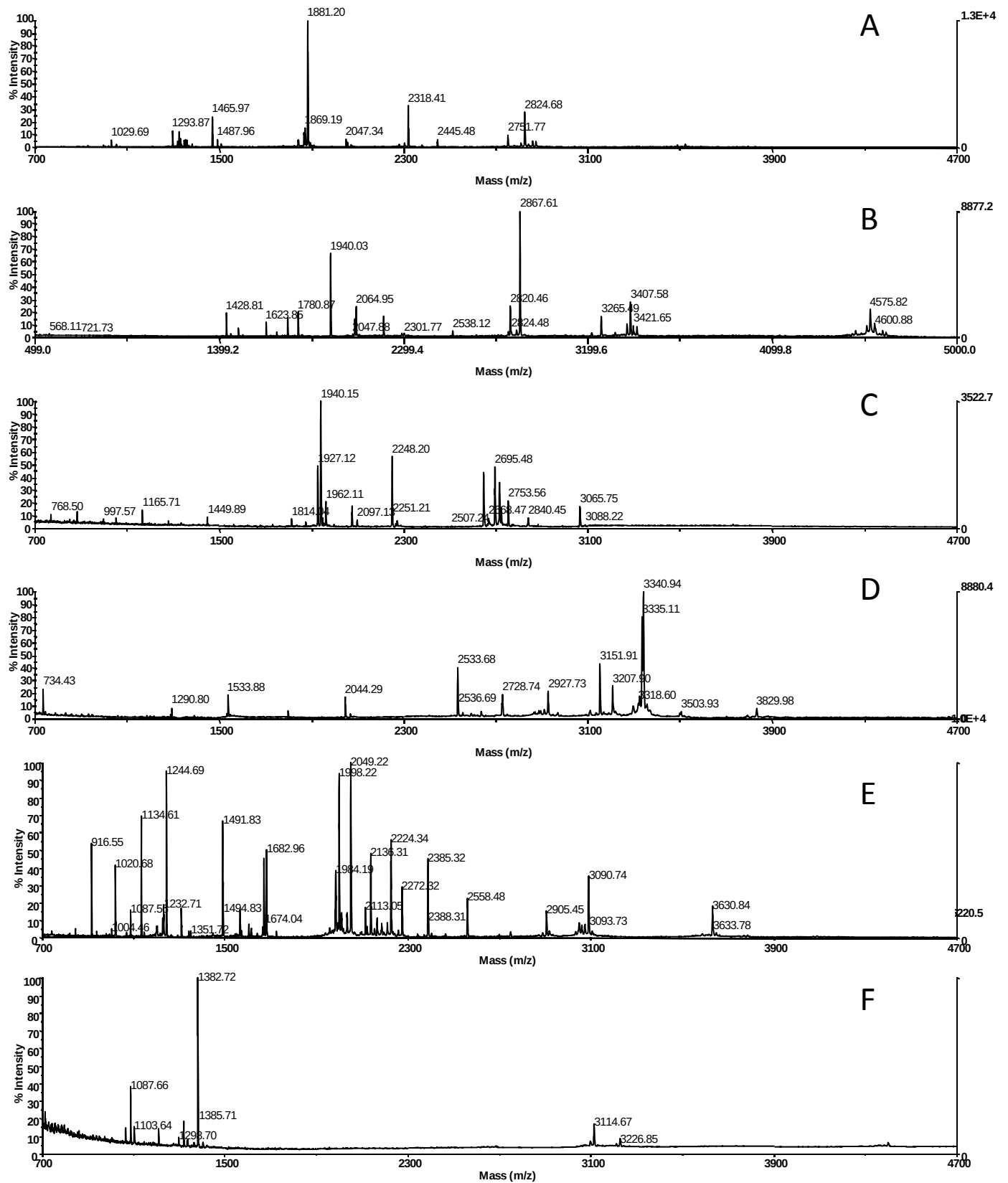
20. Hendrich, A.B., et al., The effect of poneratoxin on neuromuscular transmission in the rat diaphragm. Cell Mol Biol Lett, 2002. **7**(2): p. 195-202.
21. Piek, T., et al., Poneratoxin, a novel peptide neurotoxin from the venom of the ant, *Paraponera clavata*. Comp Biochem Physiol C, 1991. **99**(3): p. 487-95.
22. Piek, T., et al., Pharmacological characterization and chemical fractionation of the venom of the ponerine ant, *Paraponera clavata* (F.). Comp Biochem Physiol C, 1991. **99**(3): p. 481-6.
23. Szolajska, E., et al., Poneratoxin, a neurotoxin from ant venom. Structure and expression in insect cells and construction of a bio-insecticide. Eur J Biochem, 2004. **271**(11): p. 2127-36.
24. Davies, N.W., M.D. Wiese, and S.G. Brown, Characterisation of major peptides in 'jack jumper' ant venom by mass spectrometry. Toxicon, 2004. **43**(2): p. 173-83.
25. Inagaki, H., et al., 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, 2004. **428**(2): p. 170-8.
26. Inagaki, H., et al., Pilosulin 5, a novel histamine-releasing peptide of the Australian ant, *Myrmecia pilosula* (Jack Jumper Ant). Arch Biochem Biophys, 2008. **477**(2): p. 411-6.
27. Wiese, M.D., et al., *Myrmecia pilosula* (Jack Jumper) ant venom: identification of allergens and revised nomenclature. Allergy, 2007. **62**(4): p. 437-43.
28. Wiese, M.D., et al., Proteomic analysis of *Myrmecia pilosula* (jack jumper) ant venom. Toxicon, 2006. **47**(2): p. 208-17.
29. Zelezetsky, I., et al., Identification and optimization of an antimicrobial peptide from the ant venom toxin pilosulin. Arch Biochem Biophys, 2005. **434**(2): p. 358-64.
30. Arseniev, A.S., et al., Toxic principle of selva ant venom is a pore-forming protein transformer. FEBS Lett, 1994. **347**(2-3): p. 112-6.
31. Nolde, D.E., et al., Three-dimensional structure of ectatomin from *Ectatomma tuberculatum* ant venom. J Biomol NMR, 1995. **5**(1): p. 1-13.
