



HAL
open science

Etude d'un insecticide naturel nommé PA1b : Mécanisme d'action et expression hétérologue

Vanessa Eyraud

► **To cite this version:**

Vanessa Eyraud. Etude d'un insecticide naturel nommé PA1b : Mécanisme d'action et expression hétérologue. Biologie végétale. INSA de Lyon, 2014. Français. NNT : 2014ISAL0020 . tel-01126979

HAL Id: tel-01126979

<https://theses.hal.science/tel-01126979>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre 2014ISAL0020
Année 2014

Thèse

Étude d'un insecticide naturel nommé PA1b : mécanisme d'action et expression hétérologue

Présentée devant
L'institut national des sciences appliquées de Lyon

Pour obtenir
Le grade de docteur

Formation doctorale
Micro-organismes, interactions, infections

École doctorale
Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation (E2M2)

Par
Vanessa Eyraud

Soutenue le 26 février 2014 devant la Commission d'examen

Jury

M. HERZOG	Professeur (Univ Grenoble), Rapporteur
C. NIELSEN- LEROUX	Directrice de recherche (INRA), Rapporteur
S. BAUDINO	Professeur (Univ St-Etienne), Examineur
G. CONDEMINÉ	Directeur de recherche (CNRS), Examineur
J.L. POESSEL	Chargé de recherche (INRA), Examineur
C. SALLAUD	Directeur de recherche (BIOGEMMA), Examineur
F. GRESSENT	Chargé de recherche (INRA), Directeur de Thèse

Laboratoire de recherche : Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions (BF2I)

A Nathanaël

Étude d'un insecticide naturel nommé PA1b : mécanisme d'action et expression hétérologue

Résumé

Dans un contexte où l'utilisation de substance chimique en agriculture est de plus en plus décriée, il est nécessaire de trouver de nouveaux moyens de protections des cultures, tout en maintenant une agriculture économiquement performante. Ainsi, un peptide extrait de graines de pois nommée PA1b (Pea Albumin 1 sous-unité b), présentant une forte activité insecticide a été découvert au laboratoire. PA1b provoque chez l'insecte modèle du laboratoire, le charançon des céréales *Sitophilus* sp., 100% de mortalité. L'action de PA1b passe par la liaison à un récepteur présent chez les charançons sensibles, et cette liaison est absente chez les charançons résistants ; ce récepteur est une pompe à protons nommée V-ATPase pour Vacuolar ATPase. Elle est composée de 14 sous-unités organisées en deux complexes protéiques nommés V1 (intracellulaire) et V0 (membranaire). PA1b agissant à l'extérieur des cellules seul le complexe V0 composé des sous - unités a, c, d et e pouvait être le récepteur de notre toxine.

Mon premier objectif de thèse a été de comprendre le mode d'action de PA1b, en identifiant d'abord la ou les sous-unités réceptrices de PA1b, puis en recherchant par quel mécanisme la liaison de PA1b induit la mort de l'insecte. Nous avons cloné chez le charançon tous les gènes du complexe V0, puis j'ai complété des levures déficientes pour ces gènes. Ce travail, mais également celui réalisé en collaboration avec d'autres équipes, nous a permis de proposer un modèle de perception de PA1b qui implique les sous-unités c et e de la V-ATPase, et permet également de proposer des hypothèses pour les différentes résistances au peptide. Par des méthodes d'immunohistologie et de biochimie, j'ai ensuite montré de manière concordante que la liaison de PA1b à la V-ATPase déclenche un phénomène d'apoptose qui conduit à la mort cellulaire, puis à la mort de l'insecte.

Le second objectif de ma thèse était la mise en place d'un système de production hétérologue de PA1b. Grâce à l'expression hétérologue par infiltration de feuille de tabac (*Nicotiana benthamiana*) nous avons mis en place une technique de production efficace de la protéine PA1b. Après avoir déterminé les parties du gène codant PA1b nécessaires à la production de la protéine fonctionnelle, le système de production a ensuite été simplifié par la construction d'une cassette d'expression. Ainsi six isoformes de PA1b présents chez le pois, dont l'activité individuelle restait inconnue, ont été produits et testés, permettant de montrer que le caractère amphiphile de PA1b était primordial pour son activité. Par cette technique nous avons mis en place un système de production rapide et efficace permettant de tester la toxicité de nombreux isoformes de PA1b. Ce travail sera une aide précieuse pour le projet, dont l'un des objectifs majeurs est l'optimisation de PA1b, c'est-à-dire de déterminer la séquence peptidique la plus toxique.

Mots clés : PA1b, knottine, bio-insecticide, interactions plante-insecte, agro-infiltration, complémentation fonctionnelle.

Study of a natural insecticide named PA1b: mechanism of action and heterologous expression

Summary

In a context where chemical pesticides are increasingly criticized, new crops protection strategies that do not affect agriculture efficiency and productivity, must be found. A new peptide extracted from pea (*Pisum sativum*) seeds, named PA1b (Pea albumin 1 subunit b), and showing an important insecticide activity, was discovered in our laboratory. PA1b induces 100% mortality in our insect model, the cereal weevil, *Sitophilus* sp. PA1b acts by interacting with a receptor, this interaction is present in sensitive weevil, but not present in resistant weevil. The PA1b receptor is the vacuo-

lar H⁺ -ATPase (V-ATPase), a multi-subunit proton pump. The V-ATPase is composed of two functional protein complexes named V1 (in the cytoplasm) and V0 (in the membrane). As PA1b is known to act only in the extracellular space, thus only the V0 complex, composed on the subunits a, c, d and e, can be the toxin receptor.

The first aim of this thesis is to understand the PA1b mode of action: (i) identifying the subunit(s) acting as the receptor(s), (ii) understanding how the binding mechanism of PA1b on the receptor lead to the insect death.

The weevil V0 complex genes were cloned and we used them for a functional complementation tests in yeasts strains deleted for these genes. Our data, together with those obtained through collaboration, lead to the proposal of model for the PA1b perception signaling which would involve subunits c and e of the V-ATPase. The identification of the PA1b receptor allows us to propose a hypothetical model explaining resistance mechanism to the peptide. Using immunohistology and biochemistry methods, we showed that PA1b-receptor interaction induced cells death triggered by apoptosis thus leading to insect death.

The second aim of this thesis was the development of a PA1b heterologous production system. Through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transient transformation by infiltration in tobacco leaves (*Nicotiana benthamiana*) an efficient system for PA1b production was developed. After identification of the essential parts of the complex *PAI* gene necessary for efficient PA1b production, we created an expression cassette to simplify our heterologous production system. We used the system to produce six pea PA1b-isoformes with unknown individual toxic activity. The isoforms toxicity was experimentally determined, and our data showed that the amphiphilic properties of PA1b are essential for the maintenance of its toxic activity. For the first time, we implemented a quick and efficient production system, which allows to produce and to test many naturals or synthetics PA1b isoforms. This work will be useful to achieve one of the most important objectives of the research on this molecule, that is the identification of an optimal toxin.

Keywords: PA1b, knottin, bio-insecticide, plant-insect interactions, agro-infiltration, functional complementation.

INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2011-2015

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	CHIMIE DE LYON http://www.edchimie-lyon.fr Sec : Renée EL MELHEM Bat Blaise Pascal 3 ^e etage Insa : R. GOURDON	M. Jean Marc LANCELIN Université de Lyon – Collège Doctoral Bât ESCPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE http://edeea.ec-lyon.fr Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN eea@ec-lyon.fr	M. Gérard SCORLETTI Ecole Centrale de Lyon 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60.97 Fax : 04 78 43 37 17 Gerard.scorletti@ec-lyon.fr
E2M2	EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION http://e2m2.universite-lyon.fr Insa : H. CHARLES	Mme Gudrun BORNETTE CNRS UMR 5023 LEHNA Université Claude Bernard Lyon 1 Bât Forel 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 06.07.53.89.13 e2m2@univ-lyon1.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE http://www.ediss-lyon.fr Sec : Insa : M. LAGARDE	Mme Emmanuelle CANET-SOULAS INSERM U1060, CarMeN lab, Univ. Lyon 1 Bâtiment IMBL 11 avenue Jean Capelle INSA de Lyon 696621 Villeurbanne Tél : 04.72.68.49.09 Fax :04 72 68 49 16 Emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr
INFO-MATHS	INFORMATIQUE ET MATHEMATIQUES http://infomaths.univ-lyon1.fr Sec : Renée EL MELHEM Bat Blaise Pascal 3 ^e etage infomaths@univ-lyon1.fr	Mme Sylvie CALABRETTO LIRIS – INSA de Lyon Bat Blaise Pascal 7 avenue Jean Capelle 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 43. 80. 46 Fax 04 72 43 16 87 Sylvie.calabretto@insa-lyon.fr
Matériaux	MATERIAUX DE LYON http://ed34.universite-lyon.fr Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry Ed.materiaux@insa-lyon.fr	M. Jean-Yves BUFFIERE INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Saint Exupéry 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 Jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr
MEGA	MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE http://mega.universite-lyon.fr Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry mega@insa-lyon.fr	M. Philippe BOISSE INSA de Lyon Laboratoire LAMCOS Bâtiment Jacquard 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72 .43.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 Philippe.boisse@insa-lyon.fr
ScSo	ScSo* http://recherche.univ-lyon2.fr/scso/ Sec : Viviane POLSINELLI Brigitte DUBOIS Insa : J.Y. TOUSSAINT	M. OBADIA Lionel Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.77.23.86 Fax : 04.37.28.04.48 Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Remerciements

Le moment le plus redouté, le plus angoissant dans la carrière d'un jeune chercheur est sans nul doute la soutenance de sa thèse et je me suis souvent demandée comment j'allais survivre à cette épreuve.

En premier lieu, je tiens à remercier les membres du jury, pour avoir accepté d'évaluer cette thèse et pour l'intérêt porté à mon travail.

Merci à Fred, pour m'avoir fait confiance en m'ouvrant les portes de ton labo, puis pour m'avoir guidée, encouragée, conseillée pendant ces trois ans. Beaucoup de thésards aimeraient avoir un chef comme toi ; tu as su me diriger tout en me laissant une grande liberté. Merci de ton aide pour mes manip pendant 9 mois, merci également d'avoir fait de ma thèse une priorité et d'être resté jusqu'au bout dans le froid lyonnais pour moi. Je remercie également Rémi dont la photo, qui trône en bonne place dans notre bureau, t'a sans nul doute beaucoup attendri et t'a permis de rester plus zen face à mes erreurs

Un grand merci à toute l'équipe « Entomotoxine ». Corinne, non seulement tu m'as initiée à la biologie moléculaire mais tu as toujours trouvé le temps de m'encourager et me reconforter et pour me donner confiance dans les instants de doute. Pedro, tu m'as fait découvrir le côté obscur (pour moi en tout cas!) de la chimie. Ton humour toujours subtil (...) va me manquer mais mes gâteaux devraient avoir désormais une espérance de vie vraiment rallongée. Merci à Isa et Catherine, qui en plus de m'avoir épaulée pour mes manip, avez été présentes pendant mes phases joyeuses ou dépressives. Vous avez supporté mon stress, mes hauts et mes bas avec une constance et une endurance sans faille. J'ai trouvé auprès de vous des oreilles attentives pour râler, rire, ronchonner et refaire le monde. Vous m'avez également coachée dans mes séances de détente au yoga et au jogging qui m'ont permis de souffler et me déconnecter de mon travail. Un grand merci aussi à Lamis ; c'est avec vraiment beaucoup de plaisir que j'ai partagé avec toi pendant trois ans les congrès, les manip, la rédaction, les angoisses de fin de thèse, ...et la culture française.

Je tiens également à remercier Yvan, qui a accepté de co-diriger cette thèse pendant que Fred passait son HDR, qui m'a accueillie dans son laboratoire et qui a effectué la dernière relecture de ce manuscrit.

Merci à Séverine pour le temps que tu as consacré au projet d'histologie. Tu m'as été d'une aide précieuse.

Un grand merci à tout le laboratoire BF21 pour leur accueil, pour les pauses café, pour leur bonne humeur, pour ceux qui m'ont donné un petit coup de pouce administratif, pour les manips, ou pour corriger mon anglais. Mon travail de thèse n'aurait aucune existence sans nos nombreuses et précieuses discussions.

Je ne veux pas oublier Jean-Claude et toute l'équipe du BVPAM de St Etienne. Vous m'avez donné le goût de la recherche et la confiance en moi nécessaire pour me lancer dans de longues (très longues) études.

Merci à mes sœurs, Valérie et Emmanuelle, à mes amies Chloé et Barbara, vous êtes un soutien sans faille. Et maman cela fait 27 ans que tu crois en moi et sans toi toutes ses années d'études n'auraient pas été envisageables.

Merci à Romain pour avoir supporté mon stress, mes hauts et mes bas au quotidien ! Tu partages mes angoisses et tu me donnes la force de gravir des sommets.

Et enfin je remercie Nathanaël, parce que rentrer à la maison et te voir rire m'a permis de ne pas oublier que la vie ne se résume pas uniquement à une thèse.

Table des matières

Vanessa Eyraud

Thèse en biologie / 2014

Institut national des sciences appliquées de Lyon

9

Etude d'un insecticide naturel nommé PA1b : mécanisme d'action et expression hétérologue	3
Résumé	3
Study of a natural insecticide named PA1b: mechanism of action and heterologous expression	4
Summary	4
REMERCIEMENTS	7
TABLE DES MATIÈRES	9
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLEAUX	17
LISTE DES ABRÉVIATIONS	18
LISTE DES ACTIVITÉS EFFECTUÉES AU COURS DE LA THÈSE	20
Liste des publications	20
Articles parus dans une revue à comité de lecture	20
Articles soumis	20
Articles en préparation	21
Participations à des congrès	21
Présentations orales	21
Posters	22
Enseignement	22
Encadrement de stagiaire	22
Formations	22
AVANT PROPOS	23
PARTIE 1	24
INTRODUCTION GÉNÉRALE	24
1 LA LUTTE CONTRE LES INSECTES	25
1.1 Introduction	25
1.1.1 Vers une agriculture différentes	25
1.1.2 Insectes et santé humaine	26
1.2 La lutte contre les insectes	28
1.2.1 Les principaux insecticides et leurs cibles	28
1.2.1.1 Insecticides ciblant l'acétylcholinestérase	29
1.2.1.2 Insecticides ciblant le récepteur nicotinique	30
1.2.1.3 Insecticides ciblant le canal chlore	31
1.2.1.4 Insecticides ciblant le canal sodium	31
1.2.2 Mécanismes d'acquisition de la résistance	32
1.2.2.1 La résistance métabolique ou détoxification	33
1.2.2.2 La résistance par mutation de cible	34
1.2.3 Insecticides et environnement	35

1.2.4	Insecticides et santé humaine	37
1.2.5	Insecticides et législation	39
1.2.6	Les moyens de lutte non chimique	41
1.2.6.1	La lutte environnementale et mécanique	41
1.2.6.2	La lutte biologique.....	42
1.2.6.3	La lutte génétique	44
1.3	Conclusion	45
2	PA1B : UNE ENTOMOTOXINE VÉGÉTALE.....	47
2.1	Introduction.....	47
2.1.1	Les graines de légumineuses	47
2.1.2	Découverte des propriétés entomotoxiques de PA1b	48
2.2	Du gène à la protéine	49
2.2.1	Structure du gène <i>PAI</i>	49
2.2.2	Structure et propriétés de PA1b	50
2.2.3	Structure tridimensionnelle de PA1b	52
2.2.3.1	Détermination de la structure tridimensionnelle de PA1b	52
2.2.3.2	La famille des knottines	53
2.3	Mécanisme d'action de PA1b	54
2.3.1	Génétique de la toxicité de PA1b.....	54
2.3.2	Mise en évidence d'un site de liaison à PA1b chez <i>S. oryzae</i>	55
2.3.2.1	Mise en évidence de la liaison de PA1b	55
2.3.2.2	Purification du site de liaison à PA1b	56
2.3.3	Spectre d'hôte	56
2.4	Identification du récepteur à PA1b	59
2.4.1	Effets de PA1b sur les cellules d'insectes	59
2.4.2	Identification du récepteur à PA1b	59
2.5	Etude structure/fonction de PA1b	61
2.5.1	Synthèse d'une collection de mutants PA1b	61
2.6	Conclusion	63
3	LES V-ATPASES	65
3.1	Introduction.....	65
3.2	Les V-ATPases d'insectes.....	66
3.2.1	Le complexe V1	66
3.2.2	Le complexe Vo	67
3.3	Fonctionnement et régulation des V-ATPases	68
3.4	Altération du fonctionnement des V-ATPases	70
3.5	Inhibiteurs de V-ATPases	71
4	OBJECTIFS DE CE TRAVAIL	74
	PARTIE 2.....	77
	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	77
1	MATÉRIEL BIOLOGIQUE	78
1.1	Insectes.....	78
1.1.1	Elevage de <i>Sitophilus oryzae</i>	78
1.1.2	Elevage de <i>Tribolium castaneum</i>	78

1.2	Matériel végétal.....	79
1.2.1	<i>Nicotiana sp.</i>	79
1.3	Souches bactériennes et milieux de cultures	79
1.3.1	<i>Escherichia coli</i>	79
1.3.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	79
1.4	Souches de levure	80
1.5	Cellules de tissu ovarien de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9)	81
1.5.1	Culture des cellules SF9.....	81
1.5.2	Tests de toxicité sur cellules Sf9	82
2	MÉTHODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	83
2.1	Clonages	83
2.1.1	Extraction d'ARN et reverse transcription	83
2.1.2	Clonage dans le vecteur pCR2.1 des gènes d'intérêt	83
2.2	Construction de vecteur d'expression hétérologue	85
2.2.1	Insertion de gènes d'intérêt dans le vecteur YES2	85
2.2.2	Insertion de gènes d'intérêt dans le vecteur pMDC32	86
2.3	Conception d'une cassette d'expression à partir du vecteur pMDC32	88
2.3.1	Mutation de séquence par PCR	88
2.3.2	Mutation de séquence PA1 pour l'insertion de deux sites de restriction par mutagenèse dirigée.	89
2.4	Modification de la séquence codant PA1b : mutation par PCR avec de longues amorces.	90
2.4.1	Principe de mutation par longues amorces	90
2.4.2	Obtention des séquences codant pour différents isoformes de PA1b	90
3	MÉTHODES DE BIOLOGIE CELLULAIRE.....	92
3.1	Expression hétérologue de PA1b par transformation transitoire de <i>Nicotiana benthamiana</i>	92
3.1.1	Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> par choc thermique	92
3.1.2	Transformation transitoire de feuilles de <i>N. benthamiana</i> par infiltration	92
3.2	Complémentation fonctionnelle chez <i>S. cerevisiae</i>	93
3.2.1	Transformation de levure : méthode de l'acétate de lithium	93
3.2.2	Transformation de levure : méthode de l'électroporation	94
3.2.3	Expression de la protéine recombinante et test de complémentation fonctionnelle	95
4	MÉTHODES D'HISTOLOGIE.....	96
4.1	Immunomarquage d'intestins de <i>S. oryzae</i>	96
4.1.1	Préparation des échantillons	96
4.1.2	Immunomarquage de la caspase 3	96
4.1.3	Observation des échantillons au microscope	97
5	MÉTHODES DE BIOCHIMIE.....	98
5.1	Extraction et purification de PA1b par HPLC	98
5.1.1	Extraction de PA1b à partir de graine de pois (<i>Pisum sativum</i>)	98
5.1.2	Purification par HPLC	98
5.2	Mesure de la quantité de protéine (BCA)	98
5.3	Test de liaison PA1b-récepteur.....	99
5.3.1	Préparation des échantillons	99
5.3.2	Test de liaison PA1b-récepteur.....	99
5.4	Dégradation de PA1b par les enzymes de <i>N. benthamiana</i>	100
5.5	Mesure de l'activité enzymatique de la caspase 3	100

5.6	Analyse par spectrométrie de masse	101
PARTIE 3	102
RÉSULTATS ET DISCUSSION	102
PARTIE 3	103
CHAPITRE 1	103
IDENTIFICATION DU RÉCEPTEUR À PA1B	103
1.1	Introduction.....	104
1.1.1	Les rôles connus de PA1b	104
1.1.1.1	Le rôle de PA1b dans la plante	104
1.1.1.2	Et sur les mammifères alors.....	105
1.1.2	Les récepteurs de PA1b.....	105
1.2	Résultats	106
1.2.1	Clonage du gène <i>VDAC</i> chez <i>Sitophilus oryzae</i>	106
1.2.2	Clonage des sous-unités du complexe <i>Vo</i> de la V-ATPase	107
1.2.3	Recherche de sous-unités <i>c'</i> et <i>c''</i> de la V-ATPase et de la protéine Ac45 chez <i>S. oryzae</i> 110	
1.2.4	Comparaison des sous-unités du complexe <i>Vo</i> de la V-ATPase de <i>S. oryzae</i> avec celles correspondantes d'autres organismes	112
1.2.5	Complémentation fonctionnelle de <i>S. cerevisiae</i> par les sous-unités <i>c</i> , <i>d</i> et <i>e</i> de la V- ATPase de <i>S. oryzae</i>	113
1.2.6	Sensibilité à la toxine des levures complémentees par les sous-unités <i>c</i> , <i>d</i> et <i>e</i> du complexe <i>Vo</i> de la V-ATPase de <i>S. oryzae</i>	117
1.3	Discussion.....	119
PARTIE 3	128
CHAPITRE 2	128
DE LA LIAISON DE PA1B À LA MORT DES INSECTES	128
2.1	Introduction.....	129
2.2	Résultats	131
2.2.1	Analyse biochimique de l'activité caspase-3 dans les intestins d'insectes	131
2.3	Discussion.....	139
PARTIE 3	142
CONCLUSION DES CHAPITRES 1 ET 2	142
MÉCANISME D'ACTION DE PA1B : MODÈLE HYPOTHÉTIQUE DE LA PERCEPTION DU SIGNAL PA1B	142

PARTIE 3	148
CHAPITRE 3	148
EXPRESSION DE PA1B EN SYSTÈME DE PRODUCTION HÉTÉROLOGUE	148
3.1 Introduction.....	149
3.1.1 Intérêt de produire PA1b en système hétérologue	149
3.1.2 Les différents systèmes de production hétérologue envisagés de PA1b	150
3.1.3 Production hétérologue par agroinfiltration chez <i>Nicotiana benthamiana</i>	151
3.2 Résultats	151
3.2.1 Production de PA1b par transformation transitoire de tabac	151
3.2.2 Cinétique de la production de PA1b dans le tabac	155
3.2.3 Exportation et dégradation de PA1b dans le tabac	156
3.2.4 Identification de la séquence de <i>PAI</i> optimum pour la production de PA1b	157
3.2.5 Production des six isoformes de PA1b de pois à l'aide de la cassette d'expression pMDC32	158
3.2.6 Production de PA1b issus d'autres légumineuses	162
3.2.7 Production de PA1b cyclique	163
3.2.8 Production d'une cyclotide.....	164
3.3 Discussion.....	165
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	173
BIBLIOGRAPHIE	176
ANNEXES	189
Liste des amorces utilisées dans ce travail, nom des gènes ou ADNc amplifiés, et conditions de PCR	190
Article premier auteur publié : Expression and biological activity of the cystine knot bioinsecticide PA1b (Pea Albumin 1 subunit b [EYRAUD '13].	193

Liste des figures

Figure 1 : Carte montrant l'incidence mondiale des décès causés par des maladies à transmission vectorielle (World-Health-Organization, 2004).	27
Figure 2 : Représentation des principales classes d'insecticides et leur part respective dans le marché mondiale. D'après [Nauen '06].	29
Figure 3 : Les zones cibles des insecticides dans le système nerveux des insectes.....	32
Figure 4 : Structure du gène PA1 et maturation des peptides PA1b et PA1a.....	50
Figure 5 : Séquence primaire de PA1b	51
Figure 6 : Alignement protéique de la préproprotéine PA1 de différentes Légumineuses	51
Figure 7 : Représentation tridimensionnelle de PA1b	52
Figure 8 : Le motif cystine knot	53
Figure 9 : Effet de PA1b sur le potentiel de membrane des cellules Sf9.....	60
Figure 10 : Représentation tridimensionnelle de PA1b	63
Figure 11 : Représentation schématique de la V-ATPase	67
Figure 12 : Modèle générique de la rotation des ATPases	69
Figure 13 : Modèle de l'agencement des sites de liaison des inhibiteurs de V-ATPase sur le complexe Vo	73
Figure 14: Carte du vecteur de clonage pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, USA).	84
Figure 15 : Carte du vecteur d'expression hétérologue pYES-2.....	86
Figure 16 : Carte du vecteur d'expression hétérologue pMDC32.....	87
Figure 17 : Principe de la mutagenèse dirigée par PCR.....	89
Figure 18 : Séquences protéiques de la VDAC de charançon sensible (WAA42) et résistant (IsoR3).	107
Figure 19 : Alignement des séquences protéiques des isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de V-ATPase issus de charançons sensible (WAA42) et résistant (IsoR3)	108
Figure 20 : Alignement des séquences protéiques des sous-unités d et e de V-ATPase issues de charançons sensible (WAA42) et résistant (IsoR3)	110
Figure 21 : Alignement des séquences protéiques des sous-unités c de V-ATPase issues de <i>Sitophilus</i> sensible et résistant.....	110
Figure 22 : Alignement des séquences protéiques des sous-unités c''-like de V-ATPase issues de <i>S. oryzae</i> sensible (c'' like-WAA42) et résistant (c'' like-IsoR3)	111
Figure 23 : Alignement des séquences protéiques des sous-unités Ac45-like de V-ATPase issues de <i>S. oryzae</i> sensible et résistant	112
Figure 24 : Insertion du cDNA de <i>S. oryzae</i> dans le vecteur pYES2	114
Figure 25 : Test de complémentation fonctionnelle de <i>S. cerevisiae</i> YEL027w par les sous-unités c de <i>S. oryzae</i> sensible (WAA42) ou résistant (IsoR3) à PA1b	115
Figure 26 : Test de complémentation fonctionnelle de <i>S. cerevisiae</i> YEL027w par les sous-unités c de <i>S. oryzae</i> sensible (WAA42) ou résistant (IsoR3) à PA1b ou par la sous-unité c de <i>S. cerevisiae</i>	116
Figure 27 : Test de toxicité à PA1b de <i>S. cerevisiae</i> YEL027w exprimant les sous-unités c de <i>S. oryzae</i> sensible (WAA42) ou résistant (IsoR3) ou par la sous-unité c de <i>S. cerevisiae</i>	118
Figure 28 : Structure secondaire putative de la sous-unité c de la V-ATPase de <i>M. sexta</i>	121
Figure 29 : Visualisation de la liaison PA1b-V-ATPase par cryo-microscopie électronique.....	123
Figure 30 : Identification de la sous-unité de la V-ATPase réceptrice de PA1b par photo-affinité et marquage radioactif.....	124
Figure 31 : Morphologie de cellules Sf9 en présence ou absence de PA1b	130

Liste des figures

Figure 32 : Mesure de l'activité de la caspase-3 dans les intestins de <i>S. oryzae</i> WAA42 intoxiqués par PA1b	131
Figure 33 : Cinétique de l'induction de l'activité de la caspase-3 par PA1b dans des intestins de <i>S. oryzae</i> WAA42	132
Figure 34 : Mesure de l'activité de la caspase-3 dans les intestins de <i>S. oryzae</i> WAA42 et IsoR3 ..	133
Figure 35 : Mesure de l'activité de la caspase-3 dans les intestins de <i>S. oryzae</i> WAA42 et IsoR3 intoxiqué à la bafilomycine	134
Figure 36 : Immunomarquage de la caspase-3 active dans les intestins de <i>S. oryzae</i> souche WAA42, intoxiqué par PA1b	136
Figure 37 : Immunomarquage de la caspase-3 active dans les intestins de <i>T. castaneum</i> et de <i>S. oryzae</i> IsoR3 intoxiqués par PA1b	137
Figure 38 : Immunomarquage de la caspase-3 active dans les intestins de <i>T. castaneum</i> et de <i>S. oryzae</i> intoxiqués par la bafilomycine	138
Figure 39 : modèle hypothétique de perception du signal à PA1b	145
Figure 40 : Séquence de PA1 (à partir de la séquence génique AJ574595	152
Figure 41 : Insertion de l'ADNc de PA1 dans le vecteur pMDC32	152
Figure 42 : Chromatogramme HPLC des extraits de feuilles de tabac au 5ème jour après infiltration	153
Figure 43 : Cinétique de production de PA1b dans <i>N. benthamiana</i>	155
Figure 44 : Constructions de PA1 insérées dans le vecteur pMDC32 et la quantité de peptide synthétisée par le tabac correspondante	158
Figure 45 : Conception de la cassette d'expression à partir du vecteur pMDC32, et insertion de différentes séquences de PA1b	160
Figure 46 : Comparaison des séquences PA1b de <i>Pisum sativum</i> et <i>Sophora japonica</i>	163
Figure 47 : Comparaison de la séquence protéique de PA1 contenue dans la cassette d'expression pMDC32-PA1-ADNc	163
Figure 48 : Séquence protéique de la cassette d'expression pMDC32-PA1-ADNc, ou PA1b est remplacée par une cyclotide	164
Figure 49 : Modélisation du potentiel hydrophobe et hydrophile de la surface accessible de deux isoformes de PA1b	169
Figure 50 : Structure du gène PA1 de pois (a), du gène codant une cyclotide de <i>Clitoria ternatea</i> (b) et du gène habituellement codant des cyclotides	171

Liste des tableaux

Tableau n°1. Souches bactériennes utilisées lors des travaux décrits dans ce mémoire.	80
Tableau n°2. Souches de levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilisées lors de ce travail et leurs caractéristiques.	81
Tableau n°3 : Comparaison des acides aminés en positions 201, 437, 668 et 670 d'isoformes a1 de la V-ATPase de <i>S. oryzae</i> sensibles et résistants à PA1b	109
Tableau n°4 : Pourcentage d'identité entre les sous-unités a1, a2, c, c'', d, e et Ac45 de la V-ATPase de <i>S. oryzae</i> et celles d'autres organismes.....	113
Tableau n°5 : Complémentation fonctionnelle de <i>S. cerevisiae</i> déficientes pour les sous-unités c, d ou e de la V-ATPase, et résultats du test de liaison à PA1b.....	119
Tableau n°6 : Tests de toxicité réalisés à partir de PA1b extrait de <i>Pisum sativum</i> , ou à partir de PA1b produit dans le tabac, sur charançons sensibles (WAA42) et sur charançons résistants (IsoR3).	154
Tableau n°7 : Séquences des six isoformes de pois produits dans le tabac, et tests de toxicité	161

Liste des abréviations

ADNc	ADN complémentaire
AOEL	Acceptable Operator Exposure Level
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
BCA	Bicinchonique Acide Assay
BF2I	Biologie Fonctionnelle Insecte et Interactions
BPA	Bonnes Pratiques Agricoles
BSA	Albumine de Serum Bovin
<i>b t</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Caspases	Cysteiny Aspartate-Specific ProteinASEs
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonat
Ci	curie
CMR	Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique
Cpm	Coups par minute
Da	Dalton
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DEVD-pNA	Ac-Asp-Glu-Val-Asp- <i>p</i> -nitroaniline
DES	Dose Sans Effet
DJA	Dose Journalière Admissible
DO	Densité Optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
GLT	Glutathion Transférase
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	Concentration Inhibitrice 50
I ¹²⁵	Iode 125
ICK	Cystine Knot Inhibitor
Kd	Constance de Dissociation
LB	milieu Luria-Bertani
LMR	Limites Maximales de Résidus
OILB	Organisation International de Lutte Biologique et intégrée
OGM	Organisme Génétiquement Modifié
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

Liste des abréviations

ORP	Observatoire des Résidus de Pesticides
PA1b	protéine Pea Albumine 1 sous-unité b
<i>PAI</i>	gène Pea Albumine 1
PAC	Politique Agricole Commune
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyéthylène Glycol
PFA	Paraformaldehyde
PMSF	PhenylMethaneSulfonyl Fluoride
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNAi	RNA interférence
Rpm	Rotation Par Minute
RT-PCR	Réverse transcriptase PCR
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TL ₅₀	Temps létal 50
T _m	Température d'amorçage
UCBL1	Université Claude Bernard Lyon 1
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
V-ATPase	Vacuolar H ⁺ ATPase
V _o	complexe V _o de la V-ATPase
V ₁	complexe V ₁ de la V-ATPase
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

Liste des activités effectuées au cours de la thèse

Liste des publications

Articles parus dans une revue à comité de lecture

Eyraud V., Karaki L., Rahioui I., Sivignon C., Da Silva P., Rahbe Y., Royer C., Gressent F. (2013) **Expression and biological activity of the cystine knot bioinsecticide PA1b (Pea Albumin 1 subunit b)**. Plos One 8 (12), e81619.

Chouabe C, **Eyraud V.**, Da Silva P, Rahioui I, Royer C, Soulage C, Bonvallet R, Huss M, Gressent F. (2011). **New Mode of Action for a Knottin Protein Bioinsecticide: Pea Albumin 1 subunit b (PA1b) is the first peptidic inhibitor of V-ATPase**. J. Biol. Chem., 286(42), 36291-6.

Gressent F., Da Silva P., **Eyraud V.**, Karaki L., Royer C. (2011) **Pea Albumin 1 subunit b (PA1b), a promising bioinsecticide of plant origin**. Toxins (Basel) 3:1502-17. DOI: 10.3390/toxins3121502.

Da Silva P, **Eyraud V.**, Carré-Pierrat M, Sivignon C, Rahioui I, Royer C, Gressent F. (2012). **High toxicity and specificity of the saponin 3-GlcA-28-AraRhaxyl-medicagenate, from Medicago truncatula seeds, for Sitophilus oryzae**. BMC Chem. Biol., 12:3.

Articles soumis

Karaki L., Da Silva P., Rizk F., Chouabe C., Chantret N., **Eyraud V.**, Gressent., F, Sivignon C., Rahioui I., Brochier-Armanet, C., Rahbé Y. and Royer C., 2013. **Genome-wide identification, characterization, phylogenetic analysis and biological activities of the small multigenic insecticidal Albumin 1 family in Medicago truncatula**.

Rahioui I, **Eyraud V**, Karaki L, Sasse F, Carre-Pierrat, M, Qin A, Zheng M, Sivignon C, Royer C, Da Silva P, Gressent F. (2014). **The effect of the biopesticide PA1b (Pea Albumin 1b) is strictly limited to the insects.**

Muench S, Rawson S, **Eyraud V**, Delmas A, Da Silva P, Phillips C, Trinick J. Harrison M, Gressent F. Huss M. **Characterisation of PA1b binding to the vacuolar ATPase reveals the basis for its insecticidal action and the location of subunit e.**

Articles en préparation

Eyraud V, Balmand S, Karaki L, Rahioui I, Sivignon C, Da Silva P, Royer C, Rahbé Y. Gressent F. **The interaction of the bioinsecticide PA1b (Pea Albumin 1 subunit b) with the insect V-ATPase triggers apoptosis.**

Eyraud V, Le Gleuher M, Pauchet Y, Van Munster M, Royer C, Pauron D, Gressent F. **Cloning, sequencing and functional analysis of the four subunits of the Vo complex of the V-ATPase from Sitophilus oryzae.**

Karaki L., Da Silva P., Rizk F., **Eyraud V.**, Gressent., F, Sivignon C., Rahioui I., Cerutti M., Rahbé Y. and Royer C., 2014. **Expression, purification and biological activity of a cystine knot bioinsecticide PA1b in baculovirus system.**

Participations à des congrès

Présentations orales

Eyraud V, Royer C, Rahioui I, Da Silva P, Gressent F **Heterologous production of PA1b, a plant biopesticide.** Perpignan 2012, Natural Product and Biocontrol.

Eyraud V, Royer C, Rahioui I, Da Silva P, Gressent F. **Synthèse de nouvelles isoformes de PA1b, un pesticide naturel, par expression hétérologue.** Montpellier 2013, Colloque de Biologie de l’Insecte.

Posters

Eyraud V., Karaki L., Rahioui I., Sivignon C., Rahbe Y., Royer C. and Gressent F. Heterologous production of PA1b, a plant biopesticide. Sixth International Symposium on Molecular Insect Science 2-5 octobre 2011.

Eyraud V., Karaki L., Rahioui I., Sivignon C., Rahbe Y., Royer C. and Gressent F. Production of the peptidic entomotoxin PA1b extracted from pea seeds in *Nicotiana benthamiana*. Antimicrobial Peptide Symposium, Lille, France, 13-15 juin 2012.

Enseignement

2012-2013 - Monitrice en chimie, premier cycle.

Encadrement de stagiaire

Juin –décembre 2012 - Stage de première année de master Singapour. Syed Ameerudin.

Formations

Module « accueillir un jeune dans son laboratoire » dans le cadre de la formation doctorale.

Module « expression orale » dans le cadre de la formation doctorale.

Module « les outils isotopiques et cycle de l'eau » dans le cadre de la formation doctorale.

« EndNote : initiation au logiciel de gestion de références bibliographiques » : Stage de formation réalisé à l'Urfist de Lyon sous la direction de Mme. Frédérique Cohen ADAD.

« Les carrières de l'enseignement supérieur et de la recherche » stage de formation réalisé par l'Université de Lyon.

Avant propos

Dans un monde où l'utilisation des pesticides est de plus en plus contestée, il est urgent de découvrir de nouvelles solutions pour la protection des cultures et des denrées stockées, mais également des hommes. Ce mémoire de thèse a pour objet d'étude PA1b, un peptide naturel extrait du pois aux propriétés entomotoxiques étonnantes. Ce peptide d'origine végétale pourrait faire partie des produits qui remplaceront petit à petit les substances chimiques néfastes à la santé humaine et à l'environnement.

Dans le vaste sujet qu'est PA1b, je me suis intéressée pendant ces trois ans de thèse à deux aspects très différents de la recherche sur ce peptide. Dans un premier temps je me suis intéressée à l'identification du récepteur à PA1b chez l'insecte et à son mécanisme d'action, dont la compréhension est primordiale pour envisager l'utilisation de cette toxine dans la lutte contre les insectes. Et dans un second temps, je me suis intéressée à la mise en place d'un système de production hétérologue de cette toxine.

Afin de mieux comprendre le contexte actuel qui entoure les pesticides, ce travail s'amorce par une étude bibliographique des moyens actuels utilisés dans la lutte contre les insectes. Cette étude est poursuivie par une présentation des connaissances sur le peptide PA1b, ainsi que sur les V-ATPases, qui ont été identifiées comme le récepteur à PA1b. S'ensuivra la présentation de mes travaux de thèse, en trois chapitres dédiés à l'identification du récepteur à PA1b, à l'identification du mécanisme d'action de PA1b, et à la mise en place d'un système de production hétérologue.

Partie 1

Introduction générale

1 La lutte contre les insectes

1.1 Introduction

1.1.1 Vers une agriculture différente

Après la seconde guerre mondiale, les gouvernements européens mettent en place une nouvelle politique agricole : la PAC (Politique Agricole Commune). Son objectif principal est la modernisation et le développement de l'agriculture afin d'apporter l'autosuffisance alimentaire aux pays européens. L'augmentation de la production agricole doit faire face à une forte diminution des surfaces exploitables (15% durant les 60 dernières années en France), et à une population qui ne cesse d'augmenter (doublement de la population mondiale ces 50 dernières années). Malgré ces contraintes, l'objectif principal de la PAC a été atteint. L'augmentation des rendements en blé d'une moyenne de 15 quintaux à l'hectare après la seconde guerre mondiale à 70 aujourd'hui en est un très bon exemple illustrant cette réussite. Les rendements en maïs ont augmenté de 60 % entre 1980 et 2010, et ceux de la betterave sucrière ont plus que doublé entre 1975 et 2007. Cette augmentation est aussi sensible pour d'autres cultures agricoles : pomme de terre, tournesol, oléagineux. Cette réussite est due à la mécanisation des techniques d'exploitation, mais aussi au développement des moyens chimiques de contrôle des organismes nuisibles : les pesticides. Le mot pesticide est un terme générique dérivé des termes latins «caedere» (tuer) et «pestis» (fléau). Il a été intégré à la langue française dans les années 50. Les pesticides ont comme caractéristique principale de lutter contre des organismes nuisibles (animaux, végétaux, champignons) mais ils peuvent aussi réguler la croissance des végétaux, ou améliorer le transport et le stockage des produits de cultures.

A l'heure actuelle, où la population européenne ne souffre plus de sous-nutrition, d'autres problématiques entrent en jeu. Le respect de la santé humaine et de l'environnement devient une priorité. Avec le développement des consciences écologiques, de nouvelles normes aux niveaux mondial et européen obligent l'agriculture à maîtriser son impact sur l'environnement. Actuellement, la France est l'un des premiers utilisateurs mondiaux de pesticides, avec des ventes comprises entre 80 000 et 100 000 tonnes par an depuis une trentaine d'années, à l'exception d'un pic de vente à la fin des années 1990 (120 000 tonnes en 1999). Depuis 2002, les ventes se situent légèrement en dessous de 80 000 tonnes [BALDI '13]. Ces substances ne sont pas uniquement utilisées sur les cultures, mais aussi pour la protection des denrées après récolte. En l'absence de traitements chimiques on estime la perte due aux pathogènes et aux insectes à plus de 30%, et ce chiffre peut atteindre 80% en raison des conditions climatiques et des maladies fongiques [BECKER-RITT '12]. Afin de nourrir une population en constante expansion, tout en respectant la santé humaine et l'environnement, il est nécessaire de trouver de nouveaux moyens de protection des cultures, tout en maintenant une agriculture économiquement performante.

1.1.2 Insectes et santé humaine

La protection des cultures et des denrées stockées est la cause majeure de l'utilisation d'insecticides dans le monde. Mais ils sont aussi utilisés pour la protection directe des humains. En effet certains insectes sont vecteurs de maladies parfois mortelles, transmissibles à l'homme par simple piqûre. L'incidence mondiale de décès causés par des maladies à transmission vectorielle est montrée en figure 1. Plus de 90% de ces maladies sont transmises par les moustiques anophèles [MCGRAW '13b]. Les plus connues sont la dengue, le chikungunya ou le paludisme. Avec plus de deux millions de cas avérés dans le monde, le chikungunya n'est plus une maladie spécifique de certain pays tropicaux, puisque son principal moustique vecteur (*Aedes albopictus*, couramment nommé moustique tigre) vient de s'implanter en Europe, et a même été repéré aux portes de

Lyon. La dengue, qui parfois est à l'origine de complications mortelles, progresse depuis quelques décennies, et 60 à 100 millions de personnes sont infectées. Quant au paludisme, il tue de un à trois millions de personnes par an. La situation est d'autant plus préoccupante que les moustiques résistent de plus en plus aux insecticides.

Les moustiques ne sont pas les seuls insectes pouvant interférer avec la santé humaine. Les phlébotomes (diptères) sont un autre exemple d'insectes vecteurs. Les leishmanioses sont un groupe de maladies parasitaires à transmission vectorielle dues à des protozoaires flagellés du genre *Leishmanian*. Ces parasites affectent de nombreuses espèces de mammifères, dont le chien qui en est la cible principale, mais le nombre de cas humain est en augmentation. *Leishmania infantum* est la seule espèce présente en France métropolitaine. Elle est transmise par la piqûre de deux espèces de Phlébotomes, *Phlebotomus perniciosus*, et *P. ariasi*. L'infection par ces parasites se présente sous différentes formes allant d'une atteinte viscérale à des lésions tégumentaires et peut parfois entraîner la mort [DEDET '13]. Dans le monde, ces parasites transmis par les phlébotomes affectent la santé des populations à hauteur de deux millions de cas dans le monde selon l'OMS.

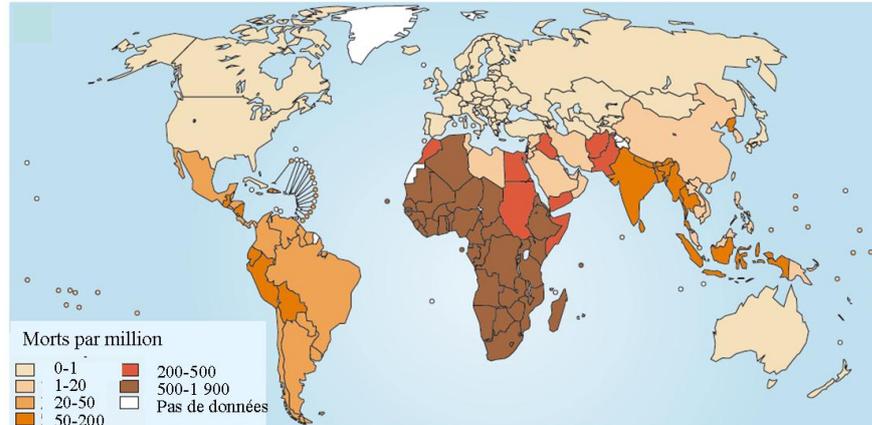


Figure 1 : Carte montrant l'incidence mondiale des décès causés par des maladies à transmission vectorielle (World-Health-Organization, 2004).

Depuis ces 20 dernières années, il y a eu recrudescence ou émergence dans des zones auparavant épargnées des maladies à transmission vectorielle. L'intense circulation des personnes et des biens, ainsi que les changements climatiques globaux permettent aux vecteurs de se déplacer

et se s'implanter dans de nouvelles régions. La maîtrise de leur population devient donc un enjeu majeur pour la protection des cultures, mais aussi pour la préservation de la santé humaine.

1.2 La lutte contre les insectes

Différents systèmes de lutte contre les insectes existent. On peut les regrouper en cinq classes : la lutte environnementale, la lutte biologique, la lutte génétique, la lutte mécanique, et la lutte chimique. A l'heure actuelle la lutte chimique est prédominante et l'utilisation des autres types de lutte est encore marginale.

1.2.1 Les principaux insecticides et leurs cibles

Sont nommés insecticides les substances actives ayant la propriété de tuer les insectes, leurs larves ou leurs œufs, mais aussi plus généralement les arthropodes. Ils sont classés par famille en fonction de leur mode d'action. Les cibles potentielles des insecticides sont nombreuses : système nerveux central, le métabolisme respiratoire ou le métabolisme hormonal. Il existe de nombreuses substances actives chimiques, cependant seules quatre familles représentent chacune plus de 10% de part de marché et plus de 70% de l'ensemble : les organophosphorés (à partir de 1940), les carbamates (à partir de 1950), les pyréthriinoïdes (à partir de 1970), et les néonicotinoïdes (à partir de 1990) [NAUEN '06] (figure 2). Toutes ces substances agissent sur le système nerveux. En effet, ces insecticides neurotoxiques ont l'avantage d'opérer avec un délai très bref qui permet d'agir rapidement pour stopper la destruction des cultures et la diffusion de maladies à transmission vectorielle. De plus ils agissent à faible dose sur des sites pour lesquels une faible perturbation peut se révéler mortelle. La faiblesse des mécanismes de détoxification du système nerveux des insectes permet un effet prolongé des neurotoxines [CASIDA '04]. Les insecticides les plus couramment utilisés sont présentés dans ce travail en fonction de leur cible ou mode d'action.

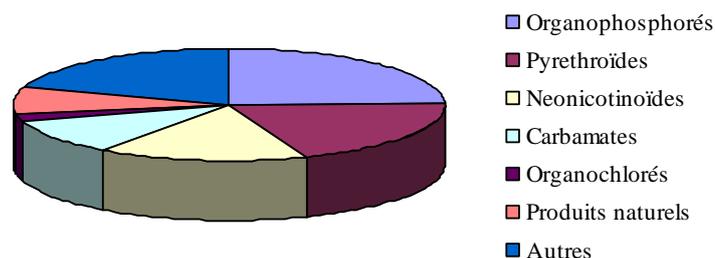


Figure 2 : Représentation des principales classes d'insecticides et leur part respective dans le marché mondiale. D'après [Nauen '06].

1.2.1.1 Insecticides ciblant l'acétylcholinestérase

L'acétylcholine est un neurotransmetteur qui au cours de l'influx nerveux est libérée au niveau des synapses des neurones dites «cholinergiques» du système nerveux, pour transmettre l'information nerveuse d'un neurone au suivant (figure 3). Une fois l'information transmise, l'acétylcholine est hydrolysée par l'acétylcholinestérase. Si cette hydrolyse n'a pas lieu, l'augmentation d'acétylcholine induit une hyperactivité aboutissant à la mort de l'insecte. Les organophosphates et les carbamates inhibent cette enzyme, par phosphorylation ou carbamylation, l'empêchant d'hydrolyser l'acétylcholine.

Les carbamates sont des composés dérivés de l'acide carbamique. Ils ont été très utilisés car ils sont relativement biodégradables et ont une toxicité dermique peu élevée. Par exemple, le carbofuran est utilisé comme insecticide systémique des plantes, le primicarb en agriculture pour le traitement systémique contre les pucerons, l'aldicarb essentiellement pour la protection contre les nématodes, et le carbaryl pour la protection des jardins de particuliers. Bien qu'ils n'aient pas des modes d'action complètement identiques, les carbamates ont en commun un effet réversible car le complexe carbamate – acétylcholinestérase n'est pas stable dans le temps [MANAHAN '02].

Le second type d'insecticide inhibiteur d'acétylcholinestérase est représenté par les organophosphorés. De très nombreux composés organophosphorés ont été synthétisés pour leur rôle insecticide, mais sont aussi des gaz toxiques qui ont été utilisés militairement pendant la seconde

guerre mondiale. Dans cette famille on peut citer le malathion qui est un insecticide puissant ou le glyphosate qui est un désherbant total foliaire systémique plus connu sous le nom de Round-up. Les organophosphorés phosphorylent l'enzyme acétylcholinestérase, de manière stable et irréversible. Il y a dégradation des organophosphorés par des estérases, donc ces composés sont non persistants dans les systèmes biologiques.

Chez les mammifères, tout comme chez les insectes, l'inhibition de l'acétylcholinestérase et l'accumulation d'acétylcholine conduisent à la sur-excitation du système nerveux et à la mort de l'individu. Ce sont les différences existantes entre insectes et mammifères dans la structure des enzymes, et la conformation du site d'action, qui confèrent la spécificité des inhibiteurs pour les insectes [FUKUTO '90, CASIDA '12].

1.2.1.2 Insecticides ciblant le récepteur nicotinique

L'acétylcholine est le principal neurotransmetteur exciteur pour les transmissions rapides dans le système nerveux central des insectes. Lors de l'influx nerveux, l'acétylcholine est relâchée par la membrane pré-synaptique et va interagir avec le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (AChR). Ce récepteur forme un canal ionique dont l'ouverture dépend de la fixation de l'acétylcholine, ce qui entraîne un influx de Na^+ extracellulaire et un efflux de K^+ intracellulaire, déclenchant ainsi l'influx nerveux. La dégradation de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase stoppe le signal. La nicotine est un agoniste non hydrolysable de l'acétylcholine, elle reste fixée au récepteur ce qui empêche sa fermeture, et ce qui perturbe le signal en créant une hyperpolarisation de la cellule. La nicotine est plus toxique pour les mammifères que pour les insectes, elle ne peut donc pas être utilisée comme insecticide [CASIDA '13].

Les néonicotinoïdes représentent la famille d'insecticides la plus commercialisée dans le monde depuis son apparition dans les années 1990. Dans la majorité des cas ce sont des dérivés synthétiques de nicotine comme par exemple l'imidaclopride [MATSUDA '09]. Ils agissent de la même façon que la nicotine, mais les modifications structurales mineures qui les différencient leur confèrent une sélectivité pour les insectes par rapport aux mammifères.

Le cartap, une nereistoxine issue du ver marin *Lumbriconereis heteropoda* [MATSUDA '09], et la famille des spinosynes produites lors de la fermentation des *Saccharopolyspora spinosa* [KIRST '10], présentent le même mode d'action que les néonicotinoïdes, en bloquant le récepteur nicotinique de l'acétylcholine, mais ils n'ont pas le même site de fixation. Ils ont une forte spécificité pour les insectes [CASIDA '13].

1.2.1.3 Insecticides ciblant le canal chlore

L'acide gamma aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur chez les insectes et les mammifères. Il agit par fixation sur un récepteur canal chlore (GABA R) en entraînant son ouverture, ce qui empêche l'excitation prolongée des neurones. Certains insecticides, comme les cyclodiènes, les phénylpyrazoles (par exemple le Fipronil) ciblent le récepteur GABA et empêchent le flux chlorique. L'excitation prolongée des neurones entraîne la mort de l'insecte.

L'ivermectine et ses analogues ont un effet antagoniste aux insecticides présentés précédemment. Leur fixation bloque la fermeture des canaux chloriques (récepteur GABA et récepteur glutamate) ce qui entraîne la paralysie et la mort par atteinte neuro-musculaire. Le récepteur canal chlore glutamate est présent uniquement dans le système nerveux des invertébrés, ce qui confère une grande spécificité aux insecticides qui ont pour cible ce récepteur [RAYMOND-DELPECH '05, CASIDA '13].

1.2.1.4 Insecticides ciblant le canal sodium

Les canaux sodique voltage dépendant sont essentiels pour l'initiation et la propagation des potentiels d'action dans le système nerveux. Ils s'ouvrent et se ferment en réponse aux changements de potentiel de la membrane. La dépolarisation de la membrane entraîne l'ouverture rapide du canal qui se referme lors de la repolarisation. Les pyrèthrine, composés provenant de la pyrèthre de Dalmatie (plante de la famille des astéracées), les pyrèthroïdes synthétiques, l'oxadiazine et le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), bien que d'origines très différentes, ont la même cible. Ils agissent sur les canaux sodiques voltage dépendant en bloquant le transport du sodium, ce qui a pour conséquence la dépolarisa-

tion de la membrane nerveuse, perturbant ainsi la signalisation électrique dans le système nerveux des insectes [RAYMOND-DELPECH '05, CASIDA '13, DU '13].

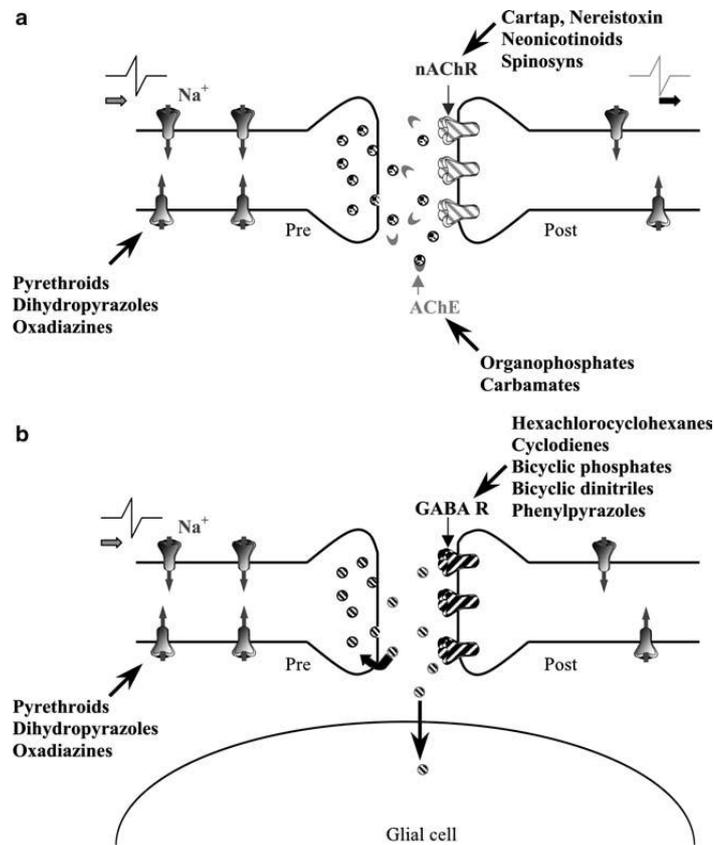


Figure 3 : Les zones cibles des insecticides dans le système nerveux des insectes. a : Représentation schématique d'un neurone et d'une synapse cholinergique avec les cibles principales des insecticides. ACh : acétylcholine ; AChE : acétylcholinestérase ; AChR : récepteur cholinergique de type nicotinique. N : noyau ; Na : canal sodium ; Pré : élément présynaptique ; Post : élément postsynaptique ; RyR : récepteur à la ryanodine. B : Représentation schématique d'une synapse GABAergique avec les cibles principales des insecticides. GABA : acide gamma-aminobutyrique ; GABA R : récepteur au GABA ; Na : canal sodium ; Pré : élément présynaptique ; Post : élément postsynaptique (Raymond-Delpech et al 2005).

1.2.2 Mécanismes d'acquisition de la résistance

La toxicité des insecticides résulte de leur interaction avec leur cible biologique présente chez l'insecte. La molécule insecticide doit entrer en contact avec l'insecte, pénétrer dans l'organisme, dans certains cas

être transformée en métabolite actif, puis être transportée jusqu'à sa cible. Tout mécanisme qui modifie l'une de ces étapes peut donc conduire à une résistance [SODERLUND '91]. Il existe différents types de mécanismes pouvant conduire à la résistance à certains insecticides. La résistance comportementale où l'insecte change son comportement avec pour objectif d'éviter l'insecticide, la résistance métabolique et la mutation de cible.

1.2.2.1 La résistance métabolique ou détoxification

Chez l'insecte résistant, il y a une augmentation de l'activité catalytique et/ou de la quantité d'enzyme intervenant dans la dégradation normale des insecticides. Trois familles d'enzymes sont connues pour leur rôle de détoxification chez l'insecte : la famille des cytochromes P450s, la famille des glutathion transférases (GST), et la famille des carboxylestérases [DAVID '05].

Les cytochromes P450s sont une importante famille d'enzymes dont la principale fonction est de catalyser l'oxydation d'un grand nombre de composés organiques. Elles sont nommées ainsi car elles absorbent préférentiellement la lumière à une longueur d'onde de 450 nanomètres. En raison de leur grande diversité génétique, elles sont le seul système métabolique pouvant entraîner une résistance à toutes les classes d'insecticides ; chez l'insecte il existe plus de 660 gènes de la famille des P450. Le phénomène de résistance apparaît par amplification, augmentation de la transcription, ou mutation d'un de ces gènes [LI '07].

Les glutathions transférases sont des enzymes impliquées dans le métabolisme de détoxification et d'excrétion d'une quantité importante de produits endogènes ou exogènes des cellules. Elles peuvent être impliquées dans de nombreux phénomènes de résistance aux insecticides, comme par exemple la résistance d'*Anopheles gambiae* au DDT. Il a été montré que dans certaines populations de ce moustique, il y a une surexpression du gène *GSTE2*, qui code pour une enzyme GST ce qui induit la déhydrochlorination de la toxine, et son inactivation. [ORTELLI '03].

La résistance aux insecticides carbamates et organophosphorés se retrouve parmi de nombreux arthropodes comme les tiques, les pucerons, les cafards ou les moustiques. Elle peut être due à l'augmentation de la synthèse d'estérases, qui séquestrent et hydrolysent la toxine cible. Chez

le moustique *Culex pipiens quinquefasciatus*, un gène codant pour une estérase (*esta2*) a été retrouvé plus de 80 fois dans le génome des insectes les plus résistants [VAUGHAN '97]. Ces résistances peuvent être dues à la mutation du promoteur, ou à l'augmentation du nombre de copie du gène impliqué ce qui entraîne la surproduction de l'enzyme, mais aussi à une mutation de la séquence qui entraîne une meilleure affinité pour la toxine ciblée. Il n'est pas rare que l'apparition d'une résistance à une toxine, entraîne la résistance à d'autres toxines ayant la même cible [HEMINGWAY '04].

1.2.2.2 La résistance par mutation de cible

Cette résistance n'induit pas de changement métabolique chez l'insecte. En revanche, une simple mutation ponctuelle sur le gène codant le récepteur (canal sodium, le récepteur GABA ou l'acétylcholinestérase), peut entraîner une modification de la séquence en acide aminé de celui-ci. Une ou plusieurs de ces modifications peuvent occasionner une diminution de l'affinité, voire une absence totale de liaison de la toxine sur son récepteur [HEMINGWAY '04]. Par exemple, la résistance de type *kdr* (knock-down resistance) est due au remplacement d'un acide aminé (leucine en phénylalanine) dans un des domaines du canal sodium. Cette simple mutation, découverte en premier lieu chez la mouche domestique (*Musca domestica*) exposée au DDT, rend les insectes porteurs 30 fois plus résistants à tous les pyréthroïdes ainsi qu'au DDT. Maintenant cette résistance est retrouvée dans de nombreux insectes ravageurs [VAIS '00, BURTON '11].

La modification de la séquence de l'acétylcholinestérase est la plus grande cause de résistance aux organophosphorés et aux carbamates. Ces insecticides inhibent son activité par phosphorylation ou carbamylation d'une sérine placée au fond de la gorge qui forme le site actif. Les mutations qui confèrent une augmentation de la résistance aux insectes sont celles situées à l'entrée de la gorge et qui limitent l'accès du site actif pour les toxines. Une augmentation du nombre de mutation, entraîne l'accroissement de la résistance à un plus grand nombre de toxines [HEMINGWAY '04].

Le récepteur GABA est composé de cinq sous-unités qui s'organisent afin de former le canal chlore. La mutation d'un des gènes codants pour une des sous-unités du récepteur GABA, le gène *Rdl* (Resistance to dieldrin), entraîne la résistance de l'insecte à toutes les cyclodiènes. Cette mutation extrêmement bien conservée est responsable de plus de 60% des cas de résistance aux cyclodiènes [ROCHELEAU '93, VAIS '00].

1.2.3 Insecticides et environnement

C'est aux Etats-Unis, en 1962, que les premières questions concernant les effets néfastes des insecticides sur l'environnement ont été soulevées publiquement. Rachel Carson, dans son ouvrage intitulé « Printemps silencieux » dévoile que l'utilisation non contrôlée de DDT entraîne la diminution de l'épaisseur des coquilles d'œuf chez les oiseaux, et occasionne des problèmes de reproduction et une hausse de la mortalité [CARSON '12]. Ce livre qui a été classé au top des ventes pendant plusieurs semaines aux Etats-Unis est considéré par certains comme le précurseur du mouvement écologique.

Les insecticides sont conçus pour cibler spécifiquement certains insectes nuisibles. Les organismes vivants partagent, quel que soit leur rang taxonomique, des fonctions physiologiques faisant appel à des mécanismes communs. De ce fait, un insecticide destiné à lutter contre un organisme spécifique, peut présenter un potentiel toxique pour d'autres organismes non cibles [CASIDA '13]. De plus, un pesticide peut agir en première intention sur la cible moléculaire visée, tout en ayant la capacité d'agir sur un autre site. Ces autres cibles, pas forcément impliquées dans la toxicité contre l'insecte nuisible, sont souvent peu ou pas connues, et parfois découvertes bien après les premières utilisations sur le terrain. On peut citer par exemple les organophosphorés dont les propriétés hormonales ont été découvertes bien après le début de leur utilisation [CLEMENT '85, BLANCO-MUÑOZ '10]. De plus, après traitement par des insecticides des zones cibles, les produits chimiques peuvent contaminer leur environnement. Par exemple, le Methomyl qui est un carbamate largement utilisé ces 40 dernières années, a une demi-vie d'environ une semaine après traitement, mais sous certaines conditions elle peut atteindre 50 jours. En rai-

son de sa nature très hydrophile, ce produit peut contaminer le sol ainsi que les eaux souterraines et de surfaces. Dans la nature ce composé est essentiellement dégradé par digestion microbienne, les micro-organismes du sol s'en servant comme source de carbone et/ou d'azote. Malgré cette dégradation, ce composé a déjà été retrouvé dans des réseaux d'eau urbains à des concentrations considérées comme impropres à la consommation [VAN SCOY '13].

Depuis la parution du « Printemps silencieux », de nombreuses études ont été réalisées sur les effets des pesticides sur l'environnement. Il a été montré scientifiquement que l'exposition répétée des oiseaux au DDT entraînait effectivement l'amincissement de la coquille, ainsi qu'une diminution de la reproduction. Des travaux sur des oiseaux tels que la mouette ou le merle, montrent que les produits chimiques contenus dans les pesticides induisent également des effets tels qu'une augmentation de la mortalité, une réduction de la fertilité, ou des anomalies du développement du squelette [FRY '95].

Sandahl et collaborateurs ont également montré que la présence d'insecticides organophosphorés et pyréthroïdes affecte la sensibilité des neurones olfactifs du saumon et d'autres poissons. Cette diminution de leurs capacités sensorielles entraîne des perturbations du comportement relié à l'olfaction qui est d'importance majeure pour la survie et la migration des salmonidés [SANDAHL '04].

Les animaux ne sont pas les seuls touchés par les traitements de pesticides à répétition. Les effets des pesticides sur les micro-organismes du sol varient en fonction du type de substances utilisées et de la composition et du pH du sol. Par exemple, les traitements dans le respect des réglementations par les insecticides Aldicarb (carbamate) ou Deltaméthrin (pyréthroïde) n'entraînent pas une diminution du nombre de micro-organismes présents dans le sol, mais une diminution de leur diversité [IMFELD '12].

Il existe de très nombreux autres exemples montrant les effets des insecticides sur l'environnement. Tous ces exemples nous poussent à nous interroger sur les effets qu'ils pourraient avoir sur l'homme.

1.2.4 Insecticides et santé humaine

Il existe trois voies d'entrée pour les substances insecticides dans l'organisme : la voie cutanée, la voie orale, ou la voie respiratoire. La toxicité de la substance dépend de son mode d'absorption, de ses propriétés chimiques, mais aussi de son métabolisme et des mécanismes possibles de détoxification. Certains produits qui présentent une toxicité aiguë importante peuvent être éliminés facilement par l'organisme. A l'inverse, d'autres substances de toxicité moindre sont susceptibles de s'accumuler dans l'organisme et d'induire des effets à plus long terme qui sont difficilement quantifiables.

On peut classer les effets des pesticides sur la santé humaine en deux catégories : les effets à court terme et les effets à long terme. Les effets à court terme concernent essentiellement les utilisateurs dans un contexte d'usage professionnel. L'emploi inadéquat de ces produits peut entraîner dans des délais relativement brefs (heures, jours) des troubles de la santé. A très forte dose, les insecticides peuvent agir sur l'humain par un mécanisme similaire à celui mis en jeu lors de leurs actions contre l'insecte cible. C'est une intoxication aiguë. L'étude de cas de personnes ayant ingéré de fortes doses d'insecticides organophosphorés, montre un très fort taux de développement de neuropathie lorsque l'empoisonnement n'entraîne pas la mort dans de brefs délais [MORETTO '98]. Les effets d'empoisonnement par les insecticides sont relativement bien connus, ils peuvent être également allergisants, systémiques, dermatologiques, ou respiratoires et entraînent parfois la mort (rapport Inserm 2013).

En revanche, les effets à long terme des insecticides sur la santé humaine, y compris à des faibles doses d'exposition, sont nettement moins connus et plus difficilement appréciables. Aujourd'hui les chercheurs s'interrogent sur l'hypothèse selon laquelle une exposition à des substances exogènes possédant des effets sur le système endocrinien pourrait être à l'origine d'une grande variété d'effets délétères sur l'organisme, tels des cancers, des atteintes de la fonction reproductrice (problèmes de fertilité masculine, malformations de l'appareil génital masculin) ainsi que des effets sur le système immunitaire et sur la fonction thyroïdienne. Plusieurs pesticides, parmi lesquels des insecticides (DDT, Endosulfan, Dieldrine,

Methoxychlore, Dicofol, Toxaphène) figurent sur la liste des perturbateurs endocriniens. Certaines de ces molécules sont aujourd'hui interdites en Europe mais peuvent néanmoins toujours être présentes dans notre environnement [CRAVEDI '07].

Le regroupement des résultats de 49 analyses a permis de fortement suspecter l'effet des organophosphorés et pyréthroïdes sur la santé humaine. Le taux d'exposition à ces composés est mesuré par quantification des produits de leur dégradation par les cellules humaines. La dégradation de tous les insecticides organophosphorés donne du phosphate de dialkyle, quantifiable dans les urines. Il n'existe pas un composé permettant la mesure du taux d'exposition à tous les pyréthroïdes, mais par exemple la présence de l'acide 2,2-dichlorovinyl-2,2-diméthylcyclopropane-1-carboxylique permet de détecter l'exposition à des insecticides tels que le perméthrine, le cyperméthrine, et le cyfluthrine, et la présence de l'acide 3-phénoxybenzoïque est la marque de la présence d'une vingtaine de pyréthroïdes de synthèse. Les résultats de ces différentes études établissent un lien entre l'exposition à ces insecticides dans le cadre familial et certaines pathologies. Les organophosphorés seraient responsables de l'augmentation des problèmes lors du développement prénatal du système nerveux, et seraient impliqués dans la baisse de la fertilité mâle et dans l'augmentation de l'apparition de pathologies neurologiques chez l'adulte. Les pyréthroïdes seraient fortement corrélés à des désordres hormonaux, ce qui entraînerait la diminution de la qualité du sperme, et par ce biais une forte diminution de la fertilité mâle [KOUREAS '12].

L'implication dans de telles maladies des substances insecticides chez l'humain dans le cadre de la vie quotidienne reste à l'état de forte présomption. De plus il est difficile de déterminer avec précision quelle substance est impliquée pour chacune des pathologies. Afin de limiter au maximum les risques liés à l'utilisation de pesticides sur la santé humaine et sur l'environnement, leur mise sur le marché et leurs conditions d'utilisation sont soumises à une forte législation mise en place par les différentes autorités gouvernementales.

1.2.5 Insecticides et législation

Dans le cadre de la législation, les insecticides sont considérés comme produits phytosanitaires. En plus des pesticides, cette catégorie prend en compte tous les produits exerçant une action sur les végétaux (régulateur de croissance, conservateurs...) à l'exception des substances nutritives.

Pour être mis sur le marché en France, chaque produit phytosanitaire doit être homologué sur la base de l'analyse d'un dossier complet fourni par le demandeur et expertisé par les instances compétentes. En France l'autorisation de mise sur le marché (l'AMM) est délivrée par l'Anses (l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). Cette homologation nationale a été harmonisée avec les autres États membres de l'Union Européenne de manière réglementaire (Règlement (CE) N°1107/2009). Avant d'être commercialisés, tous les produits phytosanitaires doivent obtenir une AMM. Quand un composé est synthétisé par une firme phytopharmaceutique, il est testé en premier lieu en laboratoire ou en serre, puis sur de petites parcelles. La demande d'AMM est accompagnée d'un dossier scientifique complet comportant :

- *Un dossier biologique* qui renseigne sur l'efficacité agronomique de la préparation et la sélectivité du produit à l'égard des végétaux.

- *Un dossier toxicologique* qui renseigne sur la toxicité du produit pour l'homme (des tests de toxicité aiguë et chronique, tests de cancérogénèse, de mutagénèse, de reprotoxicité,...) et pour l'environnement (analyse de l'influence sur les poissons, les oiseaux, les insectes, les micro-organismes mais également les processus de dégradation dans l'eau, l'air et le sol).

50% des analyses réalisées pour ce dossier concernent les effets potentiellement toxiques sur l'homme, 40% concernent l'étude des effets sur l'environnement, et seulement 10% concernent l'étude des effets agronomiques de la substance testée. Ce dossier permet aux experts de proposer un classement toxicologique et des conseils de prudence à respecter pour une utilisation en toute sécurité.

L'AMM est délivrée ou non en fonction d'un équilibre entre les risques toxicologiques et l'intérêt agronomique de la substance. Elle est

délivrée pour une période de 10 ans reconductible, mais cette homologation peut être révisée à tout moment après l'apparition d'effets défavorables non observés lors de l'évaluation. Elle est accordée pour un type de culture, un type de parasite ou maladie, une dose d'emploi, une condition d'application et un pays. La totalité des produits homologués en France et leurs conditions d'utilisation autorisées, est présentée sur le site ministériel : <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/> ; Le non respect de ces pratiques est passible de deux ans de prison et d'une amende allant jusqu'à 3800 euros.

Les résultats obtenus lors des différents tests permettent de classer les substances phytosanitaires selon leur caractère CMR (Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique) pour l'homme en trois catégories :

-**Catégorie 1** : Substance connue cancérigène ou mutagène ou toxique pour la reproduction chez l'homme (preuves épidémiologiques)

-**Catégorie 2** : Substance assimilée à un CMR, pouvant provoquer des effets CMR chez l'homme (fortes présomptions)

-**Catégorie 3** : Effets CMR possibles chez l'homme (substances préoccupantes, preuves insuffisantes pour la catégorie 2).

L'ensemble de ces tests va permettre de définir les seuils toxicologiques de référence dans le but d'assurer la sécurité de l'opérateur et du consommateur.

-AOEL (Acceptable operator exposure level). C'est la quantité maximum de substance active à laquelle l'opérateur, et des résidents proches des zones traitées, peuvent être exposés quotidiennement, sans danger pour leur santé.

- DES (Dose Sans Effet). C'est la limite en dessous de laquelle aucun effet n'a été constaté lors de l'ensemble des tests pour un produit donné.

-Pour une sécurité maximale, on divise cette DES obtenue par 100 pour fixer la Dose Journalière Admissible (DJA).

Ces notions de DES et de DJA conduisent ensuite, pour chaque produit et chaque culture, à la définition de Limites Maximales de Résidus, les LMR, que l'on pourra retrouver dans un aliment ou dans l'eau potable. Les LMR des pesticides correspondent aux quantités maximales attendues, à partir des bonnes pratiques agricoles (BPA) fixées lors de l'homologation du produit. Par exemple pour l'eau, les réglementations européenne et française fixent à $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ la concentration maximale pour chaque pesticide (à l'exception de quelques composés tel que le dieldrine,

dont la limite est placée à $0,03 \mu\text{g.L}^{-1}$) et à $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ la concentration maximale en pesticides totaux.

La veille toxicologique en France est réalisée par différents instituts ministériels. Depuis 2003 par exemple, l'ORP (l'Observatoire des Résidus de Pesticides, <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/>) a pour objectif de rassembler, analyser et valoriser les informations sur la présence des pesticides dans différents milieux. Ses travaux doivent permettre de caractériser l'exposition aux pesticides de la population (générale et professionnelle) et des écosystèmes à des fins d'évaluation des risques. Ils doivent également faciliter la recherche scientifique dans le domaine sanitaire.

Bien que très contrôlée, l'utilisation de pesticides en France est encore très importante. Nous sommes le 4^{ème} utilisateur mondial de pesticides. Dans l'objectif de diminuer l'utilisation de pesticides en Europe, l'Union Européenne a mis en place depuis 2008 le plan Ecophyto 2018. Le principal défi d'Ecophyto est de diminuer le recours aux produits phytosanitaires de 50% sur une période de 10 ans, tout en continuant à assurer un niveau de production élevé tant en quantité qu'en qualité. Pour cela, certaines mesures ont été prises, telles que la formation des agriculteurs à une utilisation responsable des pesticides, ou la mise en ligne dans chaque région de bulletins de santé végétal qui alertent les producteurs sur l'arrivée des ravageurs. Afin de pouvoir atteindre ces objectifs, il est nécessaire de mettre en place d'autres systèmes de protection des cultures, qui ne passent pas uniquement par l'utilisation de produits chimiques.

1.2.6 Les moyens de lutte non chimique

1.2.6.1 La lutte environnementale et mécanique

Le développement des insectes nécessite un environnement adéquat. Parfois l'homme, par les changements qu'il occasionne à la nature, peut favoriser le développement de populations d'insectes ravageurs. Par exemple en Ouganda, la destruction des papyrus dans les marécages naturels pour des objectifs agricoles entraîne un développement d'*Anopheles gambiae*, et de ce fait une augmentation du taux de transmission du palu-

disme dans les zones environnantes [LINDBLADE '00]. La lutte environnementale consiste en la diminution de ces zones propices au développement des insectes. Dans les pays où sévissent les insectes vecteurs de maladies transmissibles à l'homme, la lutte environnementale est essentiellement utilisée pour limiter les populations de moustiques. On peut citer par exemple des actions telles que le drainage des fossés et des zones humides, qui ont permis de diminuer drastiquement le nombre d'anophèles, entraînant la réduction du taux de transmission de la malaria au niveau du point d'extinction dans des régions israéliennes [KITRON '89, IMBAHALE '12].

Il existe de nombreuses formes de lutte mécanique qui permettent d'éloigner les insectes, de les piéger ou de les éliminer. On peut citer par exemple les filets de protection, les pièges hormonaux, ou l'adaptation des silos. En France la protection contre le ravageur des fruits *Cydia pomonella*, dont la larve détruit certains fruits comme les pommes, les poires ou les noix, passe de plus en plus par l'utilisation de filets, ce qui empêche les femelles de venir pondre dans les fruits. Le stockage des graines en silos métallisés hermétiques dans lesquels l'oxygène est éliminé, empêche le développement des insectes à un coût relativement abordable, ce qui permet son utilisation dans les pays en voie de développement [TEFERA '11]. Les pièges à phéromones sont utilisés afin de détecter et de dénombrer les insectes adultes, mais ils sont aussi très efficaces pour traiter les zones moyennement infestées. Par exemple, des diffuseurs de phéromones femelles déstabilisent les mâles lors de la recherche de leur partenaire, et dans la plupart des cas ils meurent d'épuisement avant d'avoir pu se reproduire. De par le monde ils sont utilisés pour la protection de plus d'un million d'hectares et cette utilisation est en constante expansion depuis ces 30 dernières années [WITZGALL '10].

1.2.6.2 La lutte biologique

La lutte biologique est « l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs », selon la définition officielle de l'OILB (Organisation International de Lutte Biologique et intégrée). En lutte biologique, le ravageur est un organisme indésirable, tels que mauvaises herbes, insectes ou parasite du bétail et l'auxiliaire est

un organisme différent, ennemi naturel du ravageur, qui le tue à plus ou moins brève échéance ou qui tout au moins limite son développement.

On divise les auxiliaires en quatre groupes principaux [BOIVIN '01] :

Les micro-organismes :

L'agent pathogène auxiliaire peut être un champignon, une bactérie, un protozoaire ou un virus. Il infecte souvent l'hôte par ingestion où il se multiplie et cause sa mort par destruction de tissus, par septicémie, ou parfois par l'émission d'une substance toxique. On peut citer comme exemple la bactérie *Bacillus thuringiensis*, qui est le bio-pesticide le plus utilisé dans le monde et cela depuis plus de 50 ans [NIELSEN-LEROUX '12].

Les parasitoïdes :

La plupart des parasitoïdes vivent de manière indépendante en tant qu'adultes, mais leur reproduction et leur développement sont dépendants d'un insecte hôte, lequel meurt à l'achèvement du développement [ALTIERI '05]. On retrouve des espèces ayant un mode de vie parasitoïde dans six ordres d'insectes, dont 67000 espèces chez les Hyménoptères qui représentent environ 75% des parasitoïdes [BOIVIN '01]. On peut citer par exemple les guêpes de la famille des *Ichneumonidae* dont les larves parasitent majoritairement les lépidoptères et les coléoptères, mais aussi *Aleochara bilineata*, un coléoptère prédateur d'œufs de diptères au stade adulte mais dont le premier stade larvaire est un parasitoïde des pupes de diptères [BOIVIN '01, ALTIERI '05].

Les nématodes entomophages :

Ce sont de petits organismes vermiformes (0,4 - 1 mm), qui vivent dans le sol au détriment des larves des insectes. Ils ont le grand avantage de pouvoir être produit en bioréacteurs et de se conserver à basse température pendant des mois. Ils contaminent l'insecte par les ouvertures naturelles ou par perforation de la cuticule. Une fois à l'intérieur de l'hôte, le nématode libère des micro-organismes symbiotiques qui se multiplient et transforment l'insecte en un milieu idéal pour la reproduction des nématodes, provoquant la mort de l'insecte dans les 24 à 72 heures. On peut citer par exemple l'espèce *Steinernema carpocapsae* qui peut être utilisée dans la lutte contre *Mamestra brassicae*, la noctuelle du chou, en tant qu'alternative au traitement par la toxine de *B. thuringiensis* [NIELSEN-LEROUX '12, BECK '13].

Les prédateurs :

L'auxiliaire prédateur peut être un oiseau, un poisson insectivore, un nématode ou dans la plupart des cas un autre insecte. Les prédateurs tuent et mangent plusieurs proies au cours de leur développement, contrairement aux parasitoïdes. On peut citer par exemple le poisson *Aphyosemion gularis* qui est un prédateur naturel de larves d'anophèles et qui est utilisé pour la protection des populations contre le développement des maladies vectorielles, dans de nombreux pays tels que l'Argentine ou l'Iran [OKORIE '10].

On retrouve des espèces prédatrices de façon importante chez neuf ordres d'insectes, principalement chez les Hémiptères, Coléoptères, Diptères et Hyménoptères [BOIVIN '01]. On peut citer en exemple la coccinelle (la famille Coccinellidae), qui peut ingérer au cours de sa vie plus de 5000 pucerons, mais aussi les punaises du genre *Orius* qui semblent être les prédateurs les plus voraces des thrips. C'est le seul auxiliaire qui lutte aussi contre les thrips adultes. Il se nourrit également d'œufs d'insectes, de petites chenilles et peut dévorer plus de 30 acariens de la famille des Tetranychidae en une journée [ALTIERI '05].

La recherche pour développer la lutte biologique est importante, et ce moyen de lutte est de plus en plus utilisé en parallèle de la lutte génétique.

1.2.6.3 La lutte génétique

La lutte génétique est réalisée depuis des années par les obtenteurs qui par croisement cherchent à améliorer les plantes, sur des caractères tels que la couleur, la taille, mais aussi la résistance aux maladies et ravageurs. Les récents progrès en biotechnologies ont facilité l'amélioration des plantes, mais ont également conduit au développement des méthodes utilisées en lutte génétique. Différentes approches sont possibles pour lutter génétiquement contre les insectes : l'une d'entre elles est la production de plantes transgéniques qui expriment des molécules entomotoxiques. Le maïs Bt est l'exemple le plus connu de transformation génétique conduisant à l'amélioration des défenses des plantes. Un des gènes codants pour la protéine Bt est exprimé dans ces plantes ce qui leur confère une résistance à la pyrale, le principal insecte ravageur du maïs. En 2009 la surface totale de maïs transgénique Bt occupe 40,4 millions d'hec-

tares, correspondant à 37 % de la surface totale d'OGM cultivés dans le monde [NICHOLSON '07, JAMES '09].

Les baculovirus sont des virus spécifiques des invertébrés, et sont donc incapables d'infecter les vertébrés et les plantes. Parmi eux certains sont même sélectifs pour une ou quelques espèces d'insectes. Dans la nature ce virus tue les insectes trop lentement pour éviter les dégâts occasionnés sur les cultures. En revanche l'expression hétérologue d'entomotoxines issues d'acarien [POPHAM '97], d'araignée [PRIKHOD'KO '98], de scorpion [SUN '02], d'anémone de mer [PRIKHOD'KO '96] ou même l'expression de la toxine Bt [CHANG '03] par les baculovirus permet l'utilisation de ces virus modifiés [NICHOLSON '07].

La modification de l'insecte vecteur est une technique en pleine émergence, de plus en plus utilisée pour le contrôle des populations d'insectes vecteurs. Une des approches consiste à introduire dans la population des mâles porteurs d'une mutation létale dominante qui n'affecte que les femelles. Par exemple l'introduction d'un construit qui réduit l'expression d'un gène actif dans les muscles du vol de la femelle. Les « filles » des mâles génétiquement modifiés ne peuvent pas voler et donc ne peuvent pas se nourrir ou contaminer des humains [FU '10]. La technique du RNAi est utilisée en vue d'immuniser les moustiques contre le virus de la dengue. Une construction génétique exprimant une copie inversée d'une séquence répétée du virus de la dengue permet, lorsque le virus infecte l'hôte, d'activer le système immunitaire de l'insecte contre ce pathogène. Le virus ne peut plus coloniser l'insecte dont la piqûre n'est plus dangereuse pour l'humain [FRANZ '06, MCGRAW '13a].

1.3 Conclusion

Malgré la diversification des techniques de lutte contre les insectes, l'utilisation de pesticides chimiques reste largement majoritaire à l'heure actuelle. Pour tenir les résolutions concernant l'environnement prises par les gouvernements, il est nécessaire de trouver toujours plus d'alternatives viables aux pesticides. L'action combinée de nombreuses méthodes de lutte permettrait de diminuer les impacts néfastes sur l'environnement et la santé humaine, ainsi que le risque d'apparition de

résistance, tout en maintenant une agriculture économiquement performante. Dans ce cadre, le laboratoire BF2I (Biologie Fonctionnelle Insectes et Interactions) s'intéresse particulièrement aux interactions pouvant affecter la vie de l'insecte. Deux équipes s'intéressent à la symbiose obligatoire de l'insecte avec des bactéries hôtes. La perturbation de cette association nécessaire au bon développement de l'insecte pourrait être utilisée pour lutter contre certains ravageurs. L'équipe « Entomotoxine » travaille sur la recherche de molécules bioactives d'origine végétale. Ces recherches ont abouti à la découverte d'un peptide extrait de graines de pois nommée PA1b (Pea Albumin 1 sous-unité b) aux propriétés entomotoxiques intéressantes et qui pourrait être utilisé dans la lutte contre les insectes.

2 PA1b : une entomotoxine végétale

2.1 Introduction

2.1.1 Les graines de légumineuses

Les légumineuses représentent une famille de plantes dicotylédones très cultivée pour ses fruits (soja, pois, haricot...), son fourrage (trèfle, luzerne...), l'ornementation (acacia, arbre de Judée...) ou pour son bois (palissandre...). Le fruit de ces légumineuses est une gousse qui est une composante essentielle de l'alimentation humaine dans plusieurs parties du globe. Selon la FAO (Food and Agriculture Organization, <http://faostat.fao.org/>) la production mondiale de pois était de plus de 10 millions de tonnes en 2009. Dans certains pays en voie de développement les graines de légumineuses sont l'unique source de protéines alimentaires [BOUCHENAK '13]. Elles sont connues pour leur richesse protéique, comme par exemple les graines de pois (*Pisum sativum*), qui sont composées de protéines à raison de 21 à 32 % du poids sec, cette teneur variant en fonction des conditions environnementales [DAHL '12].

Les protéines de graines de légumineuses peuvent être classées en deux groupes : les globulines et les albumines. La fraction des globulines, qui représente environ 70% des protéines de graine est elle-même divisée en deux familles protéiques : les « 7S » et les « 11S ». Pendant la germination ces protéines sont rapidement décomposées pour subvenir aux besoins azotés de la plante. Le groupe des albumines est un groupe plus diversifié et est habituellement nommé « 2S ». Dans cette fraction se trouve la plupart des protéines requises pour le métabolisme cellulaire, mais aussi des protéines de stockage et des protéines aux fonctions encore inconnues [DERBYSHIRE '76]. Au sein de cette fraction il existe une protéine riche en soufre qui représente 4,5% des protéines totales de la graine

de pois, mais qui contribue pour 23% à la teneur en acides aminés soufrés [SCHROEDER '84]. La séquence en acides aminés de cette protéine a été identifiée par l'équipe de Gatehouse [GATEHOUSE '85]. Cette protéine de 4 kDa, nommée PA1b pour Pea Albumin 1 sous-unité b est codée par le gène *PAI* et est synthétisée lors du remplissage de la gousse. Sa teneur importante en cystéine (16,5%), ainsi que la modulation de la quantité de l'ARNm de *PAI* en condition de carence en soufre de la plante, conduisent à émettre l'hypothèse selon laquelle PA1b joue un rôle de réserve en soufre pour la plante [HIGGINS '86].

2.1.2 Découverte des propriétés entomotoxiques de PA1b

Il avait été montré que l'ingestion de farine de pois s'avérait toxique pour *Sitophilus oryzae* (le charançon du riz) et différents autres coléoptères, sans pour autant comprendre ce phénomène [VAYSSIÈRE '43, COOMBS '77, HOLLOWAY '85, DELOBEL '93, VAIS '00]. Des études réalisées au laboratoire BF2I, en collaboration avec le laboratoire de Biochimie et Technologie des Protéines de l'INRA de Nantes, a permis d'identifier PA1b comme la molécule responsable de la toxicité des graines de pois. Le peptide PA1b purifié à homogénéité s'est révélé toxique par ingestion pour les charançons des céréales, provoquant 100% de mortalité avec une TL_{50} d'environ 5,6 jours à une dose de $400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de nourriture.

PA1b est extrait d'une plante couramment cultivée, et qui est consommée par les humains et le bétail sans montrer de toxicité ni d'allergénicité. Les propriétés structurales de cette toxine lui permettent de supporter les étapes d'extraction et de purification sans perte de toxicité. Deux voies de valorisations sont envisageables, l'une par une utilisation directe de la toxine (épandage, appâts empoisonnés), l'autre par le biais de la création de variétés de céréales transgéniques, une approche rendue possible par la nature peptidique de PA1b. L'utilisation de PA1b en tant qu'entomotoxine a fait l'objet d'un dépôt de brevet [DELOBEL '98]. La nature de PA1b fait donc de ce petit peptide un insecticide conforme à l'image moderne des substances utilisables en agriculture. Cependant, avant de pouvoir utiliser PA1b dans la lutte contre les insectes de nombreux points doivent être approfondis. Depuis ces 15 dernières an-

nées, l'équipe « Entomotoxine » du laboratoire BF2I a comme principal objectif l'approfondissement des connaissances entourant cette protéine, avec pour objectif final son utilisation comme alternative à l'usage de pesticides chimiques.

2.2 Du gène à la protéine

2.2.1 Structure du gène *PA1*

La protéine PA1b, en même temps que la protéine PA1a, est codée par le gène *PA1*. Il est composé d'une séquence signal au sein de laquelle se trouve un intron, de la séquence codant PA1b, d'un premier propeptide, de la séquence codant PA1a, et d'un second propeptide (figure 4). Ce gène est transcrit en un ARNm puis traduit en une préprotéine de 13 kDa. Après clivage de la séquence signal, la préprotéine de 11 kDa est adressée dans le corps protéique de stockage de la graine. Le clivage des deux propeptides donne la protéine PA1b (37 acides aminés) et la protéine PA1a (53 acides aminés) [EALING '94]. Les travaux de Morton et ses collaborateurs ont montré que l'intron ne jouait aucun rôle dans la régulation de l'ARNm [MORTON '98].

Chez le pois sept gènes *PA1* sont connus actuellement, codant pour six isoformes différentes de PA1b. Des études de diversité génétique réalisées au sein des légumineuses ont permis de montrer l'existence du gène *PA1* dans de nombreuses légumineuses en présentant souvent plusieurs isoformes dans la même espèce. Ces études ont également permis de mettre en évidence un fort niveau d'homologie des séquences protéiques [KARAKI '14, LOUIS '04]. Pendant de nombreuses années, on a considéré le gène *PA1* comme présent exclusivement chez les légumineuses, mais en 2013 ce gène a été découvert chez *Phelipanche aegyptiaca*, une plante de la famille des Orobanchaceae dont le mode de vie parasitique augmente les chances de transfert horizontal de gène [ZHANG '13].

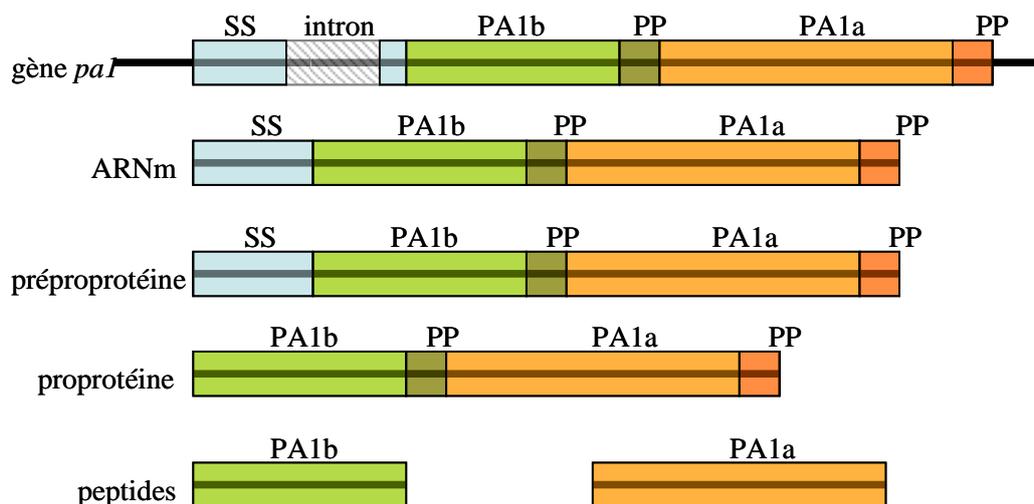


Figure 4 : Structure du gène *PAI* et maturation des peptides PA1b et PA1a. L'ARNm du gène *PAI* est transcrit en une pré-proprotéine de 13k Da, qui après coupure protéolytique de la séquence signal, puis des deux propeptides libère dans le milieu la protéine PA1b et la protéine PA1a. SS = Séquence Signal ; PP = ProPeptides.

2.2.2 Structure et propriétés de PA1b

PA1b est un peptide de 37 acides aminés comportant six cystéines impliquées dans trois ponts disulfure (Figure 5). Il a été également démontré que la protéine ne présente ni glycosylation ni phosphorylation [DELOBEL '98]. Par alignement de séquences PA1b de différentes légumineuses (figure 6), on observe une conservation assez importante de toute la préproprotéine, et cette conservation est plus importante dans les séquences codant PA1a et PA1b. Au sein de PA1b, les acides aminés de structure sont très fortement conservés, c'est-à-dire principalement les six cystéines et les cinq prolines. Deux autres régions montrent une conservation importante : la boucle dont la séquence « CSPFE » est retrouvée quasiment dans toutes les séquences connues de A1b, ainsi qu'une seconde boucle où si la séquence primaire n'est pas strictement conservée, il est observé une conservation du caractère hydrophobe.



Figure 5 : Séquence primaire de PA1b. Les résidus cystéine sont surlignés en gris et leur appariement est indiqué en dessous.

Une des propriétés remarquables de PA1b est sa stabilité. Il a été montré que ce peptide conservait son activité biologique après autoclavage [DELOBEL '98], après digestion enzymatique par des protéases (trypsine, papaine, protéinase K, à l'exception de la pronase E) ou digestion dans l'intestin des insectes, des ruminants et des porcs [SPENCER '88, HANCOCK '94, LE GALL '05, GRESSENT '07].

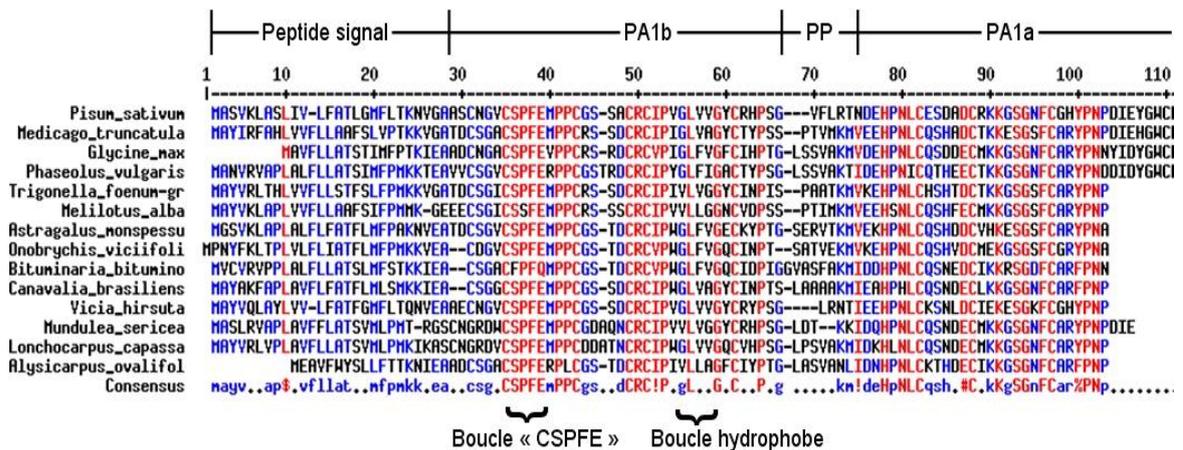


Figure 6 : Alignement protéique de la préproprotéine PA1 de différentes Légumineuses. La fin du peptide PA1a, ainsi que le propeptide terminal, ne sont pas représentés par manque de données dans cette zone. Les alignements permettent de caractériser deux boucles dans la protéine PA1b, l'une conservée nommée « CSPFE », et l'autre dont le caractère hydrophobe est conservé. Les acides aminés directement impliqués dans la structure tridimensionnelle (cystéines et prolines) sont très conservés.

2.2.3 Structure tridimensionnelle de PA1b

2.2.3.1 Détermination de la structure tridimensionnelle de PA1b

La séquence primaire de PA1b n'ayant pas d'homologie de séquence avec d'autres protéines connues, il était difficile d'émettre des hypothèses sur sa conformation et son mode de fonctionnement. La structure tridimensionnelle de PA1b a été déterminée par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et modélisation moléculaire au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) d'Orléans [JOUVENAL '03]. PA1b est un peptide compact, qui comporte trois feuillets antiparallèles et trois ponts disulfure par appariement des cystéines en 1-4, 2-5, et 3-6 (figure 7). Ces trois ponts disulfure forment une structure particulière dite à nœud de cystine. Le nœud est formé quand le troisième pont disulfure se crée en traversant la boucle formée par les deux premiers ponts disulfure. Cette conformation est caractéristique des protéines de la famille des peptides à nœud de cystine (ou knottines), qui sont des molécules très étudiées.

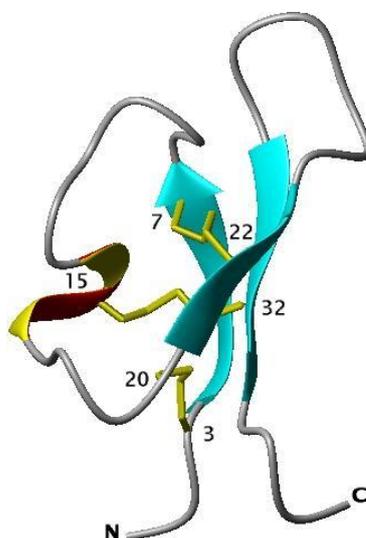


Figure 7 : Représentation tridimensionnelle de PA1b. Les ponts disulfure (en jaune) forment une figure dite en nœud de cystine, caractéristique des peptides de la famille des knottines. Les feuillets antiparallèles sont représentés par des flèches bleues.

2.2.3.2 La famille des knottines

La famille des knottines, ou cystine knot inhibitor (ICK) est une grande famille de peptides issus de différentes origines (plantes, champignons, insectes, venins d'animaux). La première knottine a été découverte dans les années 80 dans *Ecballium elaterium* en même temps que son activité anti-trypsine [LE NGUYEN '90]. La famille des knottines est caractérisée par une séquence de 28 à 50 acides aminés comportant six (ou huit) cystéines formant trois (parfois quatre) ponts disulfure liés en 1-4, 2-5 et 3-6, dont l'entrecroisement forme le nœud de cystine (Figure 8). Le motif cystine knot est également formé d'un feuillet β à trois brins antiparallèles. La longueur des boucles est variable [PALLAGHY '94, MOORE '10].

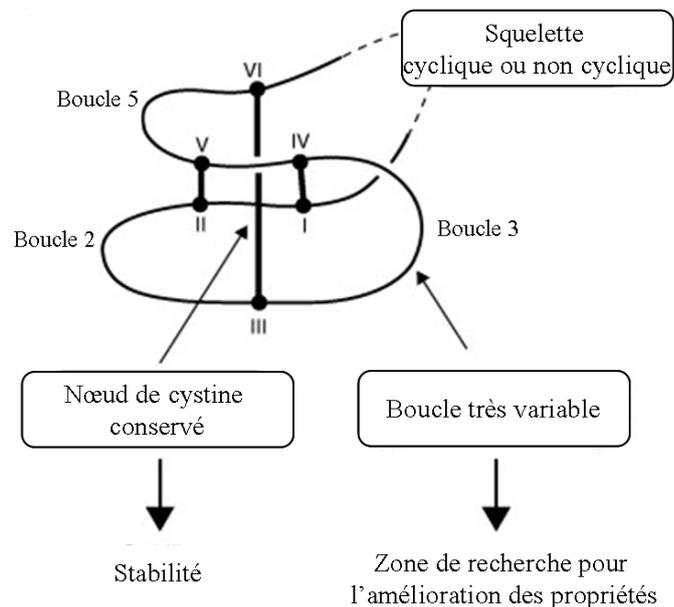


Figure 8 : Le motif cystine knot [DALY '11]. Les ponts disulfure 1-4, 2-3 et 3-6 sont représentés en gras. La cyclisation possible du squelette peptidique est montrée en pointillés.

Les knottines d'origine animale sont connues pour être principalement des inhibiteurs de canaux ioniques. Par exemple les conotoxines, issues du venin d'escargot marin, sont des modulateurs de nombreux canaux ioniques, et sont très étudiées en vue de leur utilisation thérapeutique

[DUTTON '01]. Les knottines d'origine végétale sont connues pour être des inhibiteurs d'enzymes, comme la toxine EETI-II issue d'*Ecballium elaterium*, ou les toxines de courge inhibitrices de protéases [CHICHE '04]. L'analyse structurale de PA1b [JOUVENSAL '03] ont montré que malgré son origine végétale, cette knottine présentait des propriétés structurales très similaires à celles d'une toxine d'araignée nommée ACTX-Hi:OB4219 [ROSENGREN '02].

Au sein des knottines il existe une sous-famille de peptides nommés cyclotides. Ce sont des knottines de taille généralement inférieure à 30 acides aminés et de structure cyclique, retrouvées chez les Rubiacées, les Violacées et les Cucurbitacées. Tout comme PA1b, ces peptides d'une stabilité exceptionnelle résistent à la dénaturation chimique, enzymatique et thermique [DALY '11]. Le membre de cette famille le plus étudié est le peptide kalataB1, qui est l'élément phare d'un médicament utilisé depuis des décennies en Afrique pour accélérer le travail lors de l'accouchement. Depuis, d'autres activités biologiques sont associées aux cyclotides telles que des activités insecticides, anti-microbiennes, anti-VIH, ou anti-tumorales [CRAIK '06].

2.3 Mécanisme d'action de PA1b

2.3.1 Génétique de la toxicité de PA1b

L'insecte modèle du laboratoire est le charançon des céréales. La toxicité de PA1b ayant été mise en évidence sur cet insecte, il a été utilisé pour décoder la génétique de la toxicité à PA1b. Un criblage de 90 souches appartenant aux trois espèces de charançon (*Sitophilus oryzae*, *S. granarius* et *S. zeamais*) a permis de sélectionner trois souches résistantes à PA1b, toutes de l'espèce *S. oryzae*, capables de s'alimenter sur le pois. Les croisements de souches sensibles et résistantes de charançon du riz ont permis de montrer un caractère mendélien du phénotype de la résistance à PA1b. La résistance est monogénique, récessive et est portée par un gène autosomal [GRENIER '97].

À partir d'une lignée de charançons sensibles à PA1b (WAA42) et par rétrocroisement le laboratoire a créé une lignée quasi-isogénique résistante à la toxine nommée IsoR3. En théorie, la seule différence entre ces deux souches se situe au niveau du gène responsable du caractère sensible ou résistant à PA1b. Les différences observables au niveau de ce gène devraient nous aider à comprendre le mécanisme de la toxicité de PA1b. L'existence d'un seul gène responsable du caractère sensible ou dominant a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle PA1b agirait *via* un récepteur, qui serait absent ou muté chez les insectes résistants.

2.3.2 Mise en évidence d'un site de liaison à PA1b chez *S. oryzae*

2.3.2.1 Mise en évidence de la liaison de PA1b

Dans l'objectif de déterminer la présence ou non d'un site de liaison à PA1b chez l'insecte sensible, le peptide PA1b a d'abord été marqué de manière classique à l'iode 125 sur son unique résidu tyrosine avec un rendement de 40%. Ce marquage permet l'obtention d'un radioligand présentant une activité spécifique de 900 Ci.mmol⁻¹ compatible avec les études de liaison.

Les études de liaison consistent à incuber le ligand radioactif et un extrait protéique, puis à mettre en évidence et à caractériser la formation d'un complexe entre le ligand et une (ou des) protéine(s) présente(s) dans l'extrait biologique. La détermination de la présence d'un récepteur à PA1b chez l'insecte sensible s'est faite dans un premier temps à partir d'extraits fractionnés de protéines membranaires de charançon du riz WAA42, et sur sa lignée quasi-isogénique résistante IsoR3.

Les résultats obtenus ont démontré la présence d'un unique site de liaison à PA1b dans les extraits membranaires de charançon sensible, et son absence chez le charançon résistant. Ils ont aussi montré que cette liaison réversible et saturable se faisait avec une très forte affinité ($K_d = 2$ nM), et que ce récepteur est fortement représenté chez l'insecte. Après incubation, la récupération d'un radioligand intact après le test de liaison montre que le récepteur à PA1b, dans les conditions expérimentales, ne dégrade pas la toxine. Ceci implique que la différence observée entre les souches

de charançons sensibles et résistantes n'est pas due à une dégradation différentielle durant l'expérience, mais bien à une modification ou une absence du site de liaison chez les insectes résistants. Ces résultats nous incitent à penser que le site de liaison est probablement impliqué dans le mécanisme d'action de PA1b. L'identification de ce récepteur est donc primordiale pour comprendre par quel mécanisme PA1b exerce son activité entomotoxique.

2.3.2.2 Purification du site de liaison à PA1b

Afin d'identifier le récepteur putatif à PA1b, de nombreux essais de purification par chromatographie ont été menés. Si la solubilisation sous forme active du récepteur à l'aide de détergents a pu être obtenue (avec la conservation de l'affinité de la protéine solubilisée pour PA1b-I¹²⁵), différentes colonnes de chromatographie dans différentes conditions ont ensuite été testées sans succès. Le problème certainement le plus important est l'instabilité du récepteur lorsqu'il n'est plus inséré dans la membrane plasmique. L'identification du récepteur par purification n'a donc pas pu aboutir, et d'autres techniques ont dû être employées. La découverte d'un site de liaison de PA1b, probablement impliqué dans son mécanisme d'action, et la mise en place d'un test de liaison par radiomarquage permettent d'envisager la réalisation de ces tests sur de nombreux organismes.

2.3.3 Spectre d'hôte

Les propriétés entomotoxiques de PA1b ont été découvertes sur les insectes du genre *Sitophilus*. Dans l'optique de son utilisation potentielle au champ, il était primordial de déterminer le spectre d'hôte de PA1b, afin de prévenir au maximum les effets non intentionnels. Cependant, la toxicité de PA1b est testée par ingestion de la toxine, et le mode de nutrition et/ou l'absence d'un milieu d'élevage artificiel ne nous permettait pas de tester la toxicité de PA1b sur un grand nombre d'organismes. L'objectif de ce travail a donc été la détermination de

l'effet biologique de PA1b sur certains organismes, et de définir en parallèle la présence ou non du site de liaison à PA1b.

Sur l'ensemble des organismes testés, le site de liaison de PA1b et/ou la toxicité de PA1b ont été retrouvés uniquement dans la classe des insectes. En effet, PA1b n'a montré aucun effet toxique sur la croissance des champignons et bactéries testés [GRESSENT '07], ni sur le nématode *Caenorhabditis elegans* [RAHIOUI. '13]. De plus, aucun site de liaison à PA1b n'a été identifié chez les arachnides, crustacés, nématodes, ou limaces testés, ni chez la souris ou dans des cellules en culture de mammifères [RAHIOUI '07, RAHIOUI. '13]. L'ensemble de ces résultats corroborent le fait que l'effet toxique de PA1b n'affecterait que les insectes.

La liaison de PA1b a été testée sur de nombreux insectes, faisant partie d'ordres très différents comme les Coléoptères, les Hyménoptères, les Lépidoptères, les Diptères, les Hémiptères, les Orthoptères, les Isoptères, les Blattoptères ou les Zygentomes. Les résultats ont permis de montrer qu'à l'exception de rares cas, tous les insectes testés ont le récepteur à PA1b, qu'importe leur éloignement phylogénique au sein de la classe des insectes.

Ces résultats ont également montré que l'absence d'un site de liaison est toujours corrélée à une absence de toxicité, mais que le contraire n'est pas vrai. En effet, la grande majorité des insectes testés ont le site de liaison à PA1b. Certains d'entre eux sont sensibles à la toxine, comme la coccinelle asiatique *Harmonia axyridis*, le puceron *Acyrtosiphon pisum*, les moustiques *Culex pipiens* ou *Aedes aegyptii* qui est le principal vecteur de la dengue et de la fièvre jaune et qui est l'insecte testé le plus sensible à PA1b.

Certains autres insectes testés sont cependant insensibles à la toxine, à la dose maximale testée de 1 mg.g⁻¹ de nourriture, comme le puceron *Myzus persicae* de l'ordre des Hémiptères, l'Hyménoptère *Trichogramma pretiosum*, le ver à soie *Bombyx mori* de l'ordre des Lépidoptères, ou le Coléoptère *Tribolium castaneum*. Dans ces ordres d'insectes, on retrouve également des espèces sensibles à PA1b, dont le puceron ravageur *Acyrtosiphon pisum* (Hémiptères), la pyrale de la farine *Ephestia khuniella* (Lépidoptère) ou *Harmonia axyridis* (Coléoptère). Ceci démontre que la sensibilité des insectes est distribuée sans lien avec la taxonomie au sein des différents ordres.

Dans la classe des insectes, l'absence de liaison de PA1b a été retrouvée uniquement chez certains membres de l'ordre des Coléoptères :

dans la souche résistante de *Sitophilus oryzae* IsoR3, chez l'espèce *Sitona lineatus*, et dans la famille des Chrysomèles (*Diabrotica virgifera*, *Chrysomela tremulae*, et le doryphore *Leptinotarsa decemlineata* et les Chrysomèles de la sous-famille des Bruchidés *Zabrotes subfasciatus*, *Callosobruchus maculatus*, *Bruchus rufimanus*, et *Bruchus pisorum*). Parmi ces insectes, les Bruchidés se nourrissent exclusivement sur graines de Légumineuses et *Sitona lineatus* se nourrit de feuilles et de racines de légumineuses. Chez ces insectes, l'aptitude à se nourrir de graines de légumineuses passe nécessairement par une modification ou une disparition du récepteur, ce qui entraîne une résistance à PA1b. On peut donc penser que PA1b est une des causes naturelles majeures de résistance aux insectes des légumineuses.

Les tests de toxicité réalisés sur l'insecte entier *Spodoptera frugiperda* montrent la présence d'un site de liaison à PA1b mais une insensibilité à la toxine. En revanche lorsque les tests sont réalisés sur une lignée cellulaire de ce même insecte (cellules Sf9) le site de liaison est conservé, et les cellules sont sensibles à PA1b. Chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*), les tests de liaison montrent l'existence du récepteur à PA1b, mais les résultats des tests de toxicité diffèrent selon le mode d'élevage de l'insecte. Lorsque la mouche est élevée sur milieu synthétique, elle est résistante à PA1b, alors qu'elle est sensible à PA1b lorsqu'elle est élevée sur un milieu à base de pulpe de fruits. Chez *S. frugiperda*, et *D. melanogaster*, et probablement chez les autres insectes résistants à PA1b, mais possédant le récepteur, celui-ci est présent et donc capable de lier la toxine, il posséderait le mécanisme nécessaire à l'action toxique de PA1b, mais l'action de PA1b serait empêchée par un mécanisme d'insensibilité indépendant du récepteur, encore inconnu.

L'identification du récepteur de PA1b permettrait dans un premier temps de comprendre les mécanismes de résistance, et pourquoi pas dans un second temps l'amélioration de PA1b visant à augmenter sa toxicité et élargir son spectre d'action à des ravageurs importants tels que les Chrysomèles.

2.4 Identification du récepteur à PA1b

2.4.1 Effets de PA1b sur les cellules d'insectes

Des tests de toxicité ont été réalisés sur des cellules d'insecte : les cellules Sf9, issues d'une lignée cellulaire de tissu ovarien de *S. frugiperda* (Lépidoptères). Ils ont montré une toxicité de PA1b à des doses inférieures à celles nécessaires pour tuer les insectes, ce qui a permis de mettre en place un test de toxicité à PA1b nécessitant de moins grande quantité de toxine et deux jours (14 jours sont nécessaires pour réaliser des tests de toxicité sur charançons).

Les cellules Sf9 possèdent un site de liaison à PA1b. Des tests ont montrés que PA1b était internalisé dans ces cellules *via* son récepteur, mais que lorsque l'on se place dans des conditions expérimentales inhibant l'internalisation de la toxine, son effet sur les cellules Sf9 était maintenu. L'internalisation de la toxine, tout comme sa toxicité, passent par la liaison au récepteur, mais la toxicité n'est pas dépendante de l'internalisation de PA1b. L'internalisation de PA1b serait alors un mécanisme de détoxification de la cellule, le rendant inoffensif puisque son action toxique s'effectue uniquement au niveau extracellulaire [RAHIOU '07].

La découverte d'une lignée cellulaire sensible d'insecte, sur laquelle les tests de liaison et de toxicité de PA1b sont facilement réalisables a permis à l'équipe « Entomotoxine » d'envisager de nouvelles méthodes d'identification du récepteur à PA1b.

2.4.2 Identification du récepteur à PA1b

La détermination de la structure tridimensionnelle de PA1b a permis de mettre en évidence son appartenance à la famille des knottines. Sa ressemblance structurale avec une toxine d'araignée connue pour son

action sur des canaux ioniques nous incite à penser que PA1b pourrait avoir une action similaire.

Des analyses électrophysiologiques ont été réalisées par Christophe Chouabe (UCBL1) afin de déterminer si PA1b a réellement une activité sur des canaux ioniques. Les expérimentations ont été réalisées sur des cellules d'insecte Sf9 sensibles à PA1b. Dans un premier temps elles ont permis de montrer, par des études de patch clamp, que la présence de PA1b dans le milieu extracellulaire entraîne la dépolarisation de la membrane (figure 9). L'absence de dépolarisation en présence d'un mutant inactif de PA1b nous informe que c'est la liaison de la toxine sur son récepteur qui est responsable de cette dépolarisation.

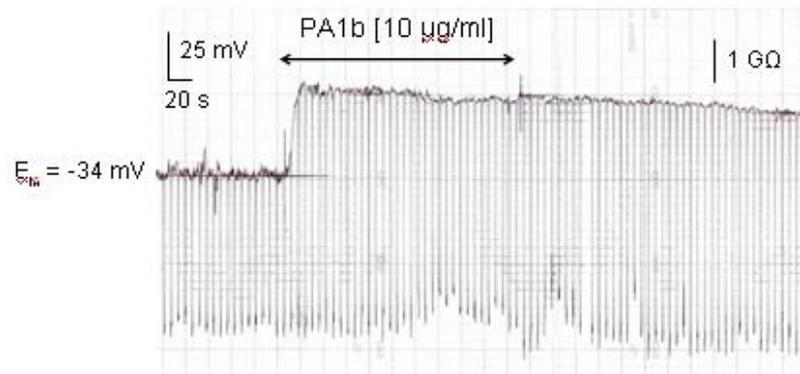


Figure 9 : Effet de PA1b sur le potentiel de membrane des cellules Sf9. Les cellules sont enregistrées en patch-clamp, en configuration cellule entière. L'ajout de PA1b dans le milieu extracellulaire induit une dépolarisation de la membrane

Dans un second temps, il a été montré que les variations de la concentration intra- ou extra-cellulaire des ions Cl^- , K^+ , ou Na^+ n'affectent pas la réponse de la cellule à PA1b. En revanche les variations de pH modifient la réponse à PA1b. De plus, parmi les différents inhibiteurs de canaux ioniques testés, seule la bafilomycine a montré un effet similaire à PA1b sur les cellules Sf9. La bafilomycine est une toxine fongique connue pour son activité inhibitrice d'une pompe à protons membranaire nommée la V-ATPase (Vacuolar ATPase).

Afin de déterminer si PA1b est capable d'inhiber ce complexe protéique, nous avons établi une collaboration avec une équipe allemande, spécialisée dans le fonctionnement de la V-ATPase du lépidoptère *Manduca sexta*, couramment utilisé comme modèle en biologie des insectes. Les V-ATPase issues des intestins du sphinx du tabac ont été purifiées et leur activité ATPasique a été mesurée en présence de PA1b. Ces tests ont montré que l'activité des V-ATPases est très sensible à la toxine, dans des gammes de concentrations similaires à celles constatées pour la bafilomycine. En revanche, le mutant inactif de la toxine n'affecte en rien le fonctionnement de cette pompe à protons.

La V-ATPase est une protéine de plus de 1 MDa, composée de 14 sous-unités distinctes organisées en deux complexes : le complexe V1 est cytoplasmique, tandis que le complexe Vo est membranaire. Lorsque les tests d'activité ATPasique sont réalisés uniquement sur le complexe V1 de la V-ATPase PA1b n'a plus d'effet, ce qui nous incite à penser que le site de liaison de la toxine est le complexe Vo de la V-ATPase [CHOUABE '11].

PA1b est donc un inhibiteur de pompes à protons, dont la liaison se ferait sur le complexe Vo de la V-ATPase.

2.5 Etude structure/fonction de PA1b

Dans le projet PA1b, l'équipe « Entomotoxine » ne s'applique pas uniquement à identifier le récepteur de la toxine. Une autre partie du travail s'intéresse à la relation structure fonction de ce peptide. L'objectif est d'identifier au sein de la séquence protéique quels sont les acides aminés impliqués directement dans la toxicité de ce peptide. Une des solutions pour répondre à cette interrogation est la synthèse d'isoformes de PA1b, d'origine naturelle ou artificielle.

2.5.1 Synthèse d'une collection de mutants PA1b

La synthèse chimique de PA1b a été réalisée au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) d'Orléans, et a permis d'obtenir un peptide

linéaire réduit. Le repliement *in vitro* de PA1b est réalisé par l'équipe « Entomotoxine ». En raison de la structure particulière de PA1b, son repliement a nécessité de nombreuses mises au point pour finalement obtenir un rendement d'environ 50%. L'analyse RMN des peptides obtenus a montré l'efficacité de ce système pour la production de peptides correctement formés. Les tests de toxicité sur charançons et sur cellules Sf9 ont montré que cette protéine synthétique a la même activité biologique que la protéine naturelle extraite de pois [DA SILVA '09]. Une collection de mutants de PA1b a donc été réalisée par synthèse chimique.

La synthèse chimique étant cependant complexe et coûteuse, il n'est pas possible de réaliser une mutation des 37 acides aminés. Différents critères sont entrés en compte dans le choix des mutations. L'activité de PA1b dépend de sa structure, donc les acides aminés impliqués directement dans le maintien de la structure (les prolines et les cystéines) n'ont pas été mutés. La très forte conservation de la boucle « CSPFE », et du caractère hydrophobe de la seconde boucle, montre l'importance des résidus qui les composent et leur implication possible dans la toxicité de PA1b. Ces deux boucles du peptide et leurs acides aminés adjacents ont donc été choisis pour être mutés, ainsi que les acides aminés chargés. Au total 13 mutants où une alanine remplace l'acide aminé ciblé ont été réalisés.

Les analyses par spectrométrie de masse et RMN ont validé la présence des trois ponts disulfure des différents mutants et la conservation d'une structure 3D similaire à celle de PA1b natif. La toxicité de chaque mutant a ensuite été testée sur cellules Sf9 et sur charançons. L'absence de liaison du peptide entraîne l'absence de toxicité et vice versa. Les résultats de ces tests (figure 10) ont aussi montré que la mutation des valines 6 et 25, de l'acide glutamique 11, de la méthionine 12, de la tyrosine 31 et de l'arginine 33 n'ont que très peu d'effet sur la toxicité de PA1b et ne jouent pas un rôle majeur dans la liaison au récepteur. Les mutations de la sérine 8, la valine 28 et l'isoleucine 29 affectent légèrement la toxicité de PA1b. En revanche les mutations de la phénylalanine 10, de l'arginine 21, de l'isoleucine 23 et de la leucine 27 entraînent l'absence de toxicité de la protéine, même à des concentrations dix fois plus élevées que celles utilisées avec le PA1b natif. Ces résultats montrent l'importance d'un pôle hydrophobe, constitué en grande partie des acides aminés de la boucle hydrophobe conservée, mais également de la Phe10, qui se trouve en terme

de séquence primaire dans la boucle « CSPFE », mais qui se retrouve dans ce pôle hydrophobe à la suite du repliement tridimensionnel de PA1b. On constate aussi l'importance de l'arginine 21 pour l'interaction de PA1b avec son récepteur, et donc pour la conservation de sa toxicité [DA SILVA '10].

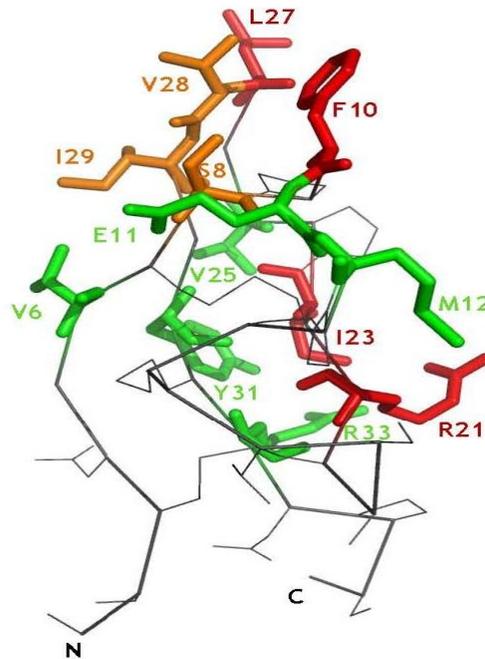


Figure 10 : Représentation tridimensionnelle de PA1b. Les acides aminés non mutés sont représentés en noir. Les acides aminés représentés en vert sont ceux dont le remplacement par une alanine n'affecte pas la toxicité de PA1b. Les acides aminés dont la mutation entraîne une forte diminution, ou une absence totale de toxicité sont représentés respectivement en orange et en rouge.

2.6 Conclusion

A l'heure où l'utilisation de produits chimiques doit diminuer de manière drastique, la découverte d'une molécule végétale aux propriétés entomotoxiques est d'une grande importance. PA1b a pour cible, entre autres, deux insectes dont l'impact économique et sur la santé humaine doit être absolument maîtrisé. Le charançon est responsable d'environ 25%

des pertes de récolte au niveau mondial, et le moustique *Aedes aegyptii* est le principal vecteur de la dengue et de la fièvre jaune.

Ces quinze dernières années l'équipe « Entomotoxine » du laboratoire BF2I a fait de grandes avancées dans la connaissance de PA1b et de son mécanisme d'action. La détermination de la structure tridimensionnelle de PA1b a montré son appartenance à la famille des knottines et a permis de donner une explication aux propriétés de résistance exceptionnelles de cette protéine. Un des points essentiels du projet PA1b est la compréhension du mécanisme d'action qui conduit à la mort de l'insecte. La réalisation d'une collection de mutant PA1b a permis de mettre en évidence les acides aminés directement impliqués dans la liaison toxine-récepteur. Le complexe protéique récepteur de PA1b a été identifié, et c'est une pompe à protons nommée V-ATPase. Parmi les quatre sous-unités du complexe membranaire V_o de la V-ATPase il est maintenant essentiel d'identifier celle(s) réceptrice(s) de PA1b.

3 Les V-ATPases

3.1 Introduction

Les cellules ont un métabolisme complexe et leur survie nécessite une adaptation continue à leur environnement. Pour cela elles doivent réaliser en permanence des échanges ioniques avec leur milieu, afin de maintenir leur homéostasie. L'essentiel de ces échanges ioniques repose sur le fonctionnement de pompes établissant des gradients de concentration ionique. Parmi ces pompes, nous nous intéressons à la superfamille des pompes à protons qui est la première impliquée dans les échanges ioniques. On la retrouve aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Elle se décompose en trois catégories : les ATPases de type A, F, et V, que l'on peut aussi diviser selon leur mode de fonctionnement en deux sous familles : les ATP synthases (les F et certaines A) et les ATP hydrolases. Les ATP synthases produisent de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique, alors que les ATP hydrolases hydrolysent l'ATP et utilisent l'énergie libérée pour transporter des ions contre leur gradient de concentration. Les ATPases de type A sont présentes uniquement chez les archaebactéries. Celles de type F sont retrouvées dans les mitochondries et les chloroplastes des eucaryotes mais également chez les bactéries, elles sont très proches structurellement des V-ATPases qui ont été identifiées dans les vacuoles, mais sont aussi trouvées dans les membranes plasmiques des eucaryotes et des bactéries [NELSON '89, WIECZOREK '99, WILKENS '05].

La V-ATPase, ou vacuolar (H⁺)-ATPase, est une pompe à protons ATP dépendante, présente chez les eucaryotes et extrêmement conservée. Il y a plus de 80% d'identité entre les séquences des différentes sous-unités humaines et celles de levure [NELSON '99]. La fonction principale est l'acidification de compartiments intracellulaires tels que les endosomes et les lysosomes, et le transport de protons à travers la membrane plasmique. Chez l'insecte elle contient environ 30 sous-unités de 14 types différents, divisées en deux complexes V1 et Vo. C'est le couplage entre

les complexes V1 et Vo remplissant chacun une fonction (ATPase pour V1 et translocation de protons pour Vo) qui permet l'activité de la pompe.

3.2 Les V-ATPases d'insectes

Les V-ATPases de charançons n'ont encore jamais été décrites dans la littérature, mais elles ont très bien été détaillées chez l'insecte modèle *Manduca sexta*, couramment nommé sphinx du tabac. Dans l'intestin de *M. sexta*, la V-ATPase est l'unique mécanisme énergisant de l'épithélium. Elles se situent au niveau de la membrane apicale des cellules caliciformes de l'intestin et elles sont responsables de l'acidification de la lumière du tube digestif en y faisant entrer des ions H⁺. Cette entrée de protons crée un déséquilibre ionique ce qui entraîne le passage actif d'autres ions à travers la membrane épithéliale, et le passage des nutriments. De ce fait elle est responsable du transport des nutriments produits lors de la digestion [WIECZOREK '03, WIECZOREK '09].

3.2.1 Le complexe V1

Le complexe V1 est composé de huit sous-unités nommées de A à H dans une stœchiométrie probable de A₃, B₃, C, D, E₃, F, G₃, H [KITAGAWA '08]. C'est au sein de ce complexe que se situe l'activité ATPasique [WIECZOREK '03]. Les sous-unités A (68 kDa) et B (55 kDa) forment des hétérodimères, portant chacun une unité d'hydrolyse de l'ATP. Les sous-unités C (45 kDa), D (28 kDa), E (26 kDa), F (14 kDa), G (14 kDa) et H (55 kDa) sont toutes impliquées dans le maintien de V1 sur le complexe membranaire Vo [MERZENDORFER '00].

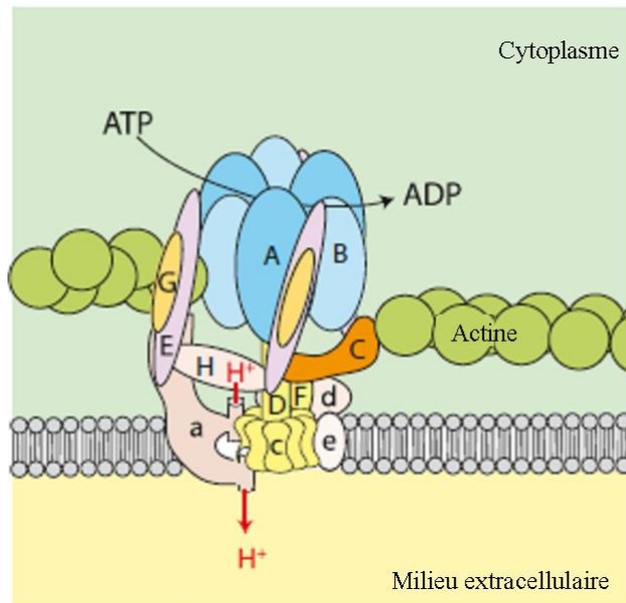


Figure 11 : Représentation schématique de la V-ATPase [WIECZOREK '09]. Le complexe V1 composé de huit sous-unités (lettres majuscules) est cytoplasmique et c'est à son niveau que s'effectue l'activité ATPasique. Le complexe Vo est composé de quatre sous-unités différentes (lettres minuscules) et est inséré dans la membrane. Dans la cellule, le complexe est relié au cytosquelette par les filaments d'actine.

3.2.2 Le complexe Vo

Le complexe membranaire Vo est plus petit que V1 et est composé des sous-unités a (96 kDa), c (16 kDa), d (40 kDa) et e (10 kDa) [MERZENDORFER '00]. L'activité translocation de protons est portée par l'interface entre la sous-unité a et l'anneau formé par les sous-unités c. La sous-unité a est retrouvée chez la plupart des organismes testés sous plusieurs isoformes, qui sont le plus souvent spécifiques de la localisation de la V-ATPase [TOYOMURA '03]. Le nombre de sous-unités c disposées en anneau reste incertain (6,8 ou 10). Chez *M. sexta*, l'existence de six sous-unités c formant un hexamère a été publiée, mais des études en cours tendent à montrer l'existence de dix sous-unités. Une seule isoforme c a été retrouvée chez *M. sexta*, mais trois isoformes ont été retrouvées chez la levure (c, c', et c''), quatre chez le nématode, et deux chez la souris (c et c'') [GRAHAM '03, KNIGHT '12]. La sous-unité a est une grosse sous-unité qui est fixée sur le complexe V1 au niveau de H, E et G [MUENCH

'09]. Il n'existe qu'une seule isoforme de la sous-unité e connue. Les analyses microscopiques montrent une autre sous-unité collée aux sous-unités a, c et d du complexe Vo. Cette sous-unité a été identifiée chez le bœuf comme la protéine Ac45, mais n'est pas présente chez la levure [WILKENS '99]. Cette protéine de 27 à 29 kDa très glycosylée a déjà été identifiée chez la drosophile, mais pas encore chez le sphinx du tabac. Son rôle dans l'activité de la V-ATPase de l'insecte reste à l'heure actuelle encore inconnu, mais elle a un rôle de régulation de la V-ATPase dans le système sécrétoire chez les mammifères [JANSEN '12].

3.3 Fonctionnement et régulation des V-ATPases

Les ATPases sont des moteurs rotatifs, fonctionnant à des vitesses supérieures à 100 tours par minute, produisant à l'échelle moléculaire une force énorme. Le processus de transformation de l'énergie est proche des 100% d'efficacité [MUENCH '11].

Le mode de fonctionnement précis de la V-ATPase est encore inconnu. En revanche un modèle générique de fonctionnement des ATPase a été réalisé (Figure 12). Pour leur fonctionnement, on peut diviser les ATPases en deux parties, le rotor (composé des sous-unités D, F, c, d, et probablement e) et le stator (A, B, C, E, G et a). Au sein de la sous-unité a, deux demi-canaux jouent les rôles de portail d'entrée puis de sortie du proton dans l'ATPase. Dans le modèle A-ATPase et F-ATPase, une fois entré par le canal de la sous-unité a, le proton neutralise la charge négative portée par la chaîne latérale d'un glutamate de la sous-unité c, ce qui permet la rotation de l'anneau de c. Après rotation avec l'anneau de c, le proton est relargué de l'autre côté de la membrane par le biais du demi-canal de sortie de la sous-unité a. La tige centrale (sous-unité D et F chez la V-ATPase) assure la rotation en parallèle de la partie catalytique de la pompe qui est initiée par une différence de potentiel de membrane qui entraîne un proton vers la sous-unité a. Chez la V-ATPase, le rôle des deux parties est inversé. La rotation est probablement initiée par l'énergie fournie par la dégradation de l'ATP au niveau des complexes AB, et entraîne la rotation de l'anneau de c et ainsi le passage de protons à travers la membrane [MUENCH '11].

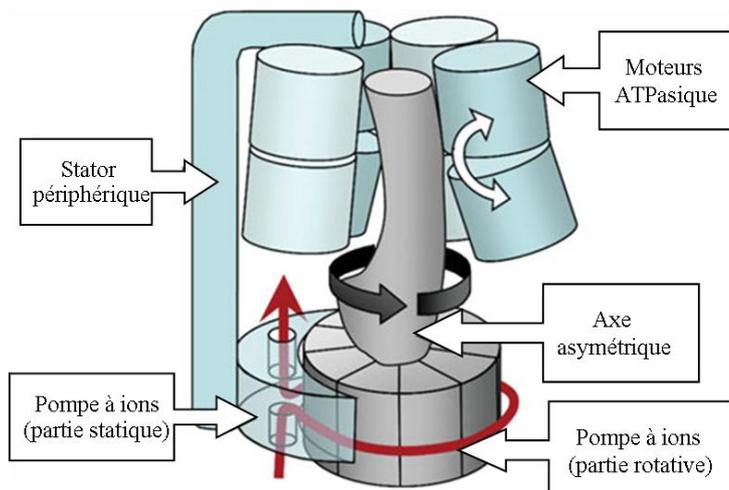


Figure 12 : Modèle générique de la rotation des ATPases. Les trois sites catalytiques de l'ATP (AB) sont reliés par un axe à la partie pompe ionique logé à l'intérieur du domaine membranaire. La pompe à ions comporte deux parties : un anneau rotatif de sous-unités c, dont chacune peut porter un proton, et une sous-unité statique (a). Dans le mode de l'ATP synthase (comme dans les F-et A-ATPases), le potentiel de la membrane entraîne un proton sur une des sous-unités de l'anneau de c du rotor par l'intermédiaire de l'entrée demi-canal de la sous-unité a. La protonation permet la rotation (sens indiqué par la flèche grise). De manière synchrone, un proton est relâché par le demi-canal « sortie ». La flèche rouge montre la trajectoire des protons. En mode pompe à ions (comme dans la V-ATPase), des changements conformationnels des trois moteurs ATPases, résultant du renouvellement de l'ATP, entraîne une rotation inverse de la pompe, et un mouvement des protons dans le sens opposé.

La régulation de la pompe V-ATPase passe par la réversibilité de l'assemblage du complexe V1. Ce mécanisme de régulation a été mis en évidence lors de la mue de l'insecte. Pendant cette période, l'insecte ne s'alimente pas, et afin d'économiser l'énergie dépensée par le fonctionnement de la pompe, la cellule diminue au maximum son activité [MERZENDORFER '00]. C'est la présence de la sous-unité C qui maintient les complexes V1 et V_o assemblés, donc la pompe en position « on ». Le détachement de C en réponse à des signaux physiologiques entraîne le désassemblage de V1, et la mise en position « off » de la pompe [STEWART '12]. L'assemblage / désassemblage de la V-ATPase dépend de la quantité d'ATP/ADP présente dans la cellule [HUSS '07] et est régulé par des facteurs tels que des signaux développementaux, ou des stress nutritifs. Par

exemple, chez la levure, une diminution de la concentration en glucose entraîne le désassemblage de la pompe [LU '07]. Ce mécanisme de désassemblage / réassemblage de la V-ATPase a été trouvé chez les insectes, les levures, et également chez les mammifères [SAUTIN '05].

3.4 Altération du fonctionnement des V-ATPases

Les V-ATPases sont connues pour leur rôle dans la régulation du pH des compartiments intracellulaire, de l'espace extracellulaire, et du cytoplasme. Les V-ATPase présentes dans le compartiment intracellulaire sont importantes pour les processus cellulaires comme l'endocytose médiée par les récepteurs, le trafic intracellulaire, la maturation et la dégradation des protéines, et le transport de petites molécules et d'ions. Les V-ATPases présentes sur la membrane plasmique sont également importantes pour le fonctionnement normal des cellules. La V-ATPase est également impliquée dans la résorption osseuse chez les ostéoclastes, la sécrétion acide des cellules intercalaires du rein, le maintien du pH chez les macrophages et les neutrophiles, l'angiogenèse par les cellules endothéliales, et la maturation et le stockage du sperme [HINTON '09].

L'altération du fonctionnement des V-ATPases chez l'humain est très étudiée car elle engendre des maladies graves et parfois mortelles. Une mutation du gène codant la sous-unité B1, ou la sous-unité a4, entraîne une acidose tubulaire rénale qui s'accompagne parfois d'une surdité neurosensorielle [KARET '99]. Une mutation du gène codant la sous-unité a3 est responsable d'une pathologie nommée ostéopétrose (ou maladie des os de marbre), caractérisée par l'épaississement des os et la présence de défauts dans le squelette [FRATTINI '00, TOEI '10]. L'ostéoporose, à l'inverse de l'ostéopétrose, est une maladie caractérisée par une perte osseuse, également due à une mutation de la sous-unité a3 [HINTON '09]. Il existe également des maladies non génétiques liées aux V-ATPases. Des études ont montré que dans le cancer du sein les cellules tumorales expriment un très haut niveau de V-ATPase à leur surface contrairement aux cellules saines [SENNOUNE '04]. Les V-ATPases contribueraient à l'alcalinisation des cellules tumorales et à l'acidification du milieu extracellulaire, ce qui faciliterait la progression de la tumeur. Il est également

probable que les V-ATPases jouent un rôle dans l'infection des cellules par le virus de l'immunodéficience humaine. En effet la sous-unité H de V1 est capable de lier une protéine du VIH ce qui faciliterait son entrée dans la cellule [LU '98].

Étant donné leur implication dans de nombreuses maladies humaines, les V-ATPases sont une cible attractive pour le traitement de ces maladies. Pour ces raisons, la recherche sur les inhibiteurs de V-ATPases est un domaine de plus en plus exploré.

3.5 Inhibiteurs de V-ATPases

La bafilomycine A1 est un composé produit par la bactérie *Streptomyces griseus*. Connue pour ses propriétés antibiotiques, elle est le premier inhibiteur spécifique de la V-ATPase [BOWMAN '88]. Elle fait partie de la classe des plécomacrolides dont fait également partie la concanamycine, qui est le second inhibiteur de V-ATPases le plus connu. Ces deux molécules ciblent toutes les deux la sous-unité c du complexe V_o (figure 15) [BOWMAN '04], au niveau des hélices 1, 2 et 4 de cette sous-unité [BOWMAN '06], et agissent avec une IC_{50} de l'ordre du nanomolaire. Des essais réalisés sur une série de mutants de levure ont montré que la sous-unité a était également impliquée dans la liaison de la bafilomycine [WANG '05].

Ces dernières années, d'autres molécules ont été identifiées comme inhibitrices de V-ATPase. L'archazolide est produite par les bactéries *Archangium gephyra* et *Cystobacter violaceus*, et agit avec une IC_{50} de l'ordre du nanomolaire. Par compétition avec la concanamycine, il a été montré qu'elle cible également la sous-unité c de la V-ATPase, mais des études plus approfondies ont montré que son site de liaison n'a pas exactement la même localisation (figure 13) [BOCKELMANN '10], et il est même probable qu'elle se fasse également sur la sous-unité e [OSTERESCH '12].

A la fin des années 90, un nouveau groupe d'inhibiteur est apparu. Ils ont une structure dont la base est un noyau benzolactone énamide. Ils sont extraits de micro-organismes marins comme *Haliclona*, ou *Aplidium lobatum*, mais aussi des bactéries *Pseudomonas* et *Chondromyces* et

sont nommés salicylihamide, lobatamine, apicularen ou oximidine. Ils agissent tous également avec une IC_{50} de l'ordre du nanomolaire [HUSS '05]. Contrairement aux autres inhibiteurs qui agissent sur toutes les V-ATPases, ceux issus de la famille des benzolactones sont inactifs contre les V-ATPases de levure. La salicylhalamide a des propriétés inhibitrices uniquement sur les V-ATPases de mammifère [XIE '04]. Il a été montré qu'aucun de ces composés n'agissaient en compétition avec les plécomacrolides, ils ont donc un site d'action différent [HUSS '05]. Des études récentes réalisées sur l'apicularen ont montré que le site de liaison de ces molécules se situait entre les sous-unités c et a de V-ATPase (figure 15) [OSTERESCH '12].

Ces dernières années ont vu naître des inhibiteurs synthétiques, dérivés de la bafilomycine A1, nommés les indolyls. Ces composés synthétiques ont l'avantage de pouvoir être marqués et ainsi faciliter les études de liaison avec le récepteur [GAGLIARDI '98, HUSS '09, HUSS '09].

Il existe d'autres inhibiteurs naturels de la V-ATPase, tels que la destruxine issue du champignon *Metarhizium* [MUROI '94], ou la chondropsine qui est purifiée d'éponge marine [BOWMAN '03]. Leur action à des concentrations beaucoup plus fortes (IC_{50} de l'ordre du micromolaire) ne font pas d'elles des molécules de choix pour les études de la V-ATPase, ou pour la création de nouveaux médicaments contre le cancer ou l'ostéoporose [HUSS '05].

A cette liste de molécules inhibitrices de la V-ATPase, on peut ajouter notre protéine PA1b qui est le premier peptide présentant une activité anti-V-ATPase. De plus PA1b est aussi le seul inhibiteur spécifique des insectes [CHOUABE '11].

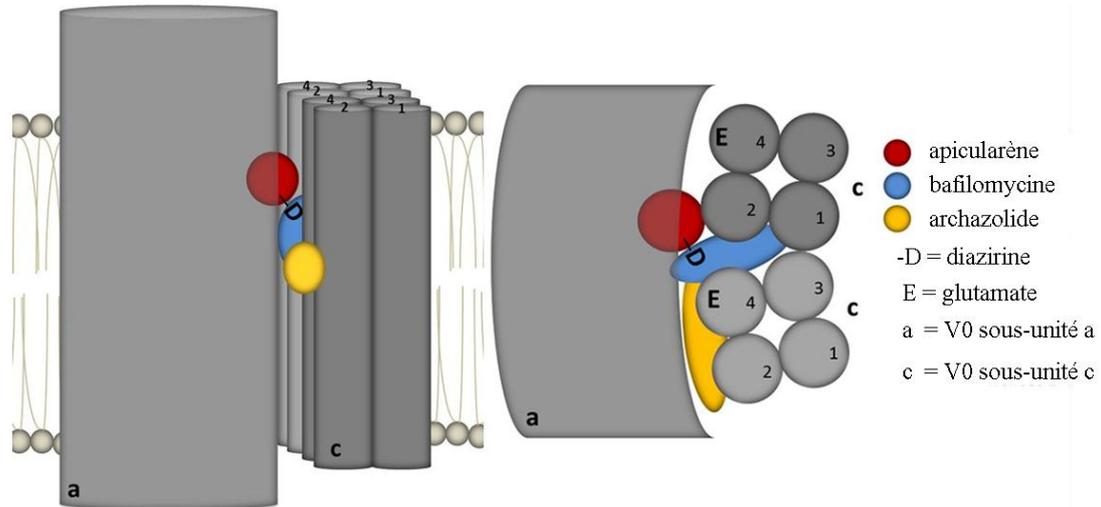


Figure 13 : Modèle de l'agencement des sites de liaison des inhibiteurs de V-ATPase sur le complexe V₀. Schéma de gauche, vue de côté du complexe V₀, et schéma de droite, vue de dessus. Pour plus de simplicité, la partie N-terminale de la sous-unité a est dessinée comme un seul domaine, et seulement deux sous-unités c de l'anneau rotatif sont représentés. Les quatre hélices transmembranaires des sous-unités c sont numérotées (1-4). Les emplacements proposés sur les sites de liaison de l'apicularène, la bafilomycine et l'archazolide sont colorés en rouge, bleu et jaune, respectivement[OSTERESCH '12].

4 Objectifs de ce travail

Actuellement, pour des raisons économiques, les cultures et les denrées stockées sont protégées contre les insectes par l'utilisation de pesticides chimiques. Malheureusement ces pesticides se retrouvent dans les produits couramment consommés, ainsi que dans l'environnement, ce qui crée de véritables problèmes sanitaires et écologiques.

L'objectif de l'équipe «Entomotoxine» est d'identifier et de comprendre le mode de fonctionnement de pesticides d'origine végétale. Des études antérieures ont permis de mettre en évidence le peptide PA1b (Pea Albumin 1 sous-unité b). Ce pesticide naturellement présent dans le pois, est toxique vis-à-vis de ravageurs comme le charançon des céréales, ou le puceron du pois.

Les recherches menées ont montré que la toxicité de ce peptide est due à sa capacité à se fixer sur une protéine de l'intestin de l'insecte. En collaboration avec différents laboratoires (lyonnais et allemand) il a été mis en évidence que le récepteur à PA1b chez l'insecte est une pompe à protons nommée V-ATPase, impliquée dans le mécanisme d'absorption des nutriments. Le premier objectif de ma thèse est l'identification de la ou des sous-unités réceptrices de PA1b. Les recherches seront menées sur les quatre sous-unités du complexe V_o de la V-ATPase ciblées par les précédents résultats de l'équipe [CHOUABE '11], ainsi que sur sa protéine collaboratrice Ac45. Dans un premier temps l'ADNc codant ces différentes sous-unités sera cloné chez le charançon sensible, et sur sa lignée quasi-isogénique résistante, dans l'objectif d'identifier des différences capables d'expliquer l'absence de liaison de PA1b chez les insectes résistants. La complémentation fonctionnelle de souches de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes pour les sous-unités du complexe V_o permettra, par des études de liaison à PA1b radiomarqué et/ou par des tests de toxicité sur les levures exprimant les sous-unités de charançon de déterminer quelle sous-unité perçoit le signal PA1b. Ce travail d'identification du récepteur à PA1b est entrepris en parallèle par des techniques de biochimie

et de microscopie en collaboration avec des équipes allemande et anglaise. L'ensemble des résultats attendus ont pour objectif l'identification du mécanisme d'action de PA1b et la compréhension du phénomène de résistance.

La liaison de PA1b sur son récepteur n'est que la première étape pour expliquer les raisons de sa toxicité envers les insectes. Par observation microscopique il a été montré que PA1b induit des figures d'apoptose sur les cellules Sf9 [RAHIOUI '07]. La seconde partie de mon travail a donc consisté à vérifier l'hypothèse selon laquelle l'ingestion de PA1b induit l'apoptose dans les cellules d'intestin des insectes sensibles. Dans un premier temps, nous montrerons par des méthodes de biochimie la présence d'une activité de la caspase 3, une enzyme dont la forme active est un marqueur de l'apoptose dans les intestins d'insectes sensibles intoxiqués par PA1b. Dans un second temps, par des méthodes d'immunohistologie nous localiserons dans ces mêmes intestins, l'activité de la caspase 3, afin de relier sa présence à celle de PA1b et de son récepteur.

L'utilisation de PA1b à l'échelle industrielle nécessite l'augmentation de la toxicité de ce peptide. Dans cette optique, le laboratoire recherche et analyse des variants naturels ou chimiques de PA1b. Il existe à l'état naturel six isoformes de PA1b chez le pois, et de nombreuses autres chez les Légumineuses, mises en évidence par bioinformatique. Afin de tester l'activité toxique de ces différents variants, il est nécessaire de pouvoir les produire de manière isolée. Le troisième objectif de ma thèse était donc la mise en place d'un système de production de PA1b relativement simple, mais suffisamment performant pour obtenir les quantités de peptide nécessaires pour réaliser les tests de toxicité. Pour cela j'ai choisi la production hétérologue transitoire par infiltration dans le tabac *Nicotiana benthamiana*.

La production de nombreux isoformes devrait nous permettre dans un premier temps d'améliorer les connaissances structure/fonction apportées par la réalisation de la collection de mutants alanine, et ainsi faciliter la découverte d'un variant beaucoup plus actif que le peptide naturel de pois.

L'ensemble de ces travaux permettra à l'équipe « Entomotoxine » d'améliorer ses connaissances sur PA1b, mais également sur son récepteur. La compréhension précise des interactions entre ces deux molé-

cules pourrait conduire à la modélisation de cette liaison, ce qui serait une avancée importante pour l'utilisation de PA1b dans la lutte contre les insectes, mais qui pourrait également conduire à l'utilisation de PA1b dans le domaine médical.

Partie 2

Matériels et méthodes

1 Matériel biologique

1.1 Insectes

1.1.1 Élevage de *Sitophilus oryzae*

Les charançons du riz, *S. oryzae*, sont élevés en incubateur à 27.5°C et à un taux d'humidité de 70%. Les souches sensibles (WAA42) sont nourries exclusivement sur grains de blé, alors que les souches résistantes (IsoR3) sont élevées sur graines de pois afin de maintenir la résistance à PA1b. Les tests de toxicité sont réalisés sur un lot de 30 insectes adultes, âgés de 7 à 21 jours après émergence de la graine. Les insectes sont alimentés par un milieu artificiel sous forme de boulette qui est composé d'un mélange farine de blé/eau (250 mg/167 µl) et de la toxine à tester. Le milieu témoin positif de toxicité est composé de 50 mg de farine de pois (*Pisum sativum*) et de 200 mg de farine de blé. Le nombre d'insectes morts est dénombré quotidiennement sur une période de 15 jours.

1.1.2 Élevage de *Tribolium castaneum*

T. castaneum, le coléoptère rouge de la farine, est élevé dans les mêmes conditions que *S. oryzae*. Ils sont nourris par un mélange de 95% de farine de blé et de 5% d'extrait de levure. Pour les tests de toxicité, 30 insectes adultes (âgés entre 2 et 4 semaines après émergence), sont nourris sur le milieu artificiel auquel est ajouté la toxine à tester, et la mortalité est relevée quotidiennement.

1.2 Matériel végétal

1.2.1 *Nicotiana sp.*

Pour les cinq espèces de *Nicotiana* utilisées (*N. benthamiana*, *N. glauca*, *N. rustica*, *N. suaveolence*, et *N. tabacum*), les graines nous ont été données gracieusement par le jardin botanique du Parc de la Tête d'Or de la ville de Lyon. Elles sont cultivées en serre avec une photopériode de 16 h, et une température de 24°C jour et 21°C nuit. Les jeunes plants de tabac sont utilisés pour l'expression transitoire entre huit et dix semaines après semis.

1.3 Souches bactériennes et milieux de cultures

1.3.1 *Escherichia coli*

Les souches bactériennes DH5 α et TOP10 (Subcloning efficienty competent cells, Invitrogen, St Aubin, France) sont utilisées pour les clonages plasmidiques, pour l'amplification et le stockage des plasmides. Elles sont présentées dans le tableau n°1. Ces bactéries sont cultivées à 37°C, (agitation 220 rpm pour les cultures liquides) en milieu LB (Luria-Bertani: bacto peptone 10 g.L⁻¹, yeast extract 5 g.L⁻¹ et NaCl 5 g.L⁻¹) additionné ou non d'agar (15 g.L⁻¹). Les antibiotiques sont utilisés aux concentrations finales de 100 mg.L⁻¹ d'ampiciline, de 50 mg.L⁻¹ de kanamycine, 20 mg.L⁻¹ de gentamycine, et 50 mg.L⁻¹ de rifampicine en fonction des résistances des différentes souches cultivées.

1.3.2 *Agrobacterium tumefaciens*

La souche C58pMP90 [KONCZ '86] permet de transformer efficacement les cellules végétales de *N. benthamiana*. Elle est utilisée pour l'étape d'agro-infiltration dans l'expression transitoire de protéines. La souche p19 [VOINNET '03] est la même bactérie déjà transformée par le

vecteur pBIN61-p19. Ce vecteur permet l'expression d'une protéine virale (p19) connue pour être un suppresseur de silencing.

Bactéries	Souche	Génotype	Résistance aux antibiotiques
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ	aucune
<i>Escherichia coli</i>	TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK</i>	streptomycine
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58	pMP90 (Koncz et Schell, 1986)	rifampicine, gentamicine

Tableau n°1. Souches bactériennes utilisées lors des travaux décrits dans ce mémoire.

1.4 Souches de levure

Saccharomyces cerevisiae est une espèce de levure fréquemment utilisée en tant que modèle eucaryote. Son génome est entièrement séquencé. Il existe des souches de levures mutées pour de très nombreux gènes, qu'il est possible de se procurer *via* le site Euroscarf (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>). Pour ce travail, nous avons utilisé différentes souches (tableau n°2) dont les gènes codant pour les protéines des sous-unités c, d et e du complexe Vo de V-ATPase sont éteints, nommés respectivement *VMA3*, *VMA6* et *VMA9* chez la levure. Ce sont des souches haploïdes dont le cadre de lecture du gène muté est remplacé par un gène qui confère à la souche mutée une résistance à la kanamycine. Bien que viable, la perte d'un gène important pour leur fonctionnement physiologique entraîne l'apparition de phénotypes altérés sous certaines conditions. Les caractères phénotypiques altérés utilisés dans ce travail sont présentés dans le tableau n°2. L'intégralité des phénotypes mutants sont présentés sur le site *Saccharomices* Genome Database (<http://www.yeastgenome.org>). Ces souches sont aussi déficientes pour

leur capacité à synthétiser l'histidine, la leucine, la méthionine et l'uracile. Elles sont cultivées à 27°C sur un milieu de culture sélectif (YNB 0,7%, glucose 2%, histidine, leucine, méthionine et uracile, en présence ou non de 2% d'agar), ou sur du YPD lorsque aucune sélection n'est souhaitée.

Souche	Gène	Numéro d'accèsion	Phénotype altéré	Génotype
YEL027w	VMA3	Y00268	Thermorésistance/ résistance au pH alcalin	BY4741; Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YEL027w::kanMX4
YLR447c	VMA6	Y06051	Thermorésistance/ résistance au pH alcalin	BY4741; Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YLR447c::kanMX4
YCL005w	VMA9	Y03413	Thermorésistance/ résistance au pH alcalin	BY4741; Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YCL005w::kanMX4

Tableau n°2. Souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* utilisées lors de ce travail et leurs caractéristiques.

1.5 Cellules de tissu ovarien de *Spodoptera frugiperda* (Sf9)

1.5.1 Culture des cellules SF9

La lignée cellulaire Sf9 est un clone dérivée de la lignée cellulaire IPLB-Sf-21-AE. Ces cellules sont issues d'une lignée ovarienne de la chenille *Spodoptera frugiperda*.

Les cellules Sf9 sont cultivées dans un milieu composé principalement de milieu « Insect-XPRESS™ Protein-free Insect Cell Medium with L-glutamine » (Ozyme, Montigny le Bretonneux, France), additionné de 5% de sérum de veau fœtal (Fetal Bovine Serum, Carlsab, USA) et 0,1 % de gentamycine à 10 mg.ml⁻¹ (Sigma, La chapelle-sur-Erdre, France) et ensemencées à raison de 200 000 cellules par flasques de 25 cm² spécia-

lement traitées pour faciliter leur adhésion au support (Nunc SoLo Flasks, Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Les cellules sont incubées à 27°C. Lorsque la concentration initiale est de 200 000 cellules par flasque, la confluence est atteinte en 8 jours. Les cellules sont repiquées toutes les semaines jusqu'au 30^{ème} passage.

1.5.2 Tests de toxicité sur cellules Sf9

Les cellules Sf9 à environ 80% de confluence sont reprises dans 2 ml de milieu de culture et sont dénombrées à l'aide d'une cellule de Malassez. Elles sont ensuite diluées pour obtenir une concentration entre 15 000 et 20 000 cellules par ml de milieu de culture. La toxine testée est diluée avec du milieu de culture et 100 µl par puits de solution de toxine sont déposés dans une plaque 96 puits, puis 20 µl de cellules. Chaque condition est répétée trois fois. Les cellules sont mises à incuber cinq heures à 27°C, et la viabilité des cellules est déterminée en utilisant le kit CellTiter-Blue® (Promega, Madison, USA). Pour cela, 20 µl de réactif CellTiter-Blue sont ajoutés dans chaque puits. Ce réactif contient de la Resazurin dont l'absorbance se mesure à 605 nm. Les cellules vivantes métabolisent ce composé en Resorufin dont l'absorbance se mesure à 573 nm. L'absorbance est mesurée en lecteur de plaque à 605 et 573 nm toutes les heures pendant 5 heures.

2 Méthodes de biologie moléculaire

2.1 Clonages

2.1.1 Extraction d'ARN et réverse transcription

L'extraction d'ARN est réalisée à partir de *S. oryzae* en utilisant le kit « Total RNA isolation» (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Les insectes (60 mg) sont broyés au mortier et au pilon en présence d'azote liquide, trois fois consécutives, et la poudre résultante est utilisée pour l'extraction réalisée selon les consignes du fabricant.

La reverse transcription est réalisée à l'aide du kit « SuperScript First-Strand System for RT-PCR» (Invitrogen, Carlsbad, USA) selon le protocole du fabricant. Les ADNc obtenus peuvent être conservés à -20°C pendant une longue période.

2.1.2 Clonage dans le vecteur pCR2.1 des gènes d'intérêt

Le vecteur pCR2.1 (Figure 14) (Invitrogen, Carlsbad, USA) est utilisé pour le séquençage, la multiplication et la conservation des gènes et des ADNc tout au long de l'étude. L'insertion des séquences dans le vecteur se fait au niveau d'un site multiple de clonage situé à l'intérieur du gène lacZ, codant pour la β -galactosidase. Ceci permet de discriminer facilement les vecteurs ayant intégré le gène d'intérêt des autres. Les bactéries portant un vecteur contenant un gène LacZ intact se colorent en bleu en présence de X-Gal, ce qui n'est pas le cas de celles dont le vecteur a intégré une séquence, c'est-à-dire dont le gène LacZ est interrompu, qui restent blanches. Le principe de clonage est basé sur la capacité de la Taq polymérase à ajouter en fin de PCR, de part et d'autre de la séquence amplifiée deux adénines. Par ligation ces deux nucléotides se lient dans le vecteur pCR2.1.

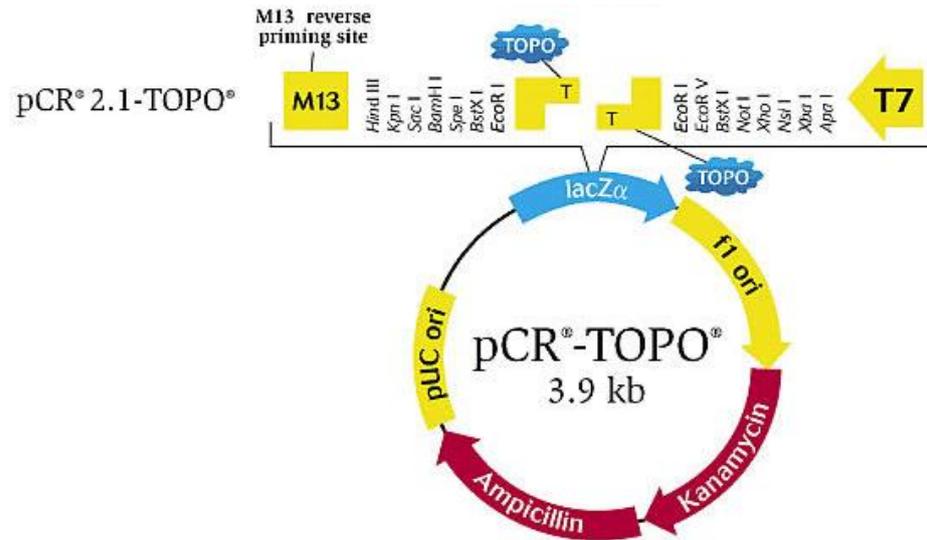


Figure 14: Carte du vecteur de clonage pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Le mélange d'amplification PCR (50 μ l) est composé de 5 μ l de tampon de réaction 10X ((NH₄)₂SO₄ 160 mM ; Tris-HCL 670 mM, pH 8.8 ; Tween-20 0.1%) 2,5 μ l de MgCl₂ 50 mM ; 2,5 μ l de dNTP 10 mM, 2 μ l d'amorces sens et antisens à environ 1 μ M ; 0,25 μ l de Taq-polymérase (Taq'Ozyme à 5 U. μ L⁻¹) et 2 μ l de matrice ADN (ADNc ou plasmides > 500 ng) ; le volume est ajusté à 50 μ l avec de l'eau ultra-pure. Les réactions PCR sont faites dans les conditions suivantes : 95°C, 5 min ; 30 cycles de [95°C, 30 sec – T_m, 1 min – 72°C, 1 min] ; 72°C, 10 min. Les amorces et les matrices utilisées, ainsi que les températures d'amorçage (T_m) de toutes les PCR réalisées au cours de ce travail sont présentées dans l'annexe 1. 10 μ l du produit d'amplification sont déposés sur un gel d'agarose 1 % contenant du bromure d'éthidium à (BET) 500 μ g. μ L⁻¹ afin de vérifier l'absence de contamination et l'amplification à la taille attendue.

A l'aide du kit TOPO® TA Cloning® Kit for Subcloning (Invitrogen, Carlsbad, USA), les produits d'amplification obtenus sont clonés dans le vecteur pCR2.1 et insérés dans *E. coli* selon le protocole suivant : de 2 à 4 μ l de produit d'amplification sont mis à incuber avec 1 μ l de tampon de réaction, 1 μ l de vecteