

Caractérisation de nouvelles toxines sur les conductances de l'abeille *Apis mellifera*, une voie vers de nouveaux insecticides ?

Quentin Lelièvre



Liste des abréviations :

ACh : Acétylcholine

ADN: Acide désoxyribonucléique

Ae1a: *Anochetus emarginatus* PONTX-1a

Ae1d: *Anochetus emarginatus* PONTX-1d

Am : *Apis mellifera*

Ap : *Aphid pisum*

ARN: Acide ribonucléique

Cav: Canal calcique voltage-dépendant (même principe pour les Nav, Kv...)

Courbe IV : Courbe courant-voltage

DHP : Dihydropyridines

Ea : Potentiel de $\frac{1}{2}$ activation

EC50 et PD50 : Concentration efficace 50 et dose paralysante 50

Ein : Potentiel de $\frac{1}{2}$ inactivation

Erev : Potentiel d'inversion

GABA : Acide γ -aminobutyrique

Gm : Conductance maximale

HCN: *Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel*

Hs : *Homo sapiens*

LGIC: Ligand-gated ion channels

nAChR: Récepteur nicotinique de l'acétylcholine

NMR: Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

PONTX: Poneritoxine

Rn : *Rattus norvegicus*

RP-HPLC: *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*

Vd : *Varroa destructor*

VGIC: Voltage-gated ion channels

Table des matières

Introduction	1
Matériel et méthodes	9
Résultats	16
Discussion.....	30
Conclusion-Perspectives.....	35
Références bibliographiques.....	38

I. Introduction

A. Le déclin des pollinisateurs:

Alors que nous traversons la sixième grande extinction de masse, caractéristique de l'Anthropocène, l'attention générale portée à la chute catastrophique de biodiversité s'est au départ essentiellement tournée vers les vertébrés comme les mammifères ou les oiseaux (Goulson, 2019). Cependant, que ce soit en nombre d'espèces ou en nombre d'individus, la majeure partie du règne animal est composée d'arthropodes (80% des espèces connues) et notamment d'insectes jouant souvent des rôles cruciaux dans le maintien de l'équilibre des écosystèmes (place dans la chaîne trophique, pollinisation, recyclage de la matière organique...). Or, le déclin généralisé des insectes est maintenant lui aussi avéré (Jactel et al., 2020) avec une diminution de plus de 70% des insectes volants entre 1989 et 2014 observée par Hallmann et al. (2017). Cette tendance se retrouve plus spécifiquement chez les pollinisateurs comme les abeilles, dont la chute des colonies et l'augmentation des taux de mortalité alertent les apiculteurs (Paudel et al., 2015). En effet, la pollinisation présente un rôle écologique mais aussi économique majeur. Le "service environnemental" qu'apporte cette participation à la reproduction des plantes est évalué à 153 milliards d'euros par an dans le monde par l'INRAE (programme Alarm, 2006-2009). C'est donc dans ce contexte que prennent place les études de dynamique des populations de pollinisateurs et plus particulièrement celles de l'abeille européenne semi-domestique *Apis mellifera*.

B. Le déclin des abeilles:

Cette dernière se trouve être un modèle très étudié du fait de son statut d'espèce sociale, permettant ainsi des découvertes liées à la communication, la cognition ou encore la perception de l'environnement (Menzel et Mercer, 2012). De plus, du fait qu'elle soit domestiquée et des raisons écologiques évoquées précédemment, elle est parfois qualifiée d'«espèce sentinelle» et est l'une des premières espèces révélatrices de la gravité du déclin des insectes (Biesmeijer et al., 2006). Différentes causes expliquant la chute des colonies de cette espèce, et des abeilles en général, ont été établies. Parmi celles-ci se retrouvent notamment la préation (frelon asiatique *Vespa velutina*), le parasitisme (acarien *Varroa destructor*), les virus, le dérèglement climatique, la perte d'habitat ou encore les insecticides (Hristov et al., 2020). Il est par ailleurs important de noter que certains de ces risques sont favorisés par la densification des populations d'abeilles (dans le cas des abeilles domestiques), comme la transmission des virus (favorisée par la promiscuité ou encore le varroa) et la préation par le frelon asiatique (Brosi et al., 2017).

C. Les insecticides neurotoxiques:

Parmi les origines “plurifactorielles” du déclin des abeilles, l’exposition aux insecticides neurotoxiques comme les néonicotinoïdes est considérée comme une des causes principales qui touche aussi bien les abeilles domestiques que les sauvages (Collet *et al.*, 2022 ; Lundin *et al.*, 2015). Le mode d’action de ces insecticides se résume à une perturbation du système nerveux, généralement au niveau de la transmission synaptique, entraînant la plupart du temps une paralysie (flasque ou spastique) pouvant précédée la mort. Les abeilles, bien que n’étant pas directement ciblées, sont toutefois victimes de la faible spécificité de ces composés, en particulier au sein des arthropodes. De ce fait, la directive européenne 91/414-CEE (15/07/91) exige des études écotoxicologiques sur abeille avant toute autorisation de mise sur le marché de pesticides. En plus de la toxicité aiguë (Taux de mortalité et dose-létale 50), la toxicité sublétale est aujourd’hui prise en considération dans l’étude des effets néfastes de ce type de composé sur les “espèces bénéfiques” (Desneux *et al.*, 2017). Cela peut concerner aussi bien des troubles de la cognition, du comportement (social ou individuel), de l’orientation, ou encore de la physiologie qui peuvent conduire plus tard à la mort de l’abeille ou au déclin de la colonie. Cette toxicité sublétale a d’ailleurs été l’un des arguments majeurs conduisant à l’interdiction des néonicotinoïdes en France en 2018. Il est donc aujourd’hui nécessaire de trouver des alternatives plus spécifiques à ces pesticides dans le but de lutter contre les ravageurs tout en réduisant l’impact environnemental de ces composés. Cependant, comprendre les mécanismes d’action cellulaires de ces composés demande d’identifier et de caractériser leurs cibles moléculaires et d’analyser leurs effets sur celles-ci. Dans le cas des neurotoxiques paralysants, cette cible se trouve généralement au niveau de la membrane plasmique pré ou post-synaptique et des canaux ioniques.

D. Les canaux ioniques:

Ces canaux sont des protéines transmembranaires permettant le passage d’ions de part et d’autre de la membrane. Ils jouent donc un rôle crucial dans la polarisation électrique de la cellule. Ce flux ionique se fait par un pore formé au sein de la protéine, qui s’ouvre lorsque le récepteur est activé et laisse passer les ions auxquels il est perméable (généralement sodium, calcium, potassium et chlorure) selon leur gradient électrochimique. Cette ouverture peut se faire selon deux modes : Le récepteur peut être activé soit par le potentiel membranaire (VGIC ou Voltage Gated Ion Channels), soit par un ligand (LGIC ou Ligand Gated Ion Channels). Dans le cas des LGIC, la fixation d’un ligand provoque un changement de conformation des différentes sous-unités du récepteur aboutissant à l’ouverture du pore. Il peut s’agir de neurotransmetteurs activant les récepteurs post-synaptiques, comme l’acide γ -aminobutyrique (GABA) ou l’acétylcholine (ACh) par exemple. En ce qui concerne les VGIC, ceux-ci comportent des hélices transmembranaires chargés électriquement (*voltage sensor*) qui réagissent au changement du champ électrique et provoquent une modification de la structure du pore aboutissant à son ouverture. Ces récepteurs participent donc entre-autre à la propagation du signal électrique le long des neurones. Il peut s’agir de canaux calciques voltages-dépendants

(Cav), sodiques (Nav) ou potassiques (Kv) par exemple. La figure 1 schématise les différents types de canaux ioniques généralement ciblés par les insecticides neurotoxiques.

E. Le séquençage du génome de l'abeille :

L'identification des différents canaux ioniques exprimés chez l'abeille a été rendue possible à la suite du séquençage de son génome en 2006 (Weinstock *et al.*, 2006). Les plus de 10 000 gènes répartis sur 16 chromosomes identifiés ont apporté des outils dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués notamment dans le comportement et la résistance à certaines maladies. Cela a par exemple permis de constater un nombre réduit de 30 à 50% de moins que d'autres insectes (comme le moustique ou la drosophile) du nombre de gènes codant pour des enzymes de détoxicification. Ces enzymes ont pour but de rendre inactifs, de conjuguer et d'éliminer les xénobiotiques afin d'éviter ou de réduire leurs effets toxiques. Le séquençage complet du génome a donc amené l'identification et le clonage des séquences codantes pour les canaux ioniques (VGIC et LGIC) et ainsi ouvert la voie aux études de caractérisation. Ainsi, cela a permis la découverte d'un nouveau canal calcique chez l'insecte, AmCav4 (Am pour *Apis mellifera*). Ce dernier était initialement nommé DSC1 (Drosophila Sodium Channel 1) en raison de sa très forte homologie de séquence avec le canal sodique de la drosophile. Cependant, il s'est finalement avéré que le canal était imperméable aux ions sodium et perméable aux ions calcium et possédait des propriétés nouvelles par rapport aux autres canaux calciques, le faisait entrer dans une nouvelle famille de VGIC (Gosselin-Badaroudine *et al.*, 2016).

F. L'intérêt d'étudier des toxines:

Pour l'étude *in vivo* du rôle physiologique des canaux ioniques, il est important d'avoir à disposition des modulateurs et des antagonistes. Or, pour certains canaux d'abeille, comme Ca_v4, il n'y en n'a pas encore d'identifiés. Afin de trouver de telles molécules, certaines stratégies s'orientent vers les relations interspécifiques proie-prédateur, et s'intéressent plus particulièrement aux venins. En effet, les venins représentent un avantage adaptatif, permettant à l'espèce venimeuse de se défendre face à un prédateur ou de chasser une proie, augmentant dans les deux cas la *fitness* (Casewell *et al.*, 2013). Ainsi, les venins ont évolué de sorte à être les plus spécifiques possible et adaptés aux espèces qu'ils ciblent (Van der Meijden *et al.*, 2017). De ce fait, certains composés présents dans les venins vont agir sur des cibles moléculaires d'une proie ou d'un prédateur, sans avoir d'effet sur celles d'autres espèces. Les venins sont des mélanges "cocktails" de nombreuses molécules qui peuvent alors avoir différents rôles, comprenant entre autres des enzymes et des protéines/peptides. Dans un venin, on peut donc s'attendre à trouver des protéines agissant sur des cibles moléculaires présentant une homologie forte avec celles de la proie/du prédateur. Ces protéines constituent donc une piste intéressante pour la recherche de nouveaux insecticides avec une spécificité plus grande, pouvant être améliorée par des approches de *molecular docking*. Ces toxines à spectre d'action réduit

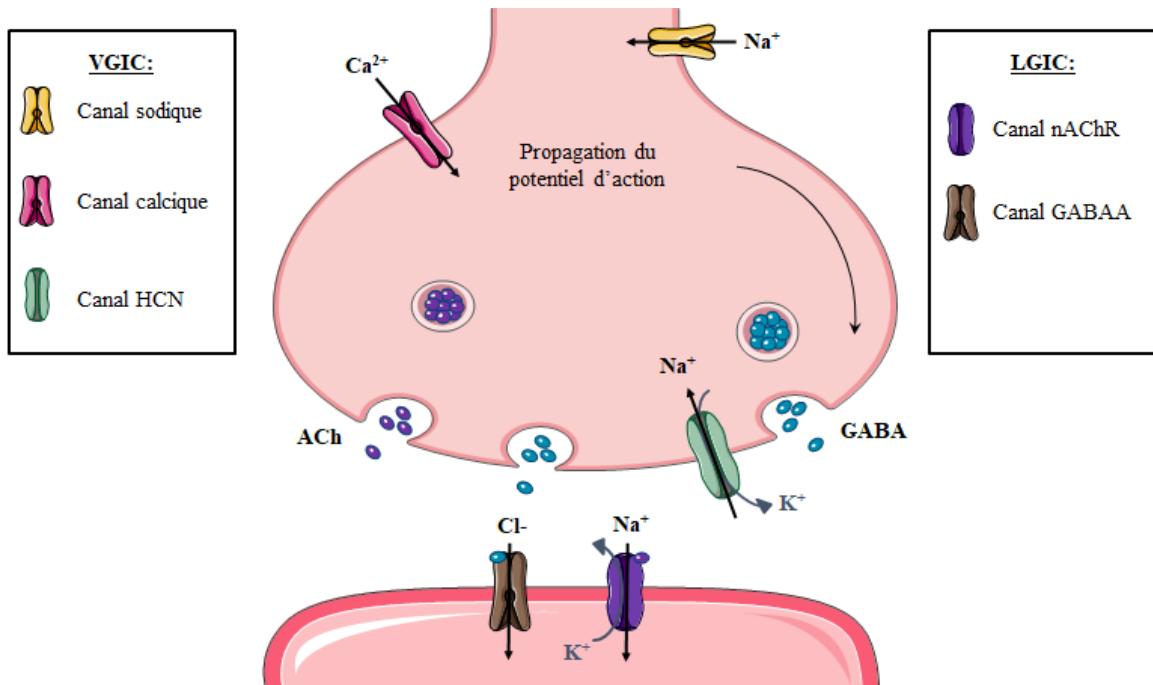


FIGURE 1: SCHEMAS D'UNE SYNAPSE REPRESENTANT LES DIFFERENTS GRANDS TYPES DE CANAUX IONIQUES QUE NOUS AVONS ETUDIE (BIORENDER, EN COLLABORATION AVEC MASHA MEGER)

permettraient de réduire l'impact sur la biodiversité. Des études ont déjà trouvé des peptides issus de venin d'araignée (ω -hexatoxin-Hv1a de *Hadronyche versuta*) bloquant les Ca_v d'insectes mais pas ceux d'abeille (Nakasu *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'étude des protéines issues de venin occupent aujourd'hui une place importante dans la recherche de nouveaux agents thérapeutiques. Certaines conotoxines sont par exemple utilisées comme antidouleur, en alternative à la morphine, avec comme avantage d'éviter l'addiction (ω -conotoxin-MVIIA, Ziconotide ®)(Gieré *et al.*, 2019).

G. Les poneritoxines:

Les protéines issues de venins sont donc de plus en plus étudiées depuis la fin du XIXème siècle et les avancées des études “omics”. Ces recherches concernent en particulier les venins de serpents, scorpions et araignées en raison de leur richesse en protéines bioactives. Les venins d'insectes sont pour le moment moins étudiés. Or, certaines espèces peuvent amener à des découvertes intéressantes. C'est le cas des fourmis et en particulier de la fourmi guyanaise *Anochetus emarginatus* (voir photo en 1^{ère} page de Hadrien Lalagüe, fournie par Axel Touchard). Cette fourmi “*trap jaws*” capture ses proies en refermant ses mandibules puissantes sur elles avant de les envenimer. La particularité de ce venin est d'être composé majoritairement de très petits peptides monomères présentant un ou deux ponts disulfures. Jusqu'ici, les peptides des venins de fourmis se divisaient en 3 classes structurales : Linéaires, homo- et hétérodimères ou protéine à ICK (inhibitor cystine knot)(Touchard *et al.*, 2015). Ce type de peptide est donc inédit et pourrait amener à de nouvelles découvertes liées à la caractérisation des relations structure-fonction, en particulier sur les cibles moléculaires des proies. Ces toxines sont appelées poneritoxines (PONTX) en référence à la sous-famille Ponerinae à laquelle appartiennent ces fourmis. Ce sont sur ces peptides que porte l'étude de Touchard *et al.* de 2016. Le venin a été fragmenté, puis les 7 poneritoxines les plus abondantes purifiées par RP-HPLC, elles sont nommées Ae1a-Ae1b...Ae1g en fonction de leur masse moléculaire. L'étude porte plus précisément sur la caractérisation du peptide présentant la chaîne d'acide aminé la plus courte (16 aa), PONTX-Ae1a. Après l'avoir séquencé, une structure NMR de Ae1a est réalisée (fig. 2). Cette dernière présente deux brins bêta antiparallèles stabilisés par 2 ponts disulfures formant une structure en épingle à cheveux. La présence de 2 ponts disulfures pour un si petit peptide lui confère une forte stabilité, permettant à ce dernier de conserver cette structure tridimensionnelle et ainsi son éventuelle fonction jusqu'à atteindre une cible cellulaire. Etant donné que cette fourmi chasse de petits arthropodes (cicadelles, papillons, cloportes, termites, petites mouches etc...), son venin doit contenir des composants perturbant le système nerveux de tous ces arthropodes. Ils ont donc testé l'activité insecticide de ce peptide, dissous en solution saline, sur la mouche à viande verte *Lucilia cuprina*, un modèle très étudié dans ce contexte (Guo *et al.*, 2018). Après avoir injecté le peptide à 7 doses différentes dans la région ventro latérale du thorax (maximum 2 μ L par mouche), ils ont mesuré l'activité paralytique à 1h et 24h après l'injection. Une paralysie flasque a été observée à 1h et qualifiée de réversible à 24h (PD50= 9 nmol/g). Ils ont également testé ce peptide sur des récepteurs humains d'intérêts thérapeutiques sur cellules endogènes et ont observé une inhibition du $\text{Ca}_v1.3$ humain (Hs $\text{Ca}_v1.3$), mais pas de Hs Ca_v2 . Les antagonistes

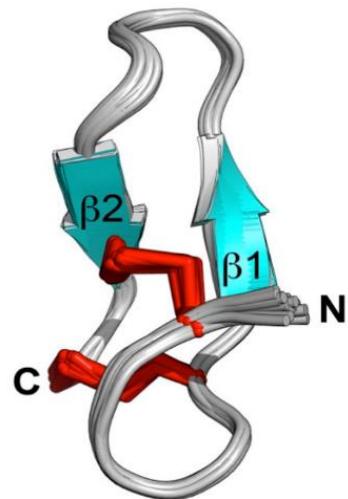
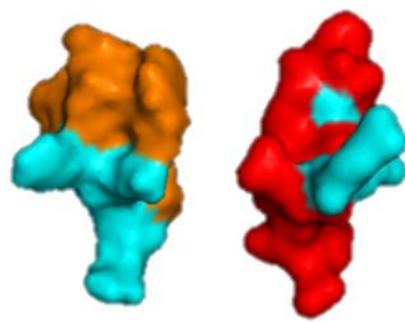


FIGURE 2: STRUCTURE NMR DE AE1A. LES BRINS BETA SONT REPRESENTES EN BLEU, LES PONTS DISULFURES EN ROUGE (TOUCHARD ET AL., 2016)

connus des HsCa_v1 sont de petites molécules amphipathiques modulant l'activité depuis la membrane, comme les dihydropyridines (DHP), les phénylalkamines et les benzothiazépines (Mosa *et al.*, 2021). Les seules molécules connues issues de venin modulant ces récepteurs sont des polypeptides tels que la calciseptine dont le site de fixation est le même que les DHP (Yasuda *et al.*, 1993). Ne présentant pas d'homologie de séquence ou de structure avec ces molécules, il serait donc intéressant de s'intéresser au mode d'action de Ae1a sur les HsCa_v1 et de comparer les effets selon les sous-unités.

Notre modèle d'étude étant *Apis mellifera*, une espèce d'abeille ubiquitaire, on peut s'attendre à un effet du venin et également de ce peptide étant donné la bonne conservation des canaux ioniques au sein des arthropodes (hormis les canaux calciques). De précédentes études du Dr. Touchard nous dirigent cependant vers une activité différente de celle observée chez la mouche (études pour le moment non publiées). De plus, une autre poneritoxine issue de ce venin, PONTX-Ae1d (Ae1d) a été synthétisée en parallèle par Touchard *et al* (2016). Bien qu'étant proche en séquence de Ae1a, Ae1d présente une surface moléculaire différente notamment à cause de la répartition des charges positives des lysines et arginines (fig.3). Il est donc intéressant de comparer leurs activités. Etant donné qu'une activité paralytique a été observée pour Ae1a chez la mouche, on peut s'attendre à un effet au niveau de la transmission synaptique, plus précisément des canaux ioniques. Ce stage va donc porter sur l'étude des effets *in vivo* mais également *in vitro* de ces 2 peptides dans le but de trouver la cible moléculaire à l'origine des éventuels effets physiologiques observés. Dans le contexte de la recherche de modulateurs des canaux ioniques d'abeilles, les travaux sur ce nouveau genre de peptides peuvent amener à la découverte d'outils intéressants. Ce travail a été commencé par Lisa Soussi sur Ae1d uniquement lors de son stage à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM, CNRS) l'année dernière (données non publiées, communication personnelle).



Ae1a	--WCASGCRKKRHGGCSC	16
Ae1d	RSLCSNGCRPKPFGGCSC	18
	* : * *** * * *****	

FIGURE 3: COMPARAISON DES SURFACES MOLECULAIRES DE AE1A (ORANGE) ET AE1D (ROUGE) ET DE LEUR SEQUENCE D'ACIDES AMINES. LES SURFACES CHARGEES POSITIVEMENT SONT REPRESENTEES EN BLEU (PYMOL). SUR LES SEQUENCES, LES ACIDES AMINES CHARGES POSITIVEMENT SONT COLORES EN ROSE (CRUSTAL OMEGA).

II. Matériel et méthodes

A. Application des toxines *in vivo* :

Les butineuses ont été récupérées le matin-même avec des tubes falcon depuis le rucher du laboratoire (d'une même ruche à chaque fois) puis anesthésiées au froid à 4°C. Elles sont ensuite maintenues en contention dans des boîtes à pointe de pipette à l'aide de ruban adhésif pour pouvoir immobiliser la tête et dégager l'ocelle. Sous la loupe binoculaire, cet ocellus est dans un premier temps percé à l'aide d'une micropipette en verre (Drummond MICRODISPENSER 10ul) placée dans le microinjecteur. Ce verre est plus solide que celui des micropipettes utilisées pour les injections (Warner GC150-T10). Quand les ocelles des cinq abeilles contentionnées sont percés, une pipette d'injection contenant la toxine est placée sur le microinjecteur, puis 250nL de la toxine est injecté dans l'ocelle de chacune afin de s'assurer que la toxine atteigne le système nerveux central (fig. 4). Elles sont ensuite placées individuellement dans des boîtes de Pétri munies d'une mangeoire contenant une préparation sucrée leur permettant de se nourrir *ad libitum* pendant 24h. Les boîtes sont ensuite réparties dans une cage montée par l'équipe avec une caméra placée au centre de la face supérieure de la cage (fig.5). Cette caméra permet d'enregistrer les 25 arènes en même temps (5 populations de 5 individus) et ainsi analyser et comparer la mobilité des différentes populations à l'aide du logiciel ToxTrack. Ce logiciel nous permet d'analyser la distance parcourue par chaque abeille, le nombre de pause, le temps de pause, la vitesse moyenne, ou encore l'exploration géographique de leur boîte. Nous avons décidé de réaliser des vidéos de 1min et de commencer par nous concentrer sur 2 paramètres à analyser : le nombre d'abeilles mobiles et la distance moyenne parcourue par abeille. Afin d'évaluer l'impact des différentes étapes du protocole sur la mobilité des abeilles, nous avons comparé les abeilles "type sauvage" (WT, uniquement anesthésiée) avec les abeilles contentionnées uniquement (C), contentionnées avec ocellus percé (CO), et enfin injectées avec de l'eau (COI). Les injections à l'eau ont été nos contrôles quand nous comparions avec les effets de nos toxines. Comme contrôles positifs, afin de s'assurer que nos injections fonctionnaient, nous avons injecté de la tétrodotoxine (TTX) à 3 concentrations différentes.

B. Préparation des ovocytes:

La recherche des cibles moléculaires des toxines a été réalisée par expression des différents canaux et récepteurs d'abeilles disponibles dans des ovocytes de Xénope. Les sacs ovariens ont été préalablement prélevés depuis la Xénope par chirurgie sous anesthésie (Tricaine MS222 à 0, 2% (Sigma Saint-Louis, MO, USA)). Les ovocytes sont par la suite dissociés du sac folliculaire et de leur membrane vitelline dans une solution OR2 avec de la collagénase (type 1A, Sigma-Aldrich, 1mg/mL de Or2) pendant environ 1h30 dans un agitateur rotatif. L'Or2 est une solution présentant des concentrations ioniques et le pH similaires au milieu

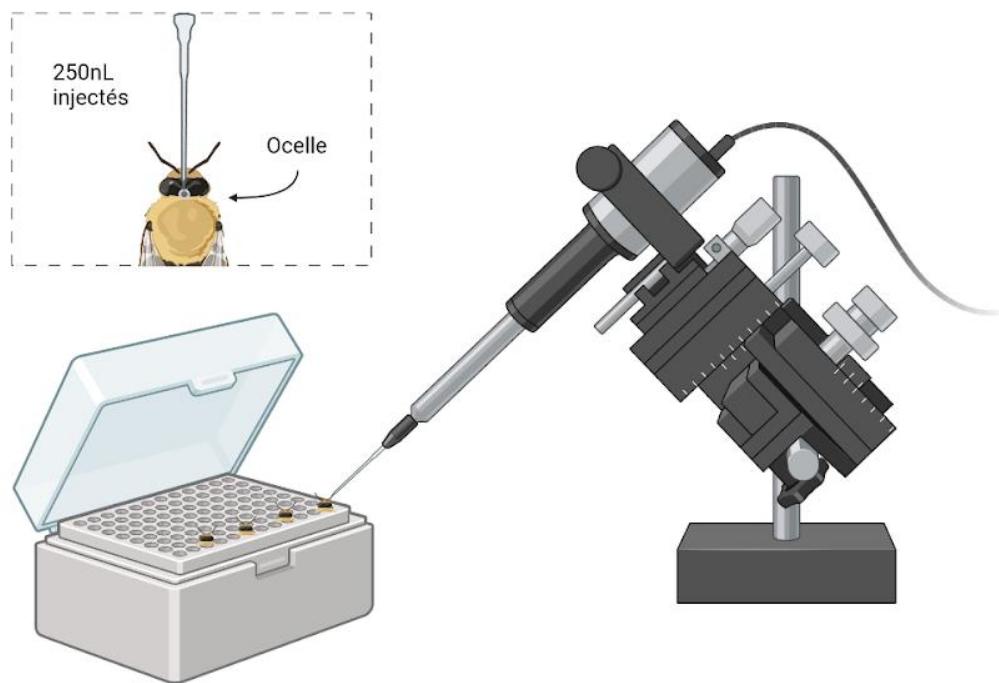


FIGURE 4: SCHEMAS DE L'INJECTION DES ABEILLES, SOUS LA LOUPE BINOCULAIRE, A L'AIDE DU MICROINJECTEUR (BIORENDER).

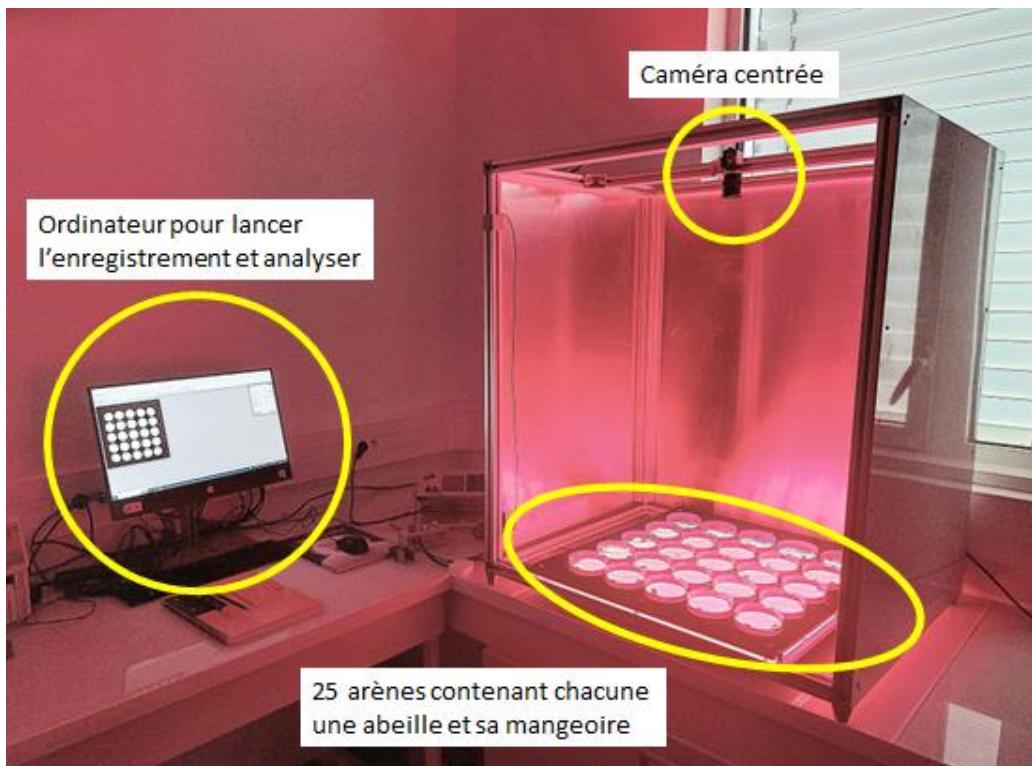


FIGURE 5: PHOTO DU DISPOSITIF D'ENREGISTREMENT DE LA LOCOMOTION DES ABEILLES

extracellulaire naturel des ovocytes. Elle est dépourvue de calcium, ce qui facilite la dissociation. Les ovocytes sont ensuite rincés et triés sous loupe binoculaire avant d'être séparés dans différentes boîtes de pétri (30 à 50 cellules par boîte) afin de garder les cellules viables dans le meilleur état possible. Lors du tri, les ovocytes choisis sont ceux dont la forme est bien sphérique et qui présentent un pôle animal et végétal très distincts, dans le meilleur des cas avec la zone équatoriale blanche nettement visible. Ces boîtes sont remplies de NDS, une solution tampon présentant, en plus des paramètres d'osmolarité adéquats à la survie des cellules, un antibiotique (Gentamicine) et du pyruvate de sodium. Les boîtes sont ensuite placées sur un agitateur orbital dans un incubateur à 18°C.

C. Injection des ovocytes:

Les tubes capillaires en verre (Harward, GC150T-10) sont étirés en 2 micropipettes grâce à l'étireuse verticale (Sutter p-30). L'une de ces micropipettes est insérée dans le microinjecteur construit au laboratoire. La pointe de la micropipette est délicatement brisée contre le fond d'une boîte de pétri afin de l'ouvrir légèrement. Une goutte d'environ 1 μ L d'ARN (ou ADNc) est déposée sur la boîte. Sous la loupe binoculaire, la goutte est alors aspirée par le microinjecteur puis injectée séquentiellement dans une trentaine d'ovocytes (20-30nL injectés par ovocyte). Pour optimiser les chances d'expression de l'ARN, ce dernier doit être injecté dans la zone équatoriale de l'ovocyte afin d'être assez proche du pôle animal (où seront exprimées les protéines) en évitant d'injecter dans le noyau. Pour l'ADNc en revanche, il faut injecter dans le noyau, ce qui est plus compliqué du fait qu'on ne puisse pas voir ce dernier depuis l'extérieur de la cellule (fig. 6). Il faut alors injecter au milieu du pôle animal pour augmenter les chances d'expression (on injecte 10-20nL dans une cinquantaine d'ovocytes dans ce cas). Une fois les ovocytes injectés, on les place dans du NDS et on les laisse incuber quelques jours (un seul pour les récepteurs qui expriment le plus rapidement comme les récepteurs GABA_A d'insecte).

D. Voltage-clamp sur ovocyte de Xénope :

Pour mesurer l'activité des récepteurs, nous avons utilisé la technique du voltage imposé à 2 électrodes. Cette technique permet de mesurer le courant ionique traversant la membrane de la cellule tout en maintenant le voltage à un certain niveau. Pour ce faire, le voltage de l'ovocyte (ou différence de potentiel de part et d'autre de la membrane) est mesuré avec une électrode par rapport à une électrode de bain (matérialisée par un pont Agar dans notre cas), puis le courant nécessaire pour atteindre la valeur de voltage souhaitée est injecté avec l'autre électrode (fig.7). Les ovocytes sont ainsi « clampés » au potentiel de -60mV pour étudier les LGIC et à un voltage qui varie selon le canal exprimé dans le cas des VGIC, ce voltage devant se trouver en dessous du seuil d'activation du récepteur. Le courant injecté pour obtenir le voltage souhaité dépend des différentes résistances mises en jeu (loi d'Ohm) ainsi que du gain de l'amplificateur. L'installation permettant ces mesures

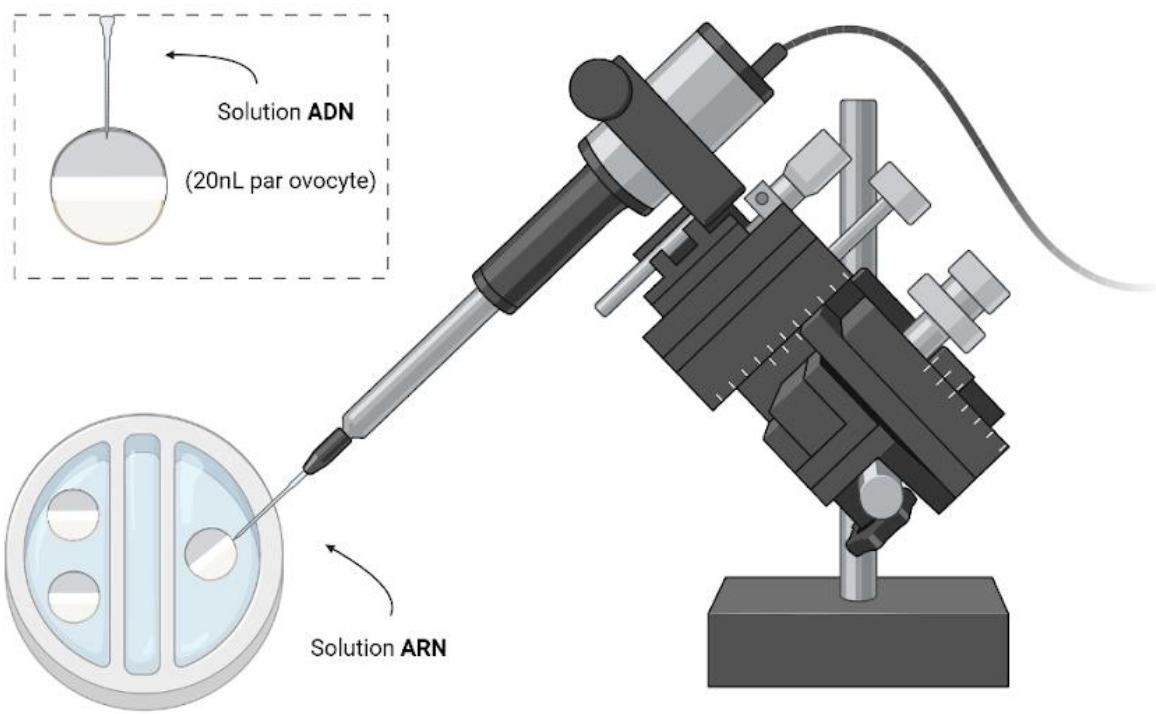


FIGURE 6: SCHEMAS DE L'INJECTION D'ARN ET D'ADN DANS L'OVOCYTE SOUS LE LOUPE BINOCULAIRE (BIORENDER).

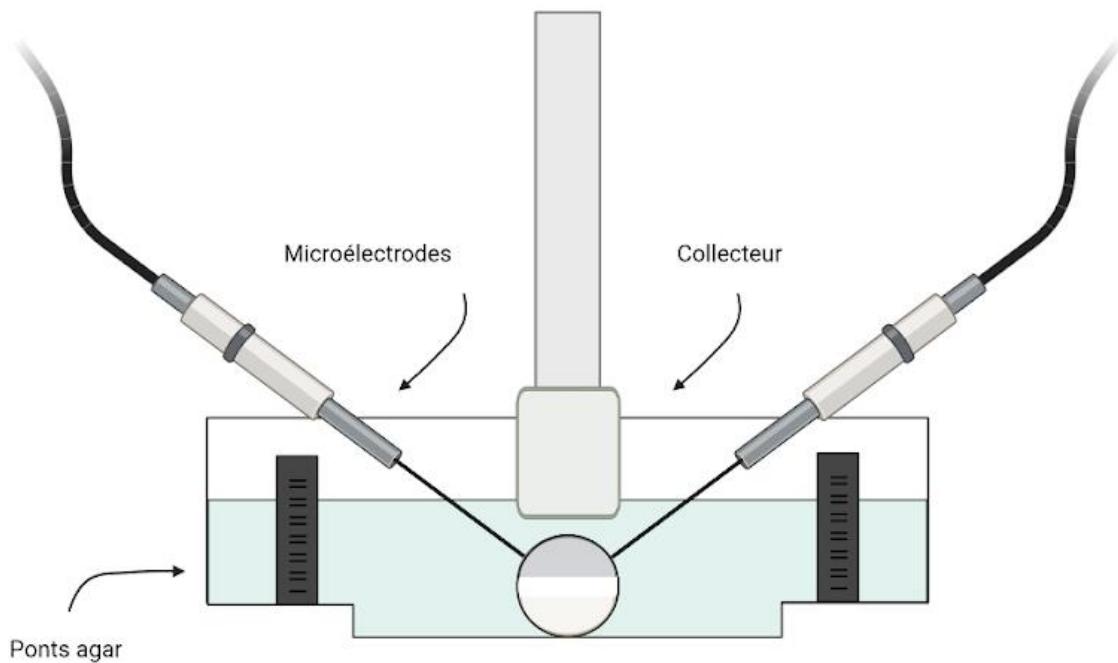


FIGURE 7: SCHÉMAS DU SET-UP TEVC (BIORENDER)

comporte 2 électrodes reliées à un amplificateur GeneClamp 500 ou 500B (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) et à un convertisseur Digidata 1200 ou 1322 (Molecular Devices) qui va numériser les courants enregistrés pour permettre leur stockage dans le logiciel pClamp (Axon Inst, ver. 7 ou 9.0). Les 2 électrodes en verre borosilicate (Warner GC150T10) ont été étirées par l'étireuse horizontale (Suter P93) puis remplies de KCl (3M). Une bonne préparation de ces électrodes (notamment le diamètre d'ouverture de la pointe et l'absence de bulle) doit aboutir à une résistance d'électrode de $0.2\text{M}\Omega$. Elles vont alors empaler l'ovocyte afin de "clamer" le voltage mais également mesurer le courant provoqué par l'ouverture des canaux ioniques. Ces derniers seront ouverts par l'atteinte du voltage nécessaire ou de la fixation d'un agoniste sur le récepteur. Pour ce faire, l'ovocyte est placé dans un bain rempli d'une solution présentant les concentrations ioniques nécessaires à sa survie et optimales à l'étude des canaux. Par exemple, le BANT10 est utilisé pour l'étude des Cav. Le Ca^{2+} est remplacé par du Ba^{2+} pour diminuer la libération de calcium intracellulaire activant les canaux chlorures (ces derniers contaminant fortement le signal). Le bain est ainsi perfusé par gravité à une vitesse d'environ 2 mL/min. 2 électrodes de référence sont connectées au bain de l'ovocyte par des ponts agar-KCl 3M. Une pompe permet le rinçage du bain lors de chaque épisode afin de retrouver les concentrations ioniques initiales du bain (se débarrasser des ions libérés par l'ovocyte).

E. Caractérisation des conductances:

Les différentes conductances des canaux ont été caractérisées afin de déterminer la dose de ligand ou le saut de voltage optimal à utiliser pour tester les toxines. Pour les LGIC, des courbes dose-effet sont effectuées grâce à différentes dilutions réalisées en cascade (en général de 10^{-3} à 10^{-9} M). Elles permettent de déterminer l'EC50, concentration qui sera utilisée pour tester la toxine car elle permet de voir un courant suffisamment grand en limitant sa diminution due à l'inactivation induite par le GABA par exemple. Pour les VGIC, des courbes courant-voltage (IV) et d'inactivation sont obtenues en envoyant différents sauts de voltage, en partant du voltage de repos ou de référence et en envoyant des sauts de voltage dépolarisant (ou hyperpolarisant dans le cas des canaux HCN) d'amplitudes croissantes. Cela nous permet de déterminer la valeur de voltage pour laquelle le pic du courant est le plus grand.

F. Application des toxines *in vitro*:

Pour voir l'effet des toxines sur les LGIC, une application par perfusion du ligand est effectuée, comme pour réaliser les courbes dose-effet, à une concentration proche de l'EC50. Ensuite, cette même solution est appliquée manuellement par "puff" avec une pipette (30 μL appliqués qui correspondent environ au volume du bain). Après au moins deux applications et quand l'effet observé est stable, la même action est réalisée au moins deux fois avec cette fois-ci la toxine diluée à 10 μM dans la même solution de GABA ou ACh. Si un effet est observé, on recommence avec la toxine seule diluée dans la solution du bain. Pour les VGIC, la toxine

est simplement appliquée avec la perfusion arrêtée pendant plusieurs sauts de voltage après avoir effectué quelques “puffs” de solution de bain seule.

G. Traitement des données:

Les traces des courants obtenus sont sauvées et analysées par la suite avec le logiciel Clampfit (Axon Inst, ver 10.5). Nous nous sommes principalement intéressés à la valeur des pics de courants pour la construction de courbes courant-voltage (IV) et de courbes d'inactivation dans le cas des VGIC et de courbes dose-effet dans le cas des LGIC. Ces valeurs sont normalisées par rapport à une trace de référence appartenant à l'enregistrement (valeur du pic de la courbe IV ou de l'effet le plus important sur une courbe dose-réponse) et les courbes IV, d'inactivation ou de doses-effets sont construites individuellement pour chaque ovocyte. Les valeurs caractéristiques de ces courbes (EC50, Ea, Ein, k, Erev...) sont extraites par régressions non linéaires en utilisant les différentes équations de la figure 8 grâce au logiciel Origin ver 6.0. Ces valeurs sont ensuite moyennées pour les n ($n > 5$) ovocytes, extraits d'au moins deux Xénopes, enregistrés dans les mêmes conditions. Une courbe moyenne est aussi construite pour permettre de visualiser l'effet moyen des toxines. Traces et courbes sont assemblées par la suite avec les logiciels Freelance98 (Lotus) ou Powerpoint (Microsoft).

A

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\log(x_0 - x)p)}}$$

B

$$\frac{I}{I_{max}} = Gm * \frac{(V - E_{rev})}{1 + \exp\left(\frac{V - E_a}{k}\right)}$$

C

$$\frac{I}{I_{max}} = R + \frac{(1 - R)}{1 + \exp\left(\frac{V - E_{in}}{k}\right)}$$

FIGURE 8: EQUATIONS DES REGRESSIONS PERMETTANT D'OBtenir LES DIFFERENTS PARAMETRES DE COURANT. (A) DOSE-EFFET : A1 : EFFET LE PLUS FAIBLE (=0) ; A2 : EFFET MAXIMAL (=1) ; P : PENTE. (B) COURBE IV : V : VOLTAGE ; GM : CONDUCTANCE MAXIMALE ; EREV : POTENTIEL D'INVERSION ; EA : POTENTIEL DE 1/2 ACTIVATION ; K : PENTE. (C) COURBE D'INACTIVATION : R : RESISTANCE ; EIN : POTENTIEL DE 1/2 INACTIVATION ; K : PENTE

III. Résultats

A. Effet des toxines *in vivo* :

L'activité insecticide de nos peptides a été évaluée en s'intéressant à la locomotion. Pour cela, nous avons étudié deux paramètres : le nombre d'abeilles mobiles (fig. 9A) et la distance moyenne cumulée en 24h par abeille (fig. 9B). La distance moyenne parcourue a été calculée à partir des valeurs de chaque abeille sur plusieurs expériences. L'expérience a été effectuée 3 fois avec H₂O, 2 fois avec Ae1a, 3 fois avec Ae1d et 1 fois avec les deux peptides à la fois. A chaque expérience, chaque population comptait entre 5 et 8 abeilles. Pour calculer le nombre d'abeilles mobiles, nous avons fait, pour chaque expérience, un % des abeilles mobiles pour chaque population. Nous avons ensuite effectué une moyenne des résultats de nos 3 expériences et déterminé des écarts types afin d'observer la variabilité de nos résultats selon les tests. A la fin des manipulations, les abeilles vivantes étaient relâchées. Que ce soit en termes de nombre d'abeilles mobiles ou de distances moyennes parcourues, il ne semble pas y avoir d'effet significatif de la toxine Ae1a à 2mM par rapport à l'injection d'eau. On observe même une distance cumulée plus grande que pour les contrôles. En revanche, pour ce qui est de Ae1d, on observe une diminution rapide et significative du nombre d'abeilles mobiles dès les premières minutes et ce tout au long des enregistrements. A 1h après l'injection, la distance parcourue en une minute par les abeilles injectées à Ae1d est significativement inférieure aux contrôles ($p=0.004$) d'après le test T de Student. Cet effet est toujours observable le lendemain, mais perd sa significativité ($p=0.173$). L'effet sur la distance parcourue par cette population reste cependant compliqué à extrapoler et à interpréter tant le taux d'abeille immobile est important. En ajoutant à cela que la plupart de ces abeilles étaient mortes le lendemain (mais que certaines ont retrouvé leur mobilité), on peut en conclure que Ae1d semble donc avoir un effet paralysant peu réversible sur les abeilles. La vitesse de la paralysie suggère un effet neuromusculaire. Aucun état convulsif n'ayant été observé, cette paralysie peut être qualifiée de flasque et on peut donc s'attendre à une inhibition de l'activité d'un canal/récepteur impliqué dans l'excitabilité cellulaire. Quand on teste l'effet combiné de nos deux peptides (à 2mM chacune), on observe un effet qui semble plus sévère et rapide que celui de Ae1d seul. Sachant que la concentration de Ae1d est la même que quand elle est seule et qu'elle est associée à Ae1a (qui n'a pas d'effet seule), il semble donc y avoir un effet synergique. Cette expérience n'ayant été réalisée qu'une fois, il est cependant difficile de pouvoir conclure avec certitude.

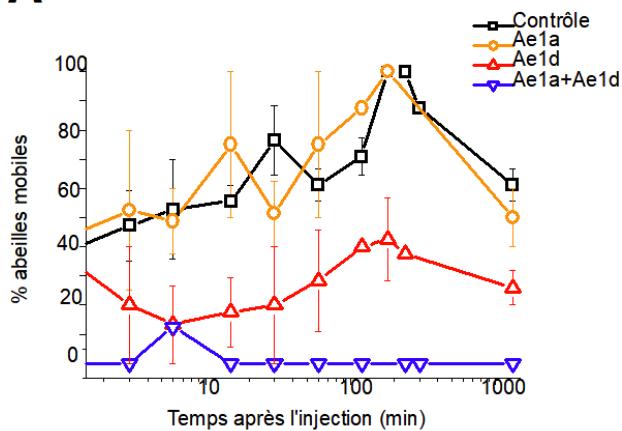
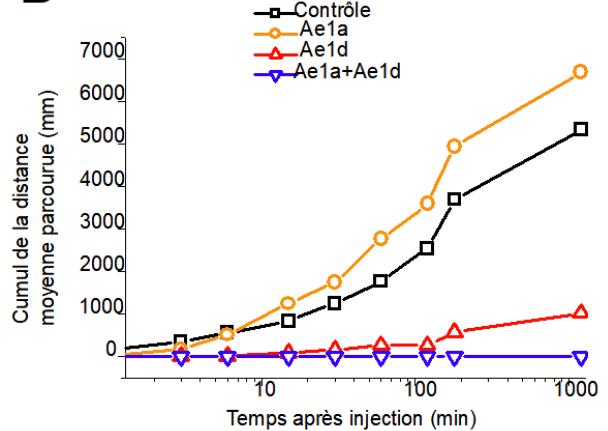
A**B**

FIGURE 9: (A) EFFET DES TOXINES SUR LE NOMBRE D'ABEILLES MOBILES. LES ABEILLES CONTROLES ONT ETE INJECTEES A L'EAU. (B) EFFETS DES TOXINES SUR LA DISTANCE MOYENNE CUMULEE PARCOURUE ABEILLE EN 24H

B. Caractérisation des conductances d'intérêt:

1. Les VGIC:

Avant de tester nos toxines sur les canaux, nous avons commencé par caractériser ceux que nous avions à notre disposition. En effet, certains n'ont pu être obtenus sous la forme d'ADNc répliable, comme le AmNav (para), ou d'autres s'expriment très mal sur ovocyte. C'est le cas de AmCav1 et AmCav2.

Pour les récepteurs calciques, nous avons donc caractérisé AmCav3 et AmCav4. Cav3 est un canal à bas seuil d'activation, que l'on peut retrouver notamment dans le cœur. Son potentiel de $\frac{1}{2}$ activation (Ea) est de -60mV et peut se lire graphiquement sur la courbe courant-voltage (IV) (fig.10B). C'est un canal de type T (pour transitoire) qui s'inactive rapidement (fig.10A), son potentiel de $\frac{1}{2}$ inactivation (Ein) est de -70mV (fig. 10C). Sa conductance maximale (Gm) se situe à -40mV et son potentiel d'inversion (Erev) aux alentours de 40mV. Ce dernier peut se lire en prolongeant la courbe IV, au moment où celle-ci coupe l'axe des abscisses (le courant est alors de 0). Chez l'homme, ces courants sont impliqués dans le rythme du cœur ou encore du thalamus. Cav4 est un canal à haut seuil (Ea=-6mV) d'un type nouveau (fig. 11B). Initialement appelé DSC1, ce canal se trouve finalement être exclusivement perméable au calcium et son rôle chez l'abeille est inconnu. Sa Gm se situe à 10mV, son Erev à 60mV et son Ein vers -50mV (fig.11C). Ces différents paramètres concernent donc des voltages bien moins négatifs que ceux de Cav3, soulignant les différences entre un canal à haut seuil et un canal à bas seuil. Etant donné que ce canal n'est finalement pas un canal sodique et que Am Nav (para) n'est pas disponible, nous avons caractérisé à la place un canal orthologue à ce dernier, le canal sodique voltage-dépendant neuronal de rat (RnNav1.2) que nous avions à disposition. Le courant de ce canal à bas seuil est bien plus rapide que celui d'un calcique (fig.12A), de l'ordre de quelques dizaines de milliseconde seulement. Son Ea est de -50mV, sa Gm à -30mV (fig.12B) et son Ein vers -80mV (fig.12C), des valeurs proches de celles de Cav3, l'autre canal à bas seuil décrits précédemment. Un autre VGIC plus particulier a été caractérisé, il s'agit du canal HCN d'abeille (*Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel*). Comme son nom l'indique, ce canal est activé par l'hyperpolarisation et est perméable aussi bien au sodium qu'au potassium ou au calcium. Il est présent dans le système nerveux central et dans le cœur où il est qualifié de "pacemaker". En effet, son courant est appelé rectifiant entrant cationique et est responsable de la dépolarisation diastolique. Etant donné qu'il est activé par hyperpolarisation et que son courant est entrant (fig.13A), dû au gradient électrochimique des cations auquel il est perméable, il est difficile de déterminer une Ein, ce canal ne s'inactivant pas. Les traces de courant devraient saturer à -170mV, car tous les canaux sont à leur probabilité maximum d'ouverture. Le fait que ce ne soit pas le cas est dû à une diminution de la fuite. Nous n'avons pas eu beaucoup de traces pour ce canal. Cela fausse notre Gm et Ea observées.

Pour terminer avec les VGIC, nous avons caractérisé un canal calcique humain, le HsCav1.2, dans le but de comparer l'activité de nos peptides avec celle observée par Touchard sur HsCav1.3. Ce canal est qualifié de type L (pour *long lasting*) à cause de sa lente inactivation, facilement observable sur les traces (fig.14A). On peut observer qu'en comparaison des autres courants, celui-ci ne diminue quasiment pas tant que le potentiel dépolarisé est maintenu. Son Ea est de -10mV et sa Gm à 10mV (fig.14B), des valeurs proches de celles

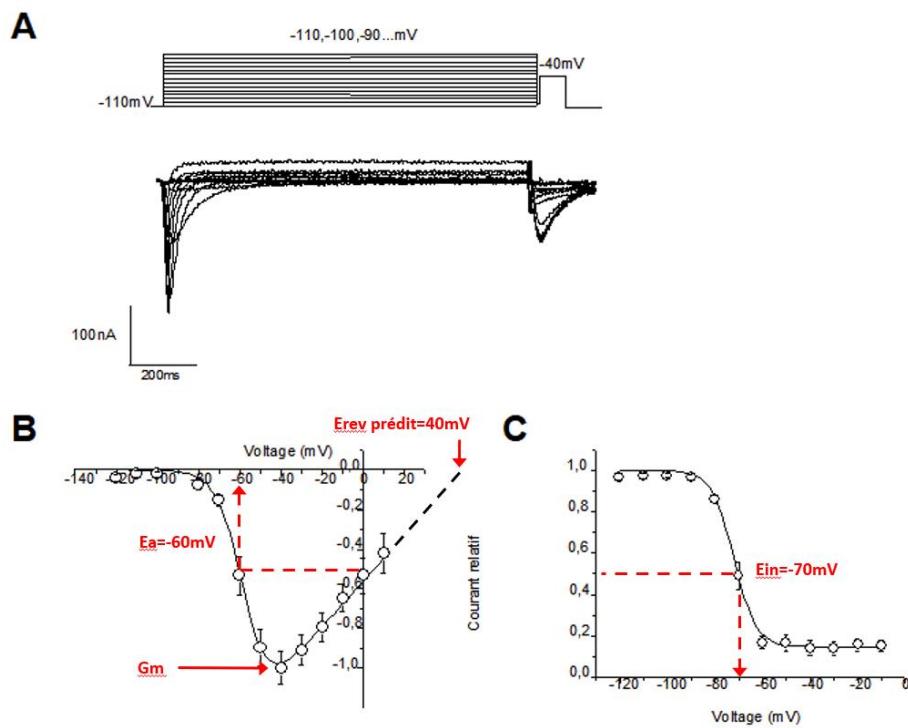


FIGURE 10: CARACTERISATION DE AMCAv3. (A) TRACES DE COURANTS SELON LE VOLTAGE IMPOSE. (B) COURBE IV AVEC AIDE A LA LECTURE GRAPHIQUE DE PARAMETRES DE COURANT. (C) COURBE D'INACTIVATION

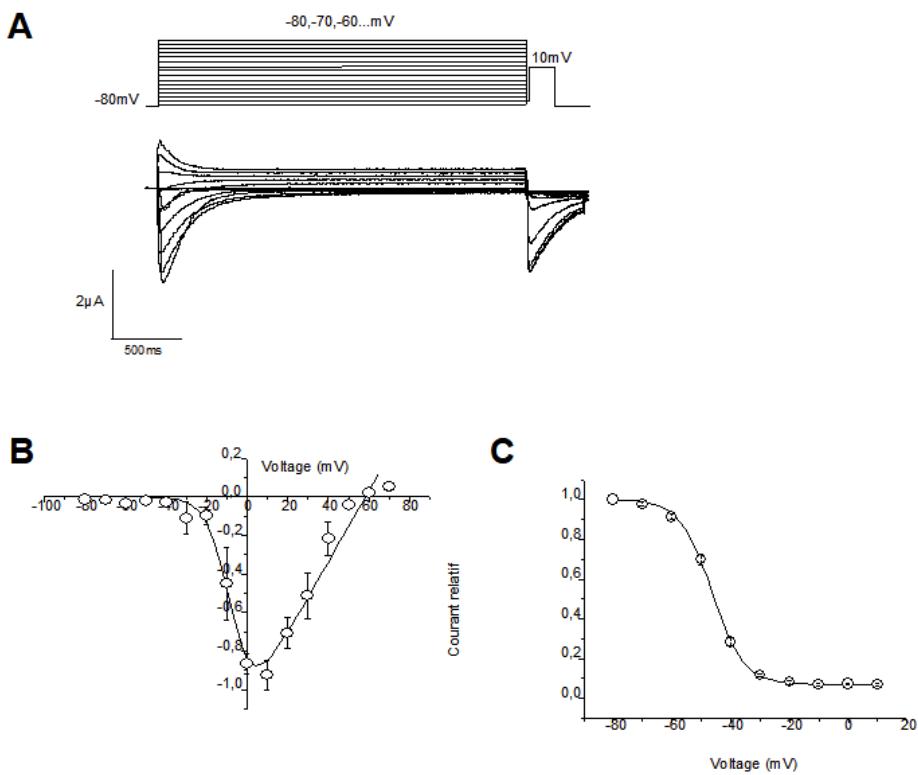


FIGURE 11: CARACTERISATION DE AMCAv4 (A) TRACES DE COURANTS SELON LE VOLTAGE IMPOSE. (B) COURBE IV. (C) COURBE D'INACTIVATION

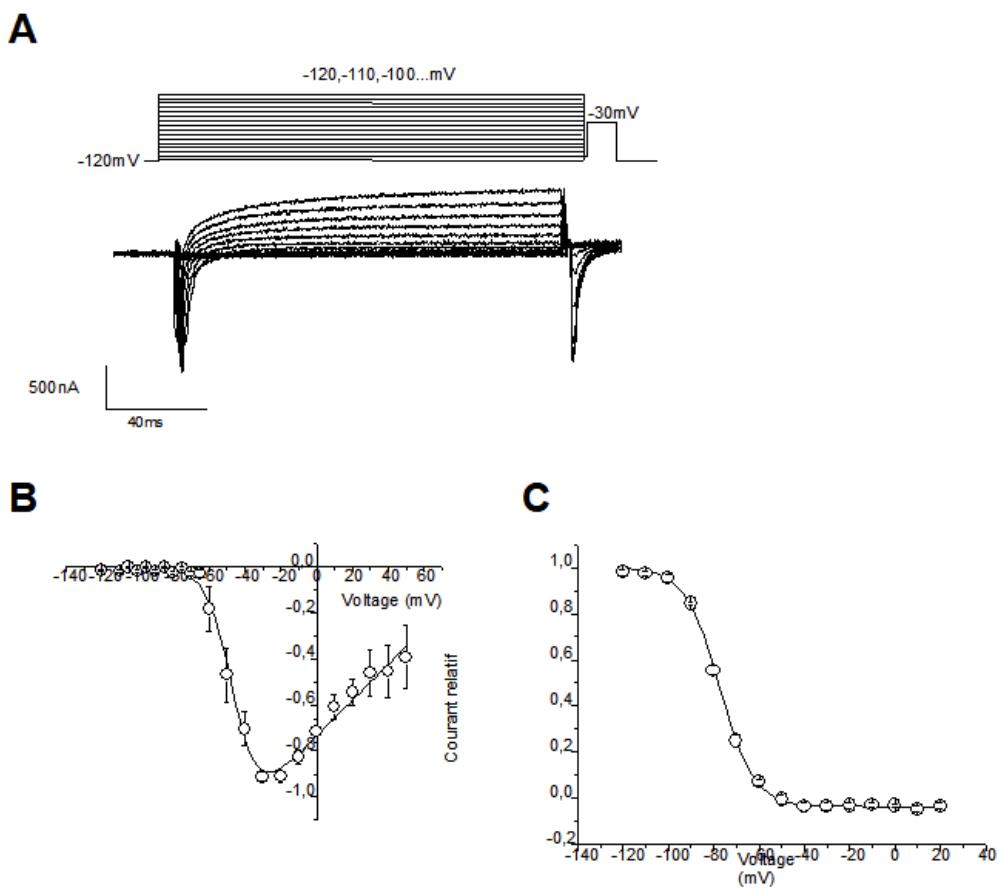


FIGURE 12: CARACTERISATION DE RnNAv1.2. (A) TRACES DE COURANTS SELON LE VOLTAGE IMPOSE. (B) COURBE IV. (C) COURBE D'INACTIVATION

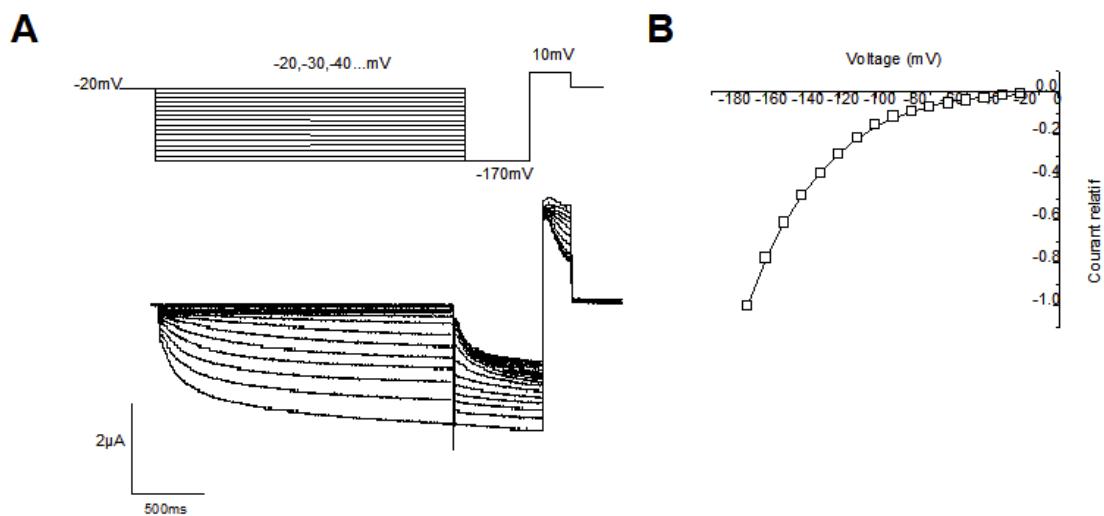


FIGURE 13: CARACTERISATION DE AMHCN. (A) TRACES DE COURANTS SELON LE VOLTAGE IMPOSE. (B) COURBE IV.

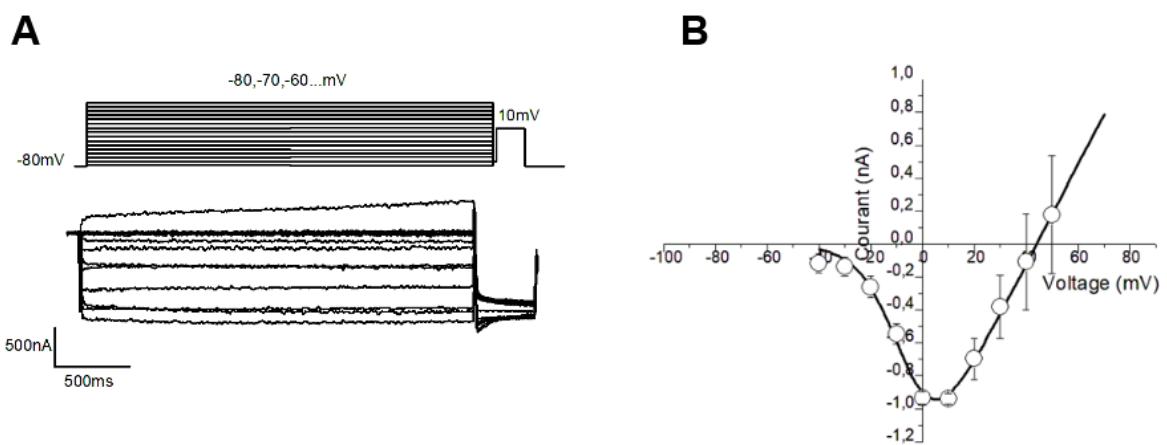


FIGURE 14: CARACTERISATION DE HsCAv1.2. (A) TRACES DE COURANTS SELON LE VOLTAGE IMPOSE. (B) COURBE IV.

d'autres canaux à haut seuil comme Cav4. Son potentiel d'inversion se situe à 60mV. A cause de la mauvaise expression de ce canal, nous n'avons pas eu assez de traces pour obtenir une courbe d'inactivation acceptable.

2. Les LGIC:

Nous avons fait la caractérisation et la comparaison de récepteurs GABAA de différentes espèces (fig.15A) ; *Apis mellifera* (Am), *Aphid pisum* (Ap), *Varroa destructor* (Vd) et *Homo sapiens* (Hs). On peut voir des concentrations efficaces (EC50) proches entre les espèces (fig.15B), de l'ordre de 10 μ M, sauf pour le RDL2 de varroa qui présente une meilleure affinité pour le GABA avec une EC50 de 3 μ M. Les pentes des courbes sont plutôt similaires, celle du RDL d'abeille étant tout de même légèrement moins aiguë, reflétant une affinité de gamme de concentrations plus large pour le GABA. La très mauvaise expression du récepteur nicotinique d'abeille (nAChR) ne nous a pas laissé le temps de le caractériser et d'essayer différentes concentrations d'ACh. Nous avons donc choisi sur la base de la littérature des concentrations d'ACh à 100 μ M ou 1mM, selon l'expression, pour tester nos toxines.

C. Effets des toxines *in ovo*:

1. Perméabilité membranaire et conductances endogènes :

Afin de s'assurer que nos peptides n'étaient pas perméabilisants ou n'avaient pas d'effet sur des conductances endogènes de l'ovocyte, nous les avons testés à 10 μ M sur des ovocytes "contrôles" injectés à l'eau. Les toxines ont été appliquées de la même manière que pour les essais sur ovocytes exprimant un canal/récepteur. Nous avons dans un premier temps simplement appliqué la solution de bain manuellement de la même façon que nous avons appliqué la toxine par la suite. Le courant de fuite que nous avons observé était le même dans les deux cas, ce qui nous indique donc qu'il n'y a pas d'effet de nos peptides sur l'ovocyte en lui-même (fig.16A).

2. VGIC:

Nous avons ensuite testé ces peptides sur les canaux calciques dont nous arrivions à obtenir l'expression ; Cav3 (fig.16B) et Cav4 (fig.16C). Nous les avons testés à 10 μ M car c'est la dose qui a été testée précédemment.

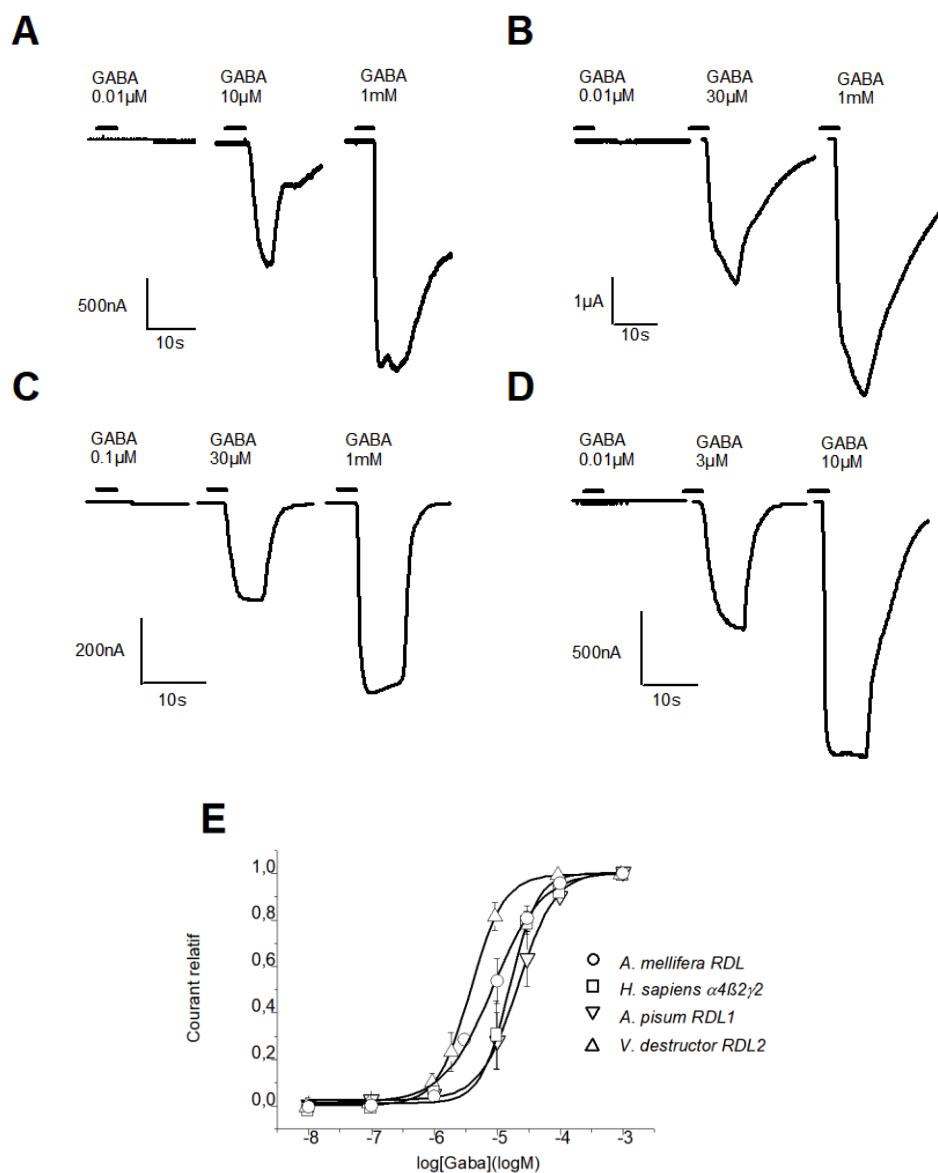


FIGURE 15: CARACTERISATION DE RECEPTEURS GABA. TRACES DE COURANTS SELON 3 DOSES

DE GABA APPLIQUEES POUR AmRDL (A), HsGABAA (B), APRDL1 (C), VdRDL2 (D). (E)

COMPARAISON DES COURBES DOSE-EFFET

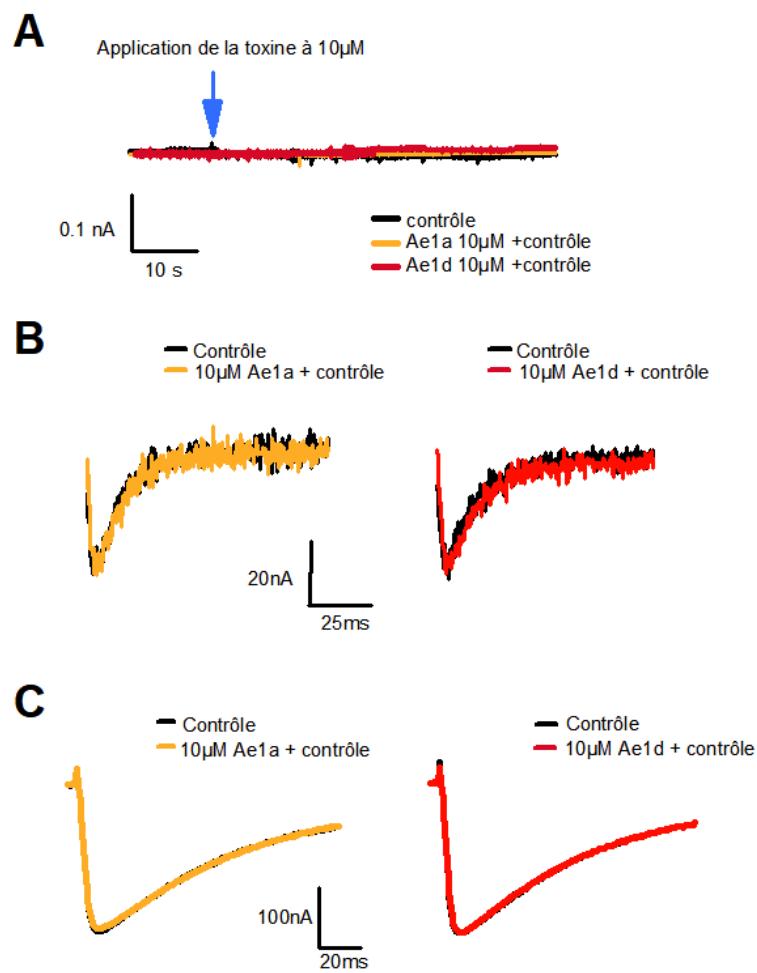


FIGURE 16: EFFETS DES TOXINES SUR : (A) LES CONTROLES, (B) AMCAv3, (C) AMCAv4.

En effet, l'EC50 sur le HsCav1.3 observé par Touchard *et al.* étant d'environ $4.5\mu\text{M}$, nous pouvons donc nous attendre à une dose aussi élevée nécessaire pour voir un effet sur nos canaux. Nous n'avons pas vu de différence significative entre l'application de solution de bain ou de nos toxines sur Cav3, que ce soit au niveau de l'amplitude du courant ou encore de ses cinétiques. Nous avons eu les mêmes résultats pour Cav4. Les différences qu'il pouvait nous arriver d'observer étaient principalement dues à la diminution du courant de fuite entre les épisodes et n'étaient pas reproduites d'un ovocyte à l'autre. Cav1 et Cav2 étant très compliqués à exprimer, nous n'avons pas pu obtenir de résultats sur ovocyte pour ces canaux. Cependant, une application de nos peptides a pu être réalisée sur des cellules cardiaques d'abeille en patch-clamp grâce à l'intervention d'une doctorante de l'équipe. En raison de la quantité de toxine que nous avions à disposition, elles ont été appliquées à des concentrations plus faibles, ici à $4\mu\text{M}$. Bien que cela soit plus faible que les $10\mu\text{M}$ que nous appliquons jusqu'ici, cela reste en théorie suffisamment concentré pour voir un effet s'il doit y en avoir un. Des bloqueurs ont été utilisés pour les canaux potassiques et les toxines ont été essayées avec une rampe de voltage, c'est-à-dire une dépolarisation graduelle afin d'étudier plusieurs canaux selon leur seuil d'activation. Les premiers canaux ouverts sont les canaux à bas seuil, avec une Gm vers -40mV , comme le Cav3 puis les canaux à haut seuil, comme le Cav1, sont ouverts avec une Gm vers 0mV . On ne voit pas d'effet significatif des toxines sur le courant observé sur les rampes, ni sur le protocole à 2 sauts de voltage (un à -40mV pour les bas seuils et un à 0mV pour les hauts seuils). Cette expérience n'ayant été réalisée qu'une fois, ce résultat ne peut être qu'indicatif. Enfin, nous avons testé nos deux peptides sur HsCav1.2. Nous n'avons observé aucun effet des deux (fig.17). Ce canal exprimant mal, du fait que l'injection d'ADN soit plus compliquée, nous n'avons pu essayer que sur deux ovocytes. Il nous reste donc à vérifier l'effet observé sur HsCav1.3 par Touchard *et al* (2016), cette fois-ci en expression hétérologue, puis éventuellement sur HsCav1.1 et HsCav1.4. Pour HCN et RnNav1.2, nous avons manqué de temps pour passer nos toxines sur ces canaux et le ferons dans les prochains jours.

3. LGIC

Nous avons ensuite testé nos peptides sur le récepteur GABA A RDL d'abeille (fig.18A) et n'avons observé aucune différence significative de courant quand nous appliquons la toxine avec le GABA. Les traces des courants pouvaient beaucoup varier selon l'angle et la position exacte que nous prenions lors de l'application manuelle de la solution. En revanche, cela n'avait que peu d'impact sur l'amplitude du courant, paramètre que nous avons utilisé pour nos résultats. De la même façon, nous avons regardé s'il pouvait y avoir un effet des toxines de fourmis sur les récepteurs RDL2 de Varroa (fig.18C) et RDL1 de puceron (fig.18B). Tout comme pour AmRDL, nous n'avons observé aucune différence d'amplitude du courant lorsque la toxine était appliquée avec le GABA A. Après de nombreuses tentatives, nous avons réussi à exprimer Am nAChR et à essayer nos toxines sur 5 ovocytes exprimant ce récepteur (fig.19). Aucune des 5 amplitudes de courants observés avec la toxine n'a significativement différé de celles des contrôles. Nous avons choisi de comparer

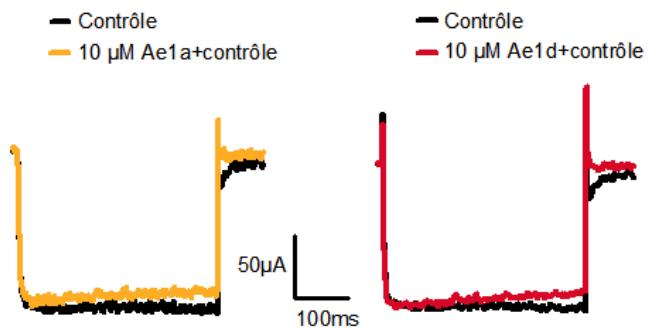


FIGURE 17: EFFETS DES TOXINES SUR HsCAv1.2.

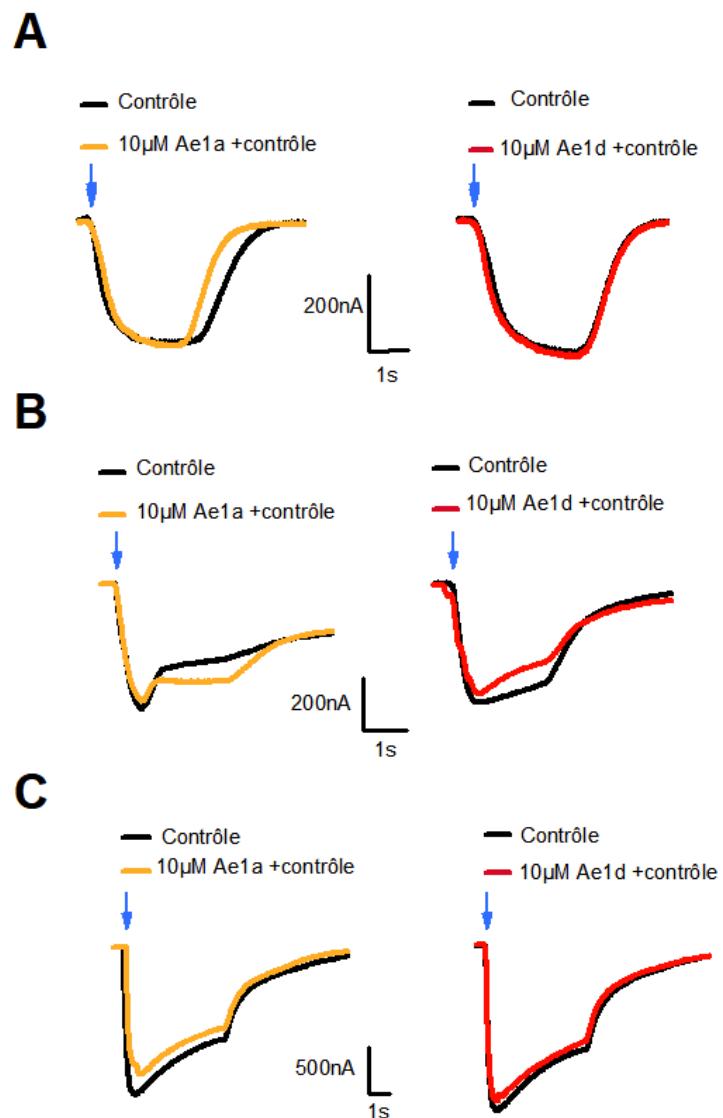


FIGURE 18: EFFETS DES TOXINES SUR (A) AMRDL, (B) APRDL1, (C) VdRDL2.

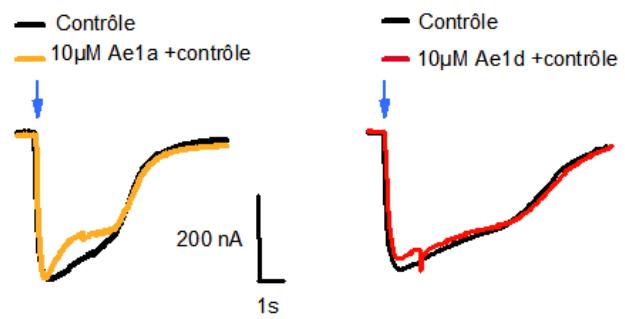
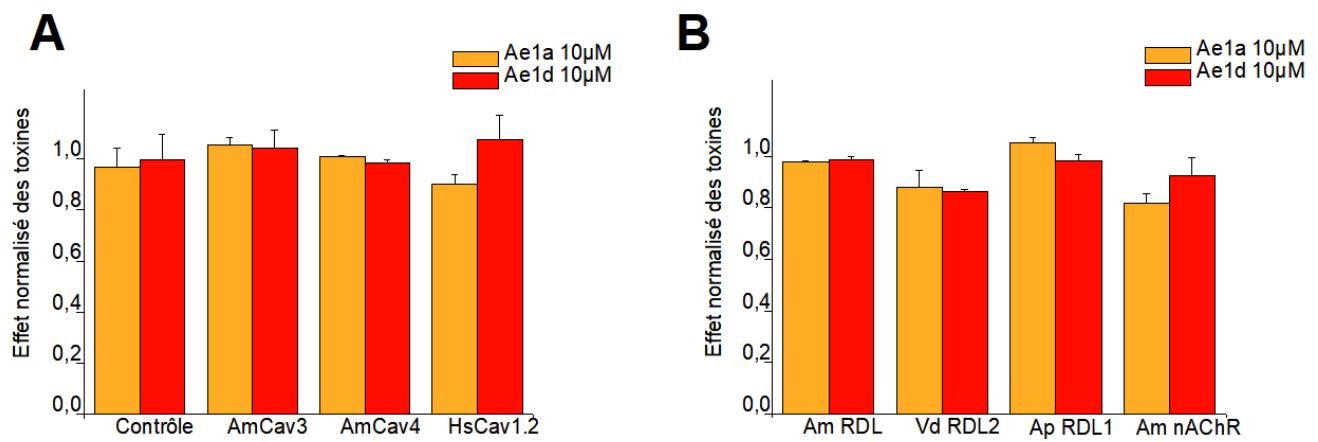


FIGURE 19: EFFETS DES TOXINES SUR AM NACHR.

nos résultats sous la forme d'histogrammes représentant la moyenne du rapport “courant avec la toxine/courant sans la toxine” (fig.20). Sachant ici que les valeurs des histogrammes sont toutes proches de 1, soit la valeur pour laquelle les deux courants sont égaux, il est rapidement observable qu'il n'y a pas d'effet sur ces canaux. Les petites tailles des barres d'erreur reflètent la robustesse des résultats et le nombre suffisant d'essais effectués.



IV. Discussion

A. Le protocole d'étude *in vivo* :

La mise en place du dispositif d'enregistrement des abeilles ainsi que son bon fonctionnement ont pris plusieurs semaines avant d'aboutir. Après que la structure de la cage ait été montée et mise en place à partir des pièces qui avaient été commandées, il a fallu prendre en main le logiciel Toxtrack. Ce logiciel était nouveau pour l'équipe et le plus difficile a été de trouver les bons paramètres pour que chaque arène soit analysée de la même manière. En effet, en dépit d'un calibrage de la vidéo éliminant l'effet "grand angle" de la caméra, les arènes situées sur les extrémités présentaient des ombres dans lesquelles les abeilles se confondaient. L'outil d'analyse supprimait alors les déplacements effectués dans ces zones. Pour cela, nous avons dû jouer avec la géométrie de l'installation, en particulier de la plaque maintenant les 25 arènes en place. Nous avons également effectué différents tests contrôles dont nous n'avons pas exposé les résultats. La manipulation n'a été réalisée qu'une fois, mais nous avons pu observer qu'il ne semblait pas y avoir d'effet des différentes étapes du protocole. Si cela avait été le cas pour l'injection d'eau par exemple, nous aurions pu essayer d'injecter de la lymphe pour voir s'il n'y avait pas un effet de l'eau ultra pure. Nous avons également fait varier l'accès à la nourriture, en commençant par des mangeoires remplies de solutions sucrées plus ou moins concentrées puis de la nourriture solide. Nous en sommes arrivés à la conclusion que la nourriture solide était la meilleure option pour un accès *ad libitum* permettant la survie des abeilles jusqu'au lendemain. Pour ce qui est de l'injection des abeilles, la méthode utilisée est imprécise et le fait de maintenir les abeilles en contention et de leur injecter les toxines peut questionner éthiquement sur la possibilité de trouver d'autres stratégies. Il a bien été établi dès les premiers jours de manipulation que cette méthode n'était pas parfaite et que trouver des alternatives pourrait réduire le stress des abeilles et améliorer la qualité des résultats. Exposer les abeilles au peptide par ingestion et utiliser un vecteur pour lui faire atteindre le système nerveux central pourrait être une solution envisageable. La Lectine de Perce-Neige a par exemple déjà montré qu'elle pouvait exercer ce rôle (Fitches *et al.*, 2012). La méthode d'analyse employée a également montré quelques limites. En effet, lorsque les abeilles se nourrissent, elles restent à la mangeoire, à laquelle elles se confondent. Lors des premières minutes d'enregistrement, elles viennent d'être soumises à un stress dû à la manipulation et vont donc passer plus de temps à se nourrir et ne sont pas détectées par l'outil d'analyse des déplacements. Une abeille immobile n'est donc pas nécessairement paralysée. L'expérience a de ce fait été réalisée plusieurs fois afin d'augmenter la robustesse des résultats. Comme ce paramètre peut grandement faire osciller la courbe de la distance moyenne parcourue, nous avons choisi de représenter cette variable de manière cumulée. Ainsi, nous avons une vue plus générale du déplacement des abeilles, tout en pouvant avoir une idée du déplacement moyen à chaque temps, selon la pente entre deux points. Quoi qu'il en soit, le travail sur l'optimisation de notre dispositif d'étude des effets *in vivo* nous a permis d'obtenir de premiers résultats satisfaisants quant aux effets des toxines sur les abeilles.

B. L'activité insecticide de Ae1a:

Pour commencer, nous avons confirmé que Ae1a à 2mM n'avait pas d'effet sur les abeilles. C'est en accord avec les précédentes études (non publiées) réalisées par Dr Touchard. En effet, Dr Touchard a observé les premiers effets sur les abeilles (un ralentissement) à une dose de 100nmol/g, dose bien supérieure à la nôtre. Nous avons injecté 250nL de toxine à 2mM dans chaque abeille. Sachant qu'une abeille pèse en moyenne 110mg, cela nous fait donc une dose de 4,54 nmol/g ($250\text{nL} \times 2\text{mM} / 110\text{mg} = 4.54\text{nmol/g}$). A titre de comparaison, la DL50 de l'imidaclopride par voie orale chez l'abeille se situe aux alentours de 0.6nmol/g (Suchail *et al.*, 2001). Sur la mouche, la dose paralysante 50 (PD50) observée est de 9nmol/g et se rapproche donc davantage de la dose que nous avons utilisée. Bien que cette dernière reste plus faible, des effets sont déjà visibles à cette dose sur les mouches. De plus, sachant que nous avons injecté directement dans le système nerveux central, nous supposons que la concentration du peptide pouvait atteindre sa cible moléculaire est plus élevée et donc suffisante pour avoir des effets observables. Cela permet également une meilleure comparaison avec les effets observés chez la mouche ou avec l'autre peptide. On peut donc déduire que Ae1a agit sur une cible chez la mouche qui est probablement différente, voire absente chez l'abeille. Étant donné le faible nombre d'enzymes de détoxification des abeilles par rapport aux mouches (50% de gènes codant pour ces enzymes en moins chez l'abeille), il est peu probable que le manque d'effet d'Ae1a soit dû à l'élimination du peptide (Weinstock *et al.*, 2006). En revanche, on pourrait se demander si l'effet toxique observé ne serait pas celui d'un métabolite secondaire produit par des enzymes de la mouche que l'abeille n'aurait pas. On sait par exemple que de nombreux médicaments peuvent avoir des effets secondaires néfastes sur l'organisme à la suite de la bioactivation de métabolites (Par *et al.*, 2005), de même pour certains néonicotinoïdes comme le thiamétoxame.

C. L'activité insecticide de Ae1d:

Pour Ae1d, nous avons observé une paralysie flasque rapide chez l'abeille. Dr Touchard avait également observé une paralysie flasque, avec une PD50 de 1nmol/g chez l'abeille. Nous avons ici observé entre 70 et 80% de paralysie avec une dose plus élevée, qui ne s'est quasiment pas montré réversible. Il est important de souligner que nous perdons la significativité de nos résultats à 24h, mais que cela dépend également de la diminution de la mobilité des contrôles. On sait que cela peut être dû à de nombreux paramètres, comme le moment où la vidéo est prise (si plusieurs abeilles mangent par exemple), ou encore l'âge des abeilles (nos abeilles sont prises sur la planche d'envol et leur âge n'est donc pas connu). On peut se demander si cette réversibilité est due ou non à la manière d'injecter. Il serait intéressant de voir si, avec cette méthode d'injection, les abeilles retrouvent toutes la mobilité dans les 24h, comme pour les mouches avec Ae1a. L'ACh est le principal neuromédiateur central chez l'insecte (Grünwald & Siefert, 2019) alors que le Glutamate est responsable de la transmission neuro-musculaire. Nos précédents résultats *in ovo* de l'équipe laissaient penser que la cible de Ae1d était le nAChR, suggérant un effet central. La rapidité de la paralysie

observée suggère quoiqu'il en soit que le peptide agit au niveau de la transmission synaptique neuromusculaire. Le fait que la paralysie puisse être qualifiée de flasque laisse penser à une inhibition de l'activité d'un canal ionique impliqué dans l'excitabilité cellulaire, ou encore éventuellement à une potentiation d'un canal inhibiteur, comme un récepteur GABA par exemple. Etant donné qu'aucun effet de ce peptide à 548nmol/g n'avait été observé chez la mouche, on peut en conclure qu'il existe une différence interspécifique entre la mouche et l'abeille au niveau de la cible de Ae1d.

D. L'activité insecticide de Ae1a+Ae1d :

La combinaison des deux peptides a été testée une fois *in vivo* sur les abeilles et semble montrer un potentiel effet synergique. Cette expérience n'ayant été réalisée qu'une fois, il est cependant nécessaire de la refaire plusieurs fois pour valider ces résultats. S'il devait y avoir un effet synergique de nos peptides, il serait intéressant de comprendre comment ils interagissent entre eux pour augmenter cet effet. Etant donné que Ae1a seul n'a pas d'effet à 2mM, peut-être que ce peptide a un effet sur sa toxicocinétique. On peut supposer que Ae1a agisse comme un vecteur permettant à Ae1d de mieux atteindre sa cible, ou bien éventuellement à réduire son élimination par exemple (Paillard, 2009). D'autres études à venir seront réalisées avant d'approfondir ce sujet. Il reste que nos deux peptides, pourtant relativement proches au niveau de la séquence, ont des effets différents sur la mouche et sur l'abeille. Trouver leurs cibles moléculaires pourra permettre de comprendre les différences au niveau de ces cibles entre l'abeille et la mouche, et ainsi mieux caractériser leurs fonctionnements et leurs rôles chez ces deux espèces.

E. Effets des toxines sur les VGIC :

Premièrement, tester les peptides sur des ovocytes contrôles nous a permis d'écartier l'hypothèse de toxines formeuses de pores comme on peut en retrouver dans certains venins d'araignée (Orlova *et al.*, 2000). Etant donné la moins bonne conservation des récepteurs calciques au sein des arthropodes par rapport aux autres types de canaux, nous avons commencé par tester nos toxines sur eux. Le Cav1 n'a été testé qu'en patch-clamp sur des cellules cardiaques et nous n'avons pas eu assez de résultat pour en ressortir des données exploitables. Il ne semble cependant pas y avoir d'effet des toxines dessus. Nous avons donc caractérisé Cav3, le canal de type T et Cav4, le canal d'un genre nouveau, proche du DSC1 mais perméable spécifiquement au calcium. Nous avons obtenu des courbes IV et d'inactivation proches avec celles de la littérature, même si un plus grand nombre de répliques nous aurait plus précisément rapproché de ces valeurs (Gosselin-Badaroudine *et al.*, 2016). Pour Cav3 et Cav4, nous avons n'avons pas vu d'effet sur les conductances en expression hétérologue, ce qui semble donc éliminer les Cav des potentielles cibles. Cav4 n'étant présent que chez l'abeille, il aurait pu être la cible de Ae1d, et DSC1 la cible de Ae1a. En effet, bien que ces deux canaux se ressemblent beaucoup, certains antagonistes de DSC1 n'ont pas d'effet sur Cav4, comme la tétrodotoxine.

Trouver deux peptides agissant respectivement sur ces deux canaux spécifiquement aurait donc offert l'opportunité de comprendre davantage ce qui sépare DSC1 et Cav4. En ce qui concerne Cav2, nous n'avons pas pu l'exprimer chez l'ovocyte pour le moment et attendons donc de prochains résultats de caractérisation et d'application de toxines.

Pour le Nav (para), il n'est pour le moment pas possible de l'étudier en expression hétérologue, nous avons donc caractérisé le Nav1.2 de rat, un canal orthologue du Nav (para) de la drosophile et donc de celui de l'abeille en théorie. Nous avons trouvé les paramètres d'activation et d'inactivation attendus et savons donc quels voltages nous utiliserons. Un blocage de ce canal pouvant aboutir à une paralysie similaire à celle que nous avons observé, il reste une potentielle cible de Ae1d. Nous allons donc essayer les toxines dessus pour voir si nous pourrions nous attendre à un effet sur le Nav d'abeille. Une prochaine étude pourrait également consister à tester les toxines sur ce canal en patch-clamp sur neurones d'abeille. En bloquant les canaux nécessaires et par élimination, nous pourrions déterminer si un effet serait dû à ce canal. De même, nous avons caractérisé AmHCN sans avoir pu essayer les toxines dessus pour le moment. Les précédents résultats de l'équipe ne nous laissent cependant pas nous attendre à un effet. Ce canal ayant la particularité d'être activé par hyperpolarisation, les paramètres à en sortir sont différents de ceux des autres canaux dépolarisant le potentiel membranaire lorsqu'ils sont ouverts. Ce canal est activé par l'hyperpolarisation suivant la repolarisation à la suite d'un potentiel d'action. Après être activé, il dépolarise la cellule jusqu'à atteindre le seuil d'activation des autres VGIC (son potentiel d'inversion se situant aux alentours de -20, -30mV), il est donc qualifié de "pacemaker". Moduler l'activité de ce canal pourrait donc perturber la notion de rythme du cœur ou de certaines régions du cerveau comme le thalamus (Biel *et al.*, 2002). On pourrait imaginer que cela puisse causer une syncope à l'abeille (si le cerveau n'est pas assez oxygéné), la rendant immobile quelques minutes pour certaines, la tuant pour d'autres.

De plus, en parallèle, nous voulions approfondir les observations qu'a observées le Dr Touchard sur le canal humain Cav1.3. Les Cav1 étant généralement bloqués par de petites molécules amphipathiques comme les DHP, trouver un modulateur de ces canaux chez de si petits peptides très hydrophiles peut amener à des découvertes thérapeutiques intéressantes. Nous avons donc voulu caractériser plusieurs types de Cav1 afin d'essayer Ae1a dessus. Cette partie de l'étude étant secondaire, nous n'avons pour le moment eu le temps de caractériser que Cav1.2 et de passer les toxines dessus deux fois. Exprimer ce canal nécessite d'injecter non pas de l'ARN mais de l'ADN, ce qui est plus compliqué. En effet, il s'agit ici d'injecter dans le noyau, ce qui est plus hasardeux sachant qu'il n'est pas visible de l'extérieur. Le taux d'expression a donc été très bas, ce qui a freiné l'obtention des résultats. Nous n'avons pas observé d'effet de nos toxines sur Cav1.2, ce qui laisse suggérer que l'effet observé pourrait être propre à Cav1.3. Nous allons donc vérifier sur les autres Cav1 et également sur ce canal l'activité observée par Touchard *et al.* (2016) en expression hétérologue, cette fois.

F. Effets des toxines sur les LGIC

Nous avons également caractérisé le récepteur GABA_A RDL d'abeille. En effet, les récepteurs GABA, s'ils sont atteints, peuvent être impliqués dans une paralysie, comme c'est le cas de l'ivermectine sur les nématodes ou encore du fipronil. Nous avons donc réalisé des courbes dose-effet du GABA sur ce récepteur et avons fait de même avec d'autres récepteurs GABA, un de varroa, de puceron et d'humain. Les courbes réalisées sont en accord avec celles des précédentes caractérisations de ces récepteurs, avec des EC₅₀ similaires à celles attendues. Cela nous a notamment permis d'observer une meilleure affinité du VdRDL2 pour le GABA. Nous avons appliqué nos toxines sur ces récepteurs et n'avons observé aucun effet. Ces manipulations ont permis de déterminer s'il y avait une activité de modulation allostérique ou encore de compétition vis-à-vis du GABA, mais pas de savoir si nos peptides pouvaient agir seuls sur ces récepteurs. En effet, ils auraient pu avoir une activité sur le récepteur, mais présenter une affinité moindre que celle du GABA. Cependant, en raison de la faible quantité de toxine que nous avions à disposition, ces études n'ont pas pu être réalisées. Cela a donc pas permis d'éliminer complètement le RDL d'abeille des potentielles cibles de Ae1d. L'intérêt de tester sur les autres récepteurs que nous avions caractérisés était de voir si l'on pouvait éventuellement trouver une molécule ciblant un canal de varroa ou de pucerons sans avoir d'effet sur celui de l'abeille. En effet, le varroa étant un parasite des abeilles et le puceron un ravageur, les recherches de composés agissant sur ces espèces exclusivement sont une solution envisagée pour lutter contre ces espèces.

L'autre LGIC d'intérêt sur lequel nous souhaitons essayer nos toxines est le nAChR d'abeille. En effet, d'après quelques précédents résultats de l'équipe et nos résultats jusqu'ici, il semblait être la cible de Ae1d. Finalement, nos tentatives nous ont permis d'affirmer que Ae1d n'avait pas d'effet sur Am nAChR et donc que sa cible était ailleurs. Les résultats précédents *in ovo* sur ce récepteur n'avaient été obtenus qu'en très faible quantité (2 ovocytes). De plus, le courant observé dépend parfois uniquement de conditions expérimentales comme le moment ou la position exacte à laquelle on applique la toxine. Il était donc bien nécessaire de vérifier ces manipulations. Nous avons donc éliminé plusieurs canaux et récepteurs de la liste des potentielles cibles de Ae1d. Nos prochaines recherches porteront sur Cav2, Nav, le récepteur au glutamate et les canaux humains de type L. Évidemment, même si l'hypothèse d'un canal ionique comme cible reste probable, la cible peut se trouver ailleurs. Si nous parvenons à l'identifier, cela pourrait nous aider à comprendre les différences entre la mouche et l'abeille au niveau de cette cible, sur la base des relations structure-fonction notamment. D'un autre côté, cela appuie également le fait qu'il faille chercher ailleurs des molécules capables de moduler les différents canaux que nous avons évoqué afin de les étudier. La piste de peptides issus de venins, bien que fastidieuse, reste rationnellement intéressante et prometteuse et pourrait présenter de nouvelles opportunités dans ce domaine.

V. Conclusion-Perspectives

Notre étude a donc caractérisé les effets *in vivo* de deux très petits peptides à ponts disulfures issus du venin de la fourmi guyanaise *Anochetus emarginatus* (fig.21). Elle nous a permis d'affirmer que Ae1a, une toxine causant une paralysie réversible sur la mouche *Lucilia cuprina*, n'avait pas d'effet sur l'abeille européenne *Apis mellifera*. En revanche, un autre peptide issu de ce même venin, Ae1d, a montré un effet paralytique peu réversible sur l'abeille alors qu'il n'avait montré aucun effet sur la mouche. Ces deux peptides sont pourvus de deux ponts disulfures leur conférant une grande stabilité. Bien qu'ils soient proches au niveau de leurs séquences d'acides aminés, ils présentent cependant deux surfaces moléculaires différentes, notamment au niveau des charges positives. On suppose que ces surfaces sont à l'origine de la différence d'effets observés entre la mouche et l'abeille et nous sommes donc partis à la recherche de leurs cibles moléculaires.

La vitesse de la paralysie et son caractère flasque suggèrent une action au niveau des canaux ioniques impliqués dans la transmission synaptique et l'excitabilité cellulaire, au niveau neuromusculaire. Nous avons donc commencé par caractériser les conductances de certains des canaux que nous avions à disposition avant d'appliquer nos toxines dessus. Après avoir essayé sur les calciques (excepté Cav2), nous avons testé nos toxines sur le RDL, sans observer d'effet sur leurs conductances. Bien que nous n'ayons pas encore essayé sur le Nav1.2, un orthologue du Nav d'abeille, ou sur le canal HCN, les précédents résultats de l'équipe ne nous laissent pas nous attendre à un effet. Le nAChR, cible potentielle de Ae1d d'après de précédents résultats, n'a finalement montré aucune différence significative quand la toxine était appliquée. Ainsi, cela nous a permis d'éliminer de nombreuses pistes pour trouver la cible de notre toxine, mais également d'écartez l'hypothèse d'utiliser ces toxines pour moduler l'activité des canaux ioniques testés.

De manière générale, trouver des agents modulant spécifiquement l'activité de canaux ioniques pourrait aider à mieux comprendre leurs rôles physiologiques ou encore leurs différences au sein même des arthropodes. Cela pourrait, à terme, permettre de réduire l'impact des insecticides sur les canaux des organismes "bénéfiques". En effet, avec de meilleures connaissances sur ces canaux, nous pourrions plus facilement trouver des molécules ciblant uniquement certaines espèces, comme la toxine de l'araignée *Hadronyche versuta*. Cette dernière cible les canaux calciques de ravageurs sans avoir d'effet négatif sur l'abeille (Nakasu *et al.*, 2014).

C'est également dans ce but que nous avons testé nos toxines sur certains récepteurs d'autres espèces. Trouver une molécule bloquant un RDL de varroa ou de puceron sans avoir d'effet sur l'abeille aurait été une découverte prometteuse. La perspective de voir de nouveaux insecticides basés sur des substances bioactives issues de venin est une piste de plus en plus sérieuse. En effet, la spécificité des venins en fait non seulement un atout augmentant la *fitness*, mais également un outil important pour la modulation de cibles moléculaires bien précises. Ainsi, des insecticides plus spécifiques, par le moyen de plantes transgéniques dans une

perspective lointaine, permettraient de réduire significativement notre impact sur la biodiversité mais aussi sur l'économie. L'importance des polliniseurs dans ces deux domaines, ainsi que l'impact des insecticides sur eux, sont aujourd'hui bien connus.

Enfin, tester ce genre de molécules peut également parfois amener à des découvertes thérapeutiques, comme ça a été le cas avec la ω -agatoxine ou la ω -conotoxine, qui peuvent respectivement moduler l'activité de HsCav2.1 et HsCav2.2. C'est pourquoi nous avons testé nos peptides sur certains canaux de mammifères et avons cherché à comparer les effets sur les différentes sous-unités de HsCav1. En plus de comprendre comment fonctionne la modulation, il est toujours intéressant de trouver de nouveaux outils qui peuvent présenter des avantages par rapport à ceux déjà utilisés. La découverte de peptides de nouveaux genres comme les poneritoxines ouvre donc la porte à de nombreuses études pouvant couvrir des domaines scientifiques variés et à des perspectives tout aussi diversifiées et intéressantes.



FIGURE 11: PHOTO D'UNE ANOCHETUS EMARGINATUS OUVRIERE RAMENANT UNE PROIE DANS SON NID (PHOTO DE HADRIEN LALAGÜE, FOURNIE PAR AXEL TOUCHARD).

VI. Références bibliographiques

- Ampoorter, E., Barbaro, L., Jactel, H., Baeten, L., Boberg, J., Carnol, M., ... & Allan, E. (2020). Tree diversity is key for promoting the diversity and abundance of forest-associated taxa in Europe. *Oikos*, 129(2), 133-146.
- Biel, M., Schneider, A., & Wahl, C. (2002). Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends in cardiovascular medicine*, 12(5), 206-213.
- Biesmeijer, J. C., Roberts, S. P., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T., ... & Kunin, W. E. (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313(5785), 351-354.
- Brosi, B. J., Delaplane, K. S., Boots, M., & de Roode, J. C. (2017). Ecological and evolutionary approaches to managing honeybee disease. *Nature ecology & evolution*, 1(9), 1250-1262.
- Casewell, N. R., Wüster, W., Vonk, F. J., Harrison, R. A., & Fry, B. G. (2013). Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in ecology & evolution*, 28(4), 219-229.
- Collet, C., Sandoz, J. C., & Charnet, P. (2022). *Les abeilles face au risque toxique*. Cnrs.
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 52, 81-106.
- Fitches, E. C., Pyati, P., King, G. F., & Gatehouse, J. A. (2012). Fusion to snowdrop lectin magnifies the oral activity of insecticidal ω -hexatoxin-Hv1a peptide by enabling its delivery to the central nervous system. *PLoS One*, 7(6), e39389.
- Gieré, C., Dutertre, S., & Poisbeau, P. (2019). Les cônes marins, une ressource naturelle d'antalgiques venue du fond des mers: au-delà du ziconotide?. *Douleur et Analgésie*, 32(4), 196-204.
- Gosselin-Badaroudine, P., Moreau, A., Simard, L., Cens, T., Rousset, M., Collet, C., ... & Chahine, M. (2016). Biophysical characterization of the honeybee DSC1 orthologue reveals a novel voltage-dependent Ca^{2+} channel subfamily: CaV4. *Journal of General Physiology*, 148(2), 133-145.
- Goulson, D. (2019). The insect apocalypse, and why it matters. *Current Biology*, 29(19), R967-R971.
- Grünewald, B., & Siefert, P. (2019). Acetylcholine and its receptors in honeybees: involvement in development and impairments by neonicotinoids. *Insects*, 10(12), 420.

Guo, S., Herzig, V., & King, G. F. (2018). Dipteran toxicity assays for determining the oral insecticidal activity of venoms and toxins. *Toxicon*, 150, 297-303.

Hallmann, C. A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N., Schwan, H., ... & De Kroon, H. (2017). More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLoS one*, 12(10), e0185809.

Harrison, M. A., & Hall, A. E. (2010). Anthropomorphism, empathy, and perceived communicative ability vary with phylogenetic relatedness to humans. *Journal of Social, Evolutionary, and Cultural Psychology*, 4(1), 34.

Hristov, P., Shumkova, R., Palova, N., & Neov, B. (2020). Factors associated with honey bee colony losses: A mini-review. *Veterinary Sciences*, 7(4), 166.

Lundin, O., Rundlöf, M., Smith, H. G., Fries, I., & Bommarco, R. (2015). Neonicotinoid insecticides and their impacts on bees: a systematic review of research approaches and identification of knowledge gaps. *PLoS one*, 10(8), e0136928.

Menzel, R., & Mercer, A. (Eds.). (2012). *Neurobiology and behavior of honeybees*. Springer Science & Business Media

Mosa, F. E., Suryanarayanan, C., Feng, T., & Barakat, K. (2021). Effects of selective calcium channel blockers on ions' permeation through the human Cav1. 2 ion channel: A computational study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 102, 107776.

Nakasu, E. Y., Williamson, S. M., Edwards, M. G., Fitches, E. C., Gatehouse, J. A., Wright, G. A., & Gatehouse, A. M. (2014). Novel biopesticide based on a spider venom peptide shows no adverse effects on honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1787), 20140619.

Orlova, E. V., Rahman, M. A., Gowen, B., Volynski, K. E., Ashton, A. C., Manser, C., ... & Ushkaryov, Y. A. (2000). Structure of α -latrotoxin oligomers reveals that divalent cation-dependent tetramers form membrane pores. *Nature structural biology*, 7(1), 48-53.

Paillard, A. (2009). *Franchissement de barrières biologiques, mécanisme d'action et devenir subcellulaire de nanovecteurs d'agents anticancéreux pour la thérapie des gliomes* (Doctoral dissertation, Université d'Angers).

Park, B. K., Kitteringham, N. R., Maggs, J. L., Pirmohamed, M., & Williams, D. P. (2005). The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 177-202.

Paudel, Y. P., Mackereth, R., Hanley, R., & Qin, W. (2015). Honey bees (*Apis mellifera* L.) and pollination issues: Current status, impacts, and potential drivers of decline. *Journal of Agricultural Science*, 7(6), 93.

Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L. P. (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(11), 2482-2486.

Touchard, A., Koh, J. M., Aili, S. R., Dejean, A., Nicholson, G. M., Orivel, J., & Escoubas, P. (2015). The complexity and structural diversity of ant venom peptidomes is revealed by mass spectrometry profiling. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29(5), 385-396.

Touchard, A., Brust, A., Cardoso, F. C., Chin, Y. K. Y., Herzig, V., Jin, A. H., ... & Escoubas, P. (2016). Isolation and characterization of a structurally unique β -hairpin venom peptide from the predatory ant *Anochetus emarginatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(11), 2553-2562.

Van der Meijden, A., Koch, B., Van der Valk, T., Vargas-Muñoz, L. J., & Estrada-Gómez, S. (2017). Target-specificity in scorpions; comparing lethality of scorpion venoms across arthropods and vertebrates. *Toxins*, 9(10), 312.

Honeybee Genome Sequencing Consortium Overall project leadership: Weinstock George M. 1 2 Robinson Gene E. 7 9 13 14, Principal investigators: Gibbs Richard A. 1 2 Weinstock George M. 1 2, Community coordination: Weinstock George M. leader 1 2 Robinson Gene E. leader 7 9 13 14 Worley Kim C. leader 1 2 Evans Jay D. 4 Maleszka Ryszard 6 Robertson Hugh M. 7 9 13 14 Weaver Daniel B. 16, EST sequencing: Carninci Piero leader 33 Fukuda Shiro 33 Hayashizaki Yoshihide 33 Kai Chikatoshi 33 Kawai Jun 33 Sakazume Naoko 33 Sasaki Daisuke 33 Tagami Michihira 33, Comparative and evolutionary analysis: Robertson Hugh M. leader 7 9 13 14 Zdobnov Evgeny M. leader 18 28 Bork Peer 18 19 Elsik Christine G. 20 Gordon Karl HJ 46 Letunic Ivica 18, Funding agency management: Hackett Kevin 5 Peterson Jane 58 Felsenfeld Adam 58 Guyer Mark 58, ... & Anti-xenobiotic defence mechanisms: Aronstein Katherine A. leader 69 Claudianos Charles leader 6 46 Berenbaum May R. 7 Biswas Sunita 6 46 de Graaf Dirk C. 47 Feyereisen Rene 90 Johnson Reed M. 7 Oakeshott John G. 46 Ranson Hilary 88 Schuler Mary A. 10. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443(7114), 931-949

Yasuda, O., Morimoto, S., Chen, Y. H., Jiang, B. B., Kimura, T., Sakakibara, S., ... & Ogihara, T. (1993). Calciseptine binding to a 1, 4-dihydropyridine recognition site of the L-type calcium channel of rat synaptosomal membranes. *Biochemical and biophysical research communications*, 194(2), 587-594.

Résumé :

Le déclin des abeilles est un évènement préoccupant aux origines plurifactorielles parmi lesquelles les insecticides neurotoxiques occupent une place primordiale. Les abeilles se trouvent être des victimes collatérales de ces composés à cause de leur faible spécificité au sein des arthropodes. Leurs cibles moléculaires se situent généralement au niveau de la transmission synaptique et des canaux ioniques. Comprendre le fonctionnement de ces différents canaux représente donc un enjeu important afin de prévoir l'effet néfastes de telles molécules. Cependant, certains sont encore peu caractérisés et jouent un rôle physiologique qui n'a pas été identifié. Pour cela, il est nécessaire de trouver des molécules pouvant moduler l'activité de ces canaux. Les poneritoxines (PONTX) sont de petits peptides présentant deux ponts disulfures issus du venin de la fourmis *Anochetus emarginatus*. Ils se présentent aujourd'hui comme de potentiels outils de caractérisation moléculaire chez l'abeille. Ae1a et Ae1d sont deux PONTX à la séquence d'acides aminés proches mais aux surfaces moléculaires différentes. Notre étude a donc porté sur la caractérisation de canaux ioniques *d'Apis mellifera* et sur la recherche d'effet *in vivo* mais également *in vitro* des deux toxines sur ce modèle d'étude. Nous avons observé *in vivo* une paralysie flasque peu réversible causée par Ae1d à 2mM et pas d'effet pour Ae1a. Nous avons cherché la cible moléculaire de Ae1d chez les canaux ioniques que nous avions à disposition, mais n'avons pas vu d'effet sur ces derniers à 10µM (Cav1, Cav3, Cav4, RDL, nAChR). Nous avons également essayé sur des canaux de mammifères, dans l'éventualité de trouver de nouveaux outils thérapeutiques. Cette étude a donc mis en avant le potentiel rôle de caractérisation de Ae1d. Elle a également permis d'écartier les hypothèses de certaines cibles de ce peptide mais aussi d'éliminer nos toxines des candidats pour moduler les canaux testés.

Mots clés : *Apis mellifera*, insecticides neurotoxiques, poneritoxines, paralysie, canaux ioniques

Abstract :

The decline in bees is a worrying event with several multi-factorial causes, including neurotoxic insecticides. Bees are collateral victims of these compounds because of their low specificity in arthropods. Their molecular targets are generally located at the level of synaptic transmission and ion channels. Understanding how these different channels function is thus a major challenge for predicting the harmful effects of such molecules. However, some are still poorly characterised and play a physiological role that has not been identified yet. Indeed, we need to find molecules that can modulate the activity of these channels. Poneritoxins (PONTX) are small peptides with two disulfide bonds derived from the venom of the ant *Anochetus emarginatus*. They are now emerging as potential tools for molecular characterisation in bees. Ae1a and Ae1d are two PONTXs with similar amino acid sequences but different molecular surfaces. Our study therefore focused on characterising *Apis mellifera* ion channels and investigating *in vivo* and *in vitro* effects of the two toxins on this study model. *In vivo*, we observed a not very reversible flaccid paralysis caused by Ae1d (2mM) and no effect for Ae1a. We looked for the molecular target of Ae1d in the ion channels we had, but saw no effect on these (Cav1, Cav3, Cav4, RDL, nAChR). We also experimented with mammalian channels, in the hope of finding new therapeutic tools. This study therefore highlighted the potential characterisation role of Ae1d. It also enabled us to rule out the hypotheses of certain targets of it and to eliminate our toxins as candidates for modulating the channels tested.

Keywords : *Apis mellifera*, neurotoxic insecticides, poneritoxins, paralysis, ion channels

Remerciements :

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser ce stage qui m'a beaucoup apporté sur le plan scientifique et humain. Je remercie César Mattéi pour sa disponibilité et pour m'avoir donné le contact de mon maître de stage, Pierre Charnet. Je remercie ce dernier pour sa pédagogie et son implication dans mon apprentissage et dans mon projet. Je remercie l'ensemble de l'équipe F17 ainsi que le professeur Alain Chavanieu pour leurs interventions et leur bonne humeur. Je remercie évidemment mes collègues Masha Meger et Victoria Gizzi pour le travail que nous avons accomplis ensemble ainsi que pour les bons moments passés en leur compagnie. Enfin, je remercie mes amis et ma famille pour le soutien qu'ils m'ont apporté.

Annexe :

ND96-HERG				ND96-survie			
Produits	Conc (mM)	Gr/l	Gr/2l	Produits	Conc (mM)	Gr/l	Gr/2l
NaCl	96	5.606	11.213	NaCl	96	5.606	11.213
KCl	3	0.224	0.447	KCl	2	0.149	0.298
CaCl2	0.5	0.055	0.110	CaCl2	1.8	0.198	0.396
MgCl2	1	0.203	0.407	MgCl2	1	0.203	0.407
HEPES	5	1.191	2.381	HEPES	5	1.191	2.381
pH=7.4 (NaOH)				pH7.2 (NaOH)			
205mOsm							
OR-2				BANT-10 no Na			
Produits	Conc (mM)	Gr/l	Gr/2l	Produits	Conc (mM)	Gr/l	Gr/2l
NaCl	82.5	4.818	9.636	BaOH	10	3.155	6.310
KCl	2	0.149	0.298	TEAOH(20%)	20	14.7 ml	24.7ml
MgCl2	1	0.203	0.407	CsOH	2	0.336	0.672
HEPES	5	1.191	2.381	NMDG	50	9.761	19.522
pH=7.2 (NaOH)				pH=7.2 Meth Sulf			
168mOsm				176mOsm			

ANNEXE 1 : COMPOSITION DES SOLUTIONS UTILISÉES