32. Pluzhinikov, K.A., et al., [Structure-activity study of the basic toxic component of venom from the ant *Ectatomma tuberculatum*]. Bioorg Khim, 1994. **20**(8-9): p. 857-71.
33. Pluzhnikov, K., et al., Analysis of ectatomin action on cell membranes. Eur J Biochem, 1999. **262**(2): p. 501-6.
34. Pluzhnikov, K., L. Shevchenko, and E. Grishin, Ant polypeptide toxins. Spi (1 mars 2000) ed, ed. B.V. AG. 2000.
35. Hink, W.F., P.W. Pappas, and D.C. Jaworski, Partial biochemical characterization of venom from the ant, *Pseudomyrmex triplarinus*. Toxicon, 1994. **32**(7): p. 763-72.
36. Hink, W.F., et al., Inhibition of human platelet aggregation and secretion by ant venom and a compound isolated from venom. Inflammation, 1989. **13**(2): p. 175-84.
37. Pan, J. and W.F. Hink, Isolation and characterization of myrmexins, six isoforms of venom proteins with anti-inflammatory activity from the tropical ant, *Pseudomyrmex triplarinus*. Toxicon, 2000. **38**(10): p. 1403-13.
38. Orivel, J., et al., Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptides from the venom of the ant *Pachycondyla goeldii*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 17823-9.
39. Johnson, S.R., et al., A biochemical characterization of the major peptides from the Venom of the giant Neotropical hunting ant *Dinoponera australis*. Toxicon, 2009. **29**(2): p. 29.
40. Bernheimer, A.W., L.S. Avigad, and J.O. Schmidt, A hemolytic polypeptide from the venom of the red harvester ant, *Pogonomyrmex barbatus*. Toxicon, 1980. **18**(3): p. 271-8.
41. Orivel, J., M.C. Malherbe, and A. Dejean, Relationships Between Pretarsus Morphology and Arboreal Life in Ponerine Ants of the Genus *Pachycondyla* (Formicidae: Ponerinae). Annals of the Entomological Society of America, 2001. **94**(3): p. 449-456.
42. Orivel, J. and A. Dejean, Comparative effect of the venoms of ants of the genus *Pachycondyla* (Hymenoptera: Ponerinae). Toxicon, 2001. **39**(2-3): p. 195-201.

43. Nentwig, W., T. Friedel, and C. Manhart, Comparative investigations on the effect of the venoms of 18 spider species onto the cockroach *Blatta orientalis* (Blattodea). Zool. jb. physiol, 1992. **96**: p. 279-290.
44. Delvolve, A. and A.S. Woods, Ammonium Sulfate and MALDI In-Source Decay: A Winning Combination for Sequencing Peptides. Analytical Chemistry, 2009. **81**(23): p. 9585-9589.
45. Nishikaze, T. and M. Takayama, Disappearance of interfering alkali-metal adducted peaks from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectra of peptides with serine addition to α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007. **21**(20): p. 3345-3351.
46. Fresneau, D. and P. Dupuy, A study of polyethism in a ponerine ant: *Neoponera apicalis* (Hymenoptera, formicidae). Animal Behaviour, 1988. **36**(5): p. 1389-1399.
47. Inagaki, H., K. Masuko, and T. Kudo. SKTXs: peptides identified from the ant *Strumigenys kumadori* that block sodium channel. in The 8th IST-ASIA PACIFIC MEETING on Animal, plant and microbial toxins. 2008. Hanoi, Vietnam: Toxicon.

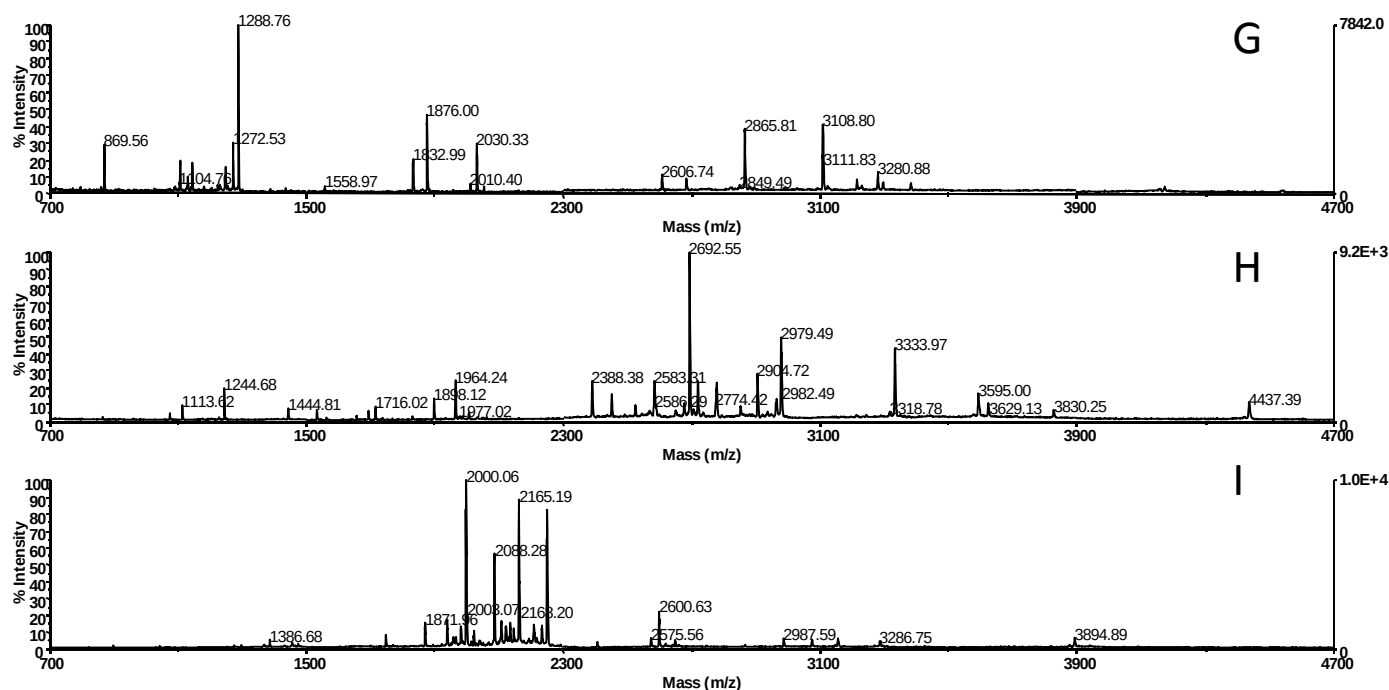
ANNEXES



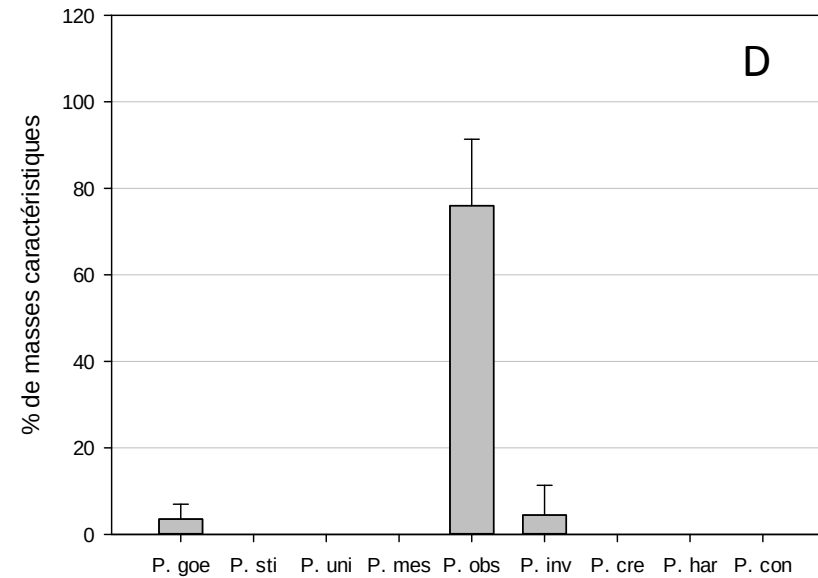
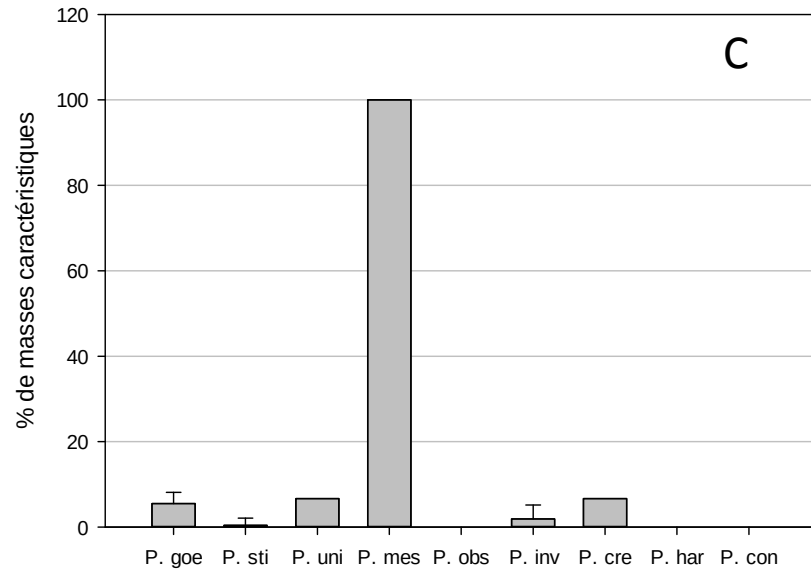
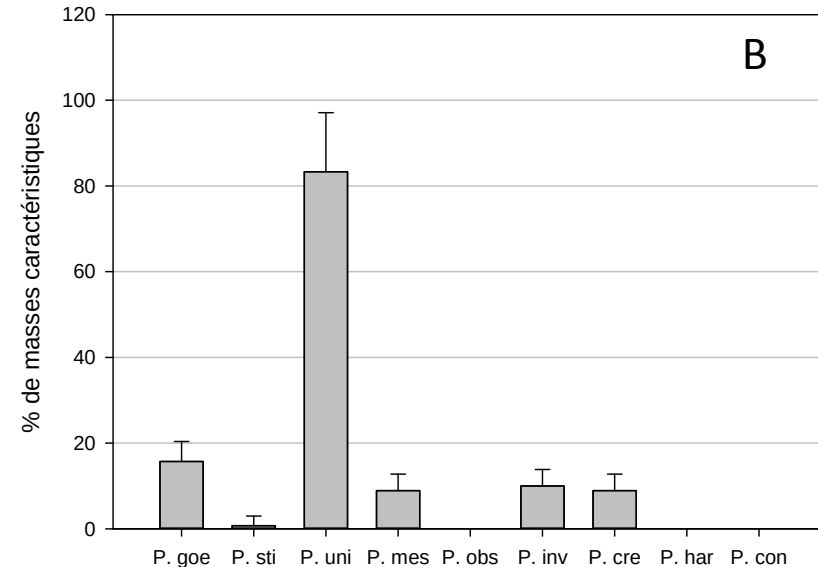
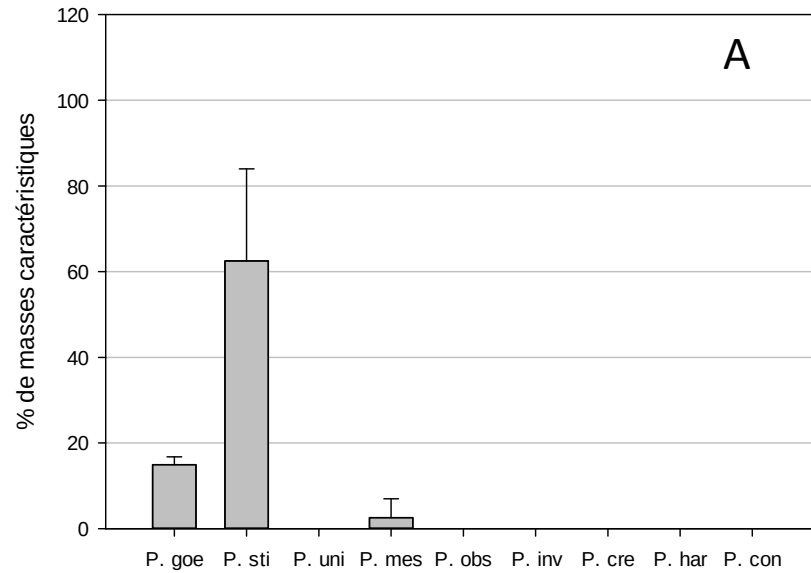
Annexe 1. Spectres MALDI-TOF de *Pachycondyla obscuricornis* (Pobs1) avec les matrices CHCA et FA et les additifs testés. A) CHCA. B) CHCA + phosphate d'ammonium. C) CHCA + sérine. D) FA. E) FA + phosphate d'ammonium. F) FA + sérine.



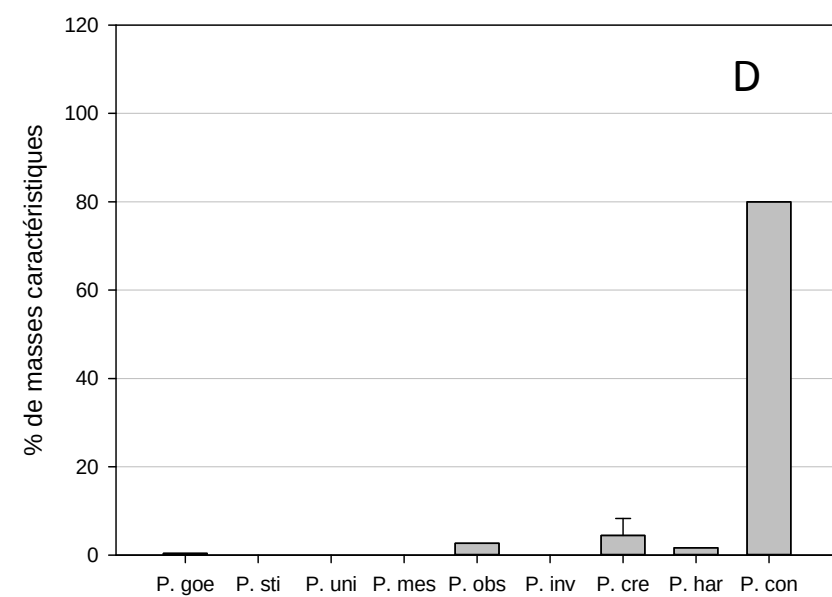
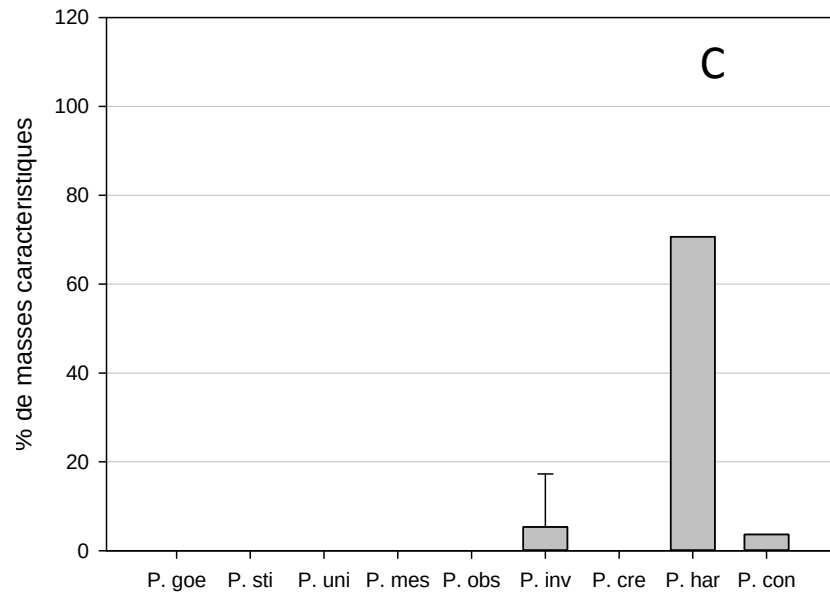
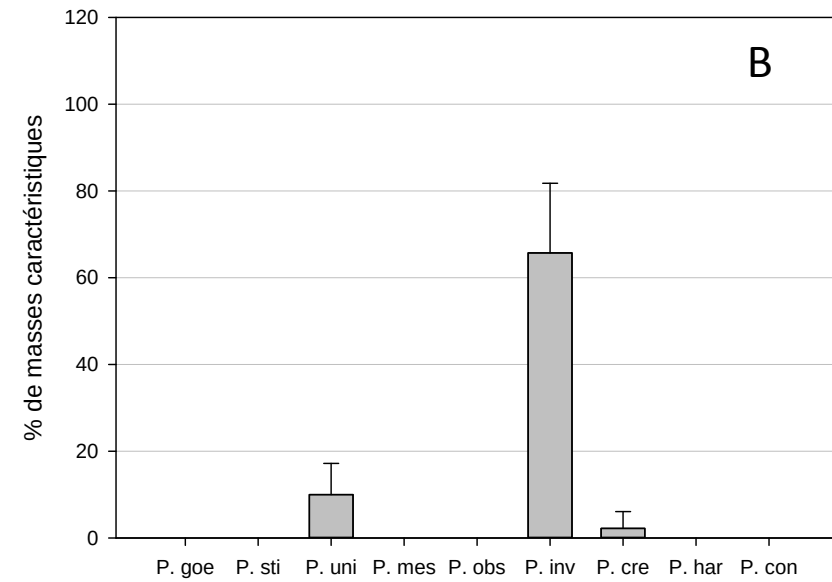
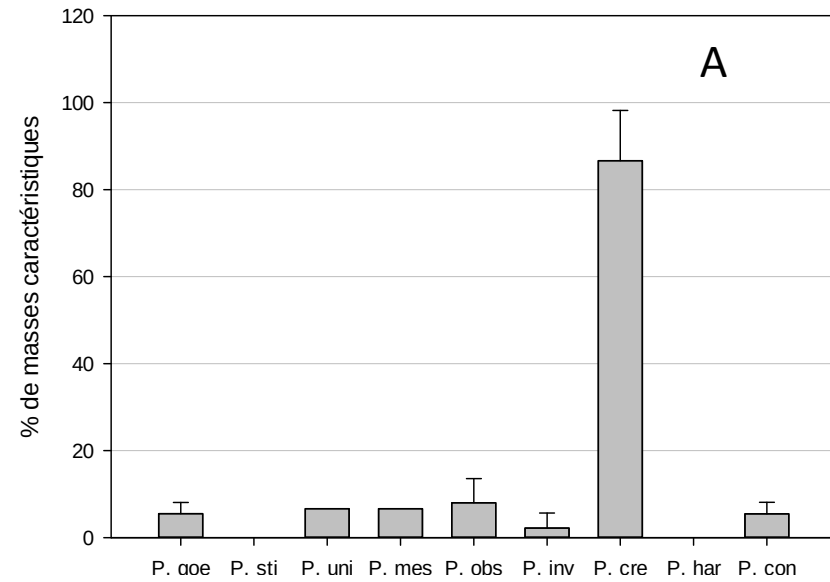
Annexe 2. Spectres MALDI-TOF avec la matrice CHCA de 9 espèces de *Pachycondyla*. A) *P. harpax*. B) *P. crenata*. C) *P. constricta*. D) *P. inversa*. E) *P. mesonotalis*. F) *P. stigma*.



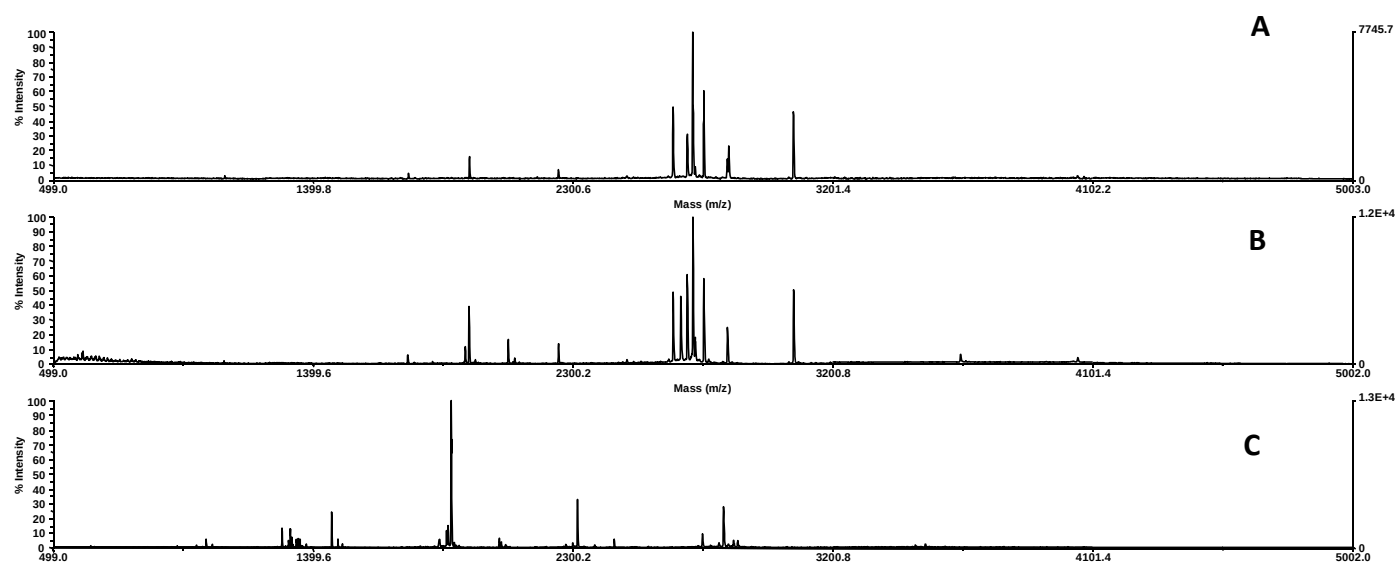
Annexe 2 suite. G) *P. goeldii*. H) *P. unidentata*. I) *P. obscuricornis*.



Annexe 3. Pourcentage moyen des masses caractéristiques des espèces dans les échantillons de chaque espèce. A) Masses caractéristiques de *P. stigma*. B) Masses caractéristiques de *P. unidentata*. C) Masses caractéristiques de *P. mesonotalis*. D) Masses caractéristiques de *P. obscuricornis*.

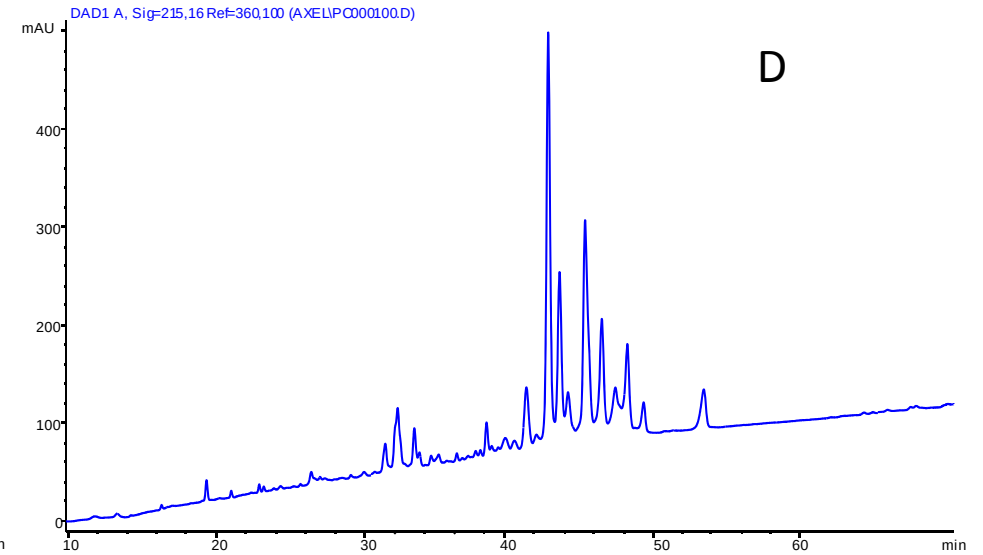
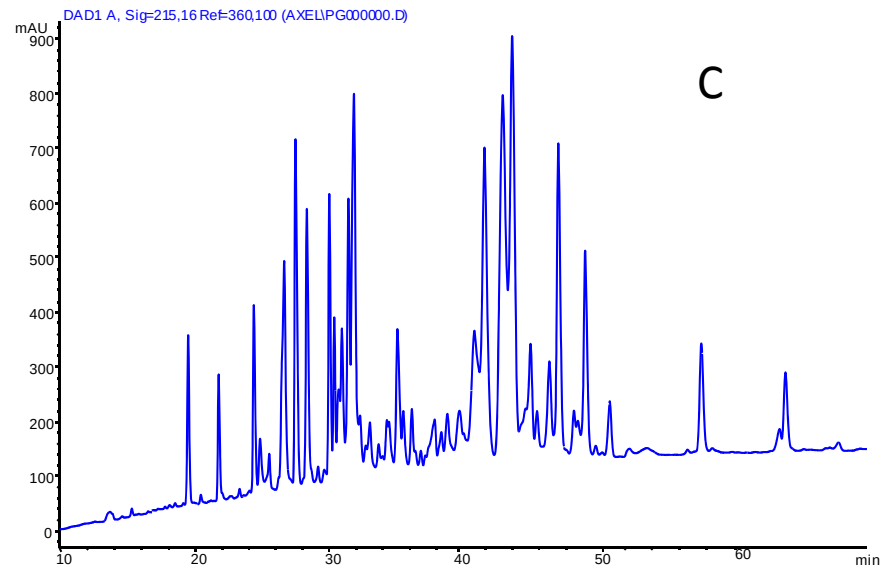
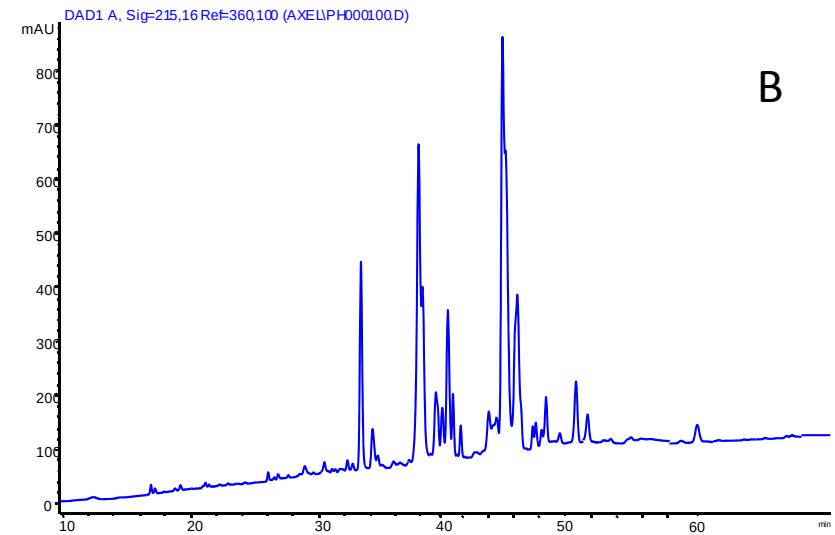
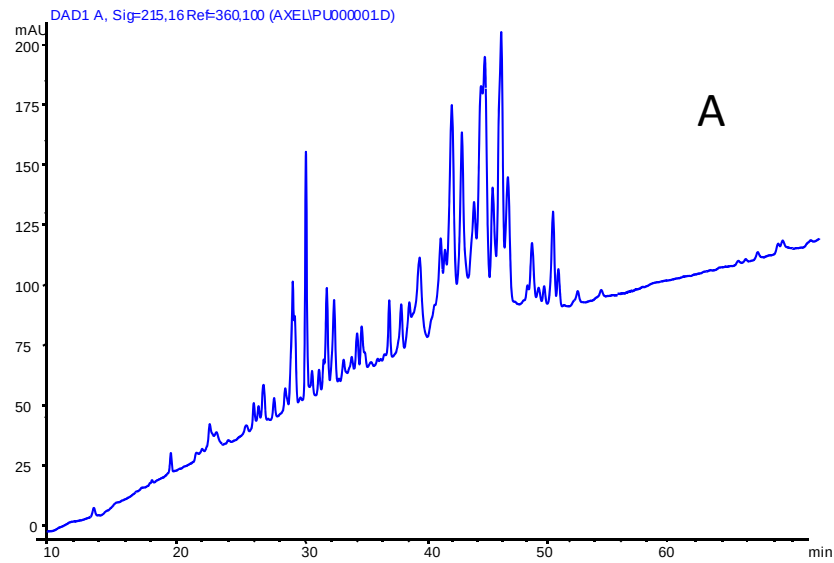


Annexe 4. Pourcentage moyen des masses caractéristiques des espèces dans les échantillons de chaque espèce. A) Masses caractéristiques de *P. crenata*. B) Masses caractéristiques de *P. inversa*. C) Masses caractéristiques de *P. harpax*. D) Masses caractéristiques de *P. constricta*.



Annexe 5. Spectres de trois échantillons de *Pachycondyla*. A) Identification incertaine ; B) *Pachycondyla constricta* ; C) *Pachycondyla harpax*

Rapport de stage : Les peptides dans les venins de fourmis primitives



Annexe 6. Chromatogrammes du venin de 4 espèces de *Pachycondyla*. A) *P. unidentata*. B) *P. harpax*. C) *P. goeldii*. D) *P. constricta*.

Résumé :

Alors que les peptides des venins de serpents, de cônes, d'arachnides ou encore de guêpes ont été très étudiés, ceux des venins de fourmis restent largement inexplorés. Les fourmis sont pourtant les organismes les plus diversifiés de la planète et pourraient détenir une grande richesse peptidique. Dans cette étude utilisant la spectrométrie de masse MALDI-TOF nous nous sommes d'abord intéressés aux peptides des venins de fourmis de 9 espèces du genre *Pachycondyla* dans un but taxonomique. La réalisation d'une carte de 15 peptides spécifiques de chaque espèce est suffisante pour pouvoir identifier les 9 espèces de *Pachycondyla*. Les peptides de venin de fourmis malgré quelques variations s'avèrent être de bons marqueurs taxonomiques comme cela est le cas chez les serpents, les mygales et les scorpions. Partant de l'observation que les espèces du genre *Pachycondyla* aux mœurs arboricole sont dotées d'un venin plus puissant que les espèces terricoles, la comparaison de la distribution des peptides a été réalisée pour deux espèces arboricoles et deux espèces terricoles. Cependant nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la distribution des peptides du venin et le mode de vie des espèces. Une seconde partie de l'étude a été consacrée à la caractérisation structurale des peptides des venins de fourmis de trois sous-familles différentes. Pour la première fois la présence de peptides structurés par 1 et 3 ponts disulfure est démontrée dans les venins de ponerinae. Les venins de ponerinae montrent une plus grande richesse structurale que ce que les études précédentes ne laissaient présager. Le venin de *Tetraponera* sp contient deux peptides dimériques réticulés par 4 ponts disulfure ce qui représente les deux premiers peptides de ce type décrits à ce jour dans les venins de fourmis. Le venin d'*Ectatomma tuberculatum* semble être principalement composé de peptides dimériques. La présence récurrente de peptides dimériques dans les venins pourrait être une stratégie de diversification moléculaire adoptée par les fourmis.

Mots clés : venin, peptides, fourmis, *Pachycondyla*, ponerinae, spectrométrie de masse MALDI-TOF, chimiotaxonomie, pont disulfure.

Abstract :

Although peptides in the venoms of snakes, snail cones, arachnids or wasps have been extensively studied, ant venom peptides remain largely unexplored. Ants are the most diversified organisms on earth and therefore represent an extraordinary biochemical diversity. In this study we first investigated venom peptides in nine species of the genus *Pachycondyla* using MALDI-TOF mass spectrometry, and aiming at taxonomic applications. A fifteen peptides map is a specific fingerprint for each species and can be used to identify the *Pachycondyla* species. Ant venom peptides, despite some quantitative variations, are good taxonomic markers as previously seen in snakes, tarantulas and scorpions. Arboreal *Pachycondyla* have more potent venoms than ground-dwelling species. A comparison of peptide distribution between two arboreal and two ground-dwelling species could not reveal any relationship between peptide distribution and species habitat. The second part of the study concerned the structural characterization of ant venom peptides in three subfamilies. We report for the time the presence of peptides with one and three disulfide bonds in the venoms of ponerinae. Ponerinae venoms display more structural complexity than seen from previous studies. The venom of *Tetraponera* sp contains dimeric peptides with four disulfide bonds, the first such peptides identified in ant venoms. The venom of *Ectatomma tuberculatum* seems to be mainly composed of dimeric peptides. The apparently common occurrence of dimeric peptides in those venoms may be related to a molecular diversification strategy adopted by ants.

Keywords : venom, peptides, ants, *Pachycondyla*, ponerinae, mass spectrometry MALDI-TOF, chemotaxonomy, disulfide bond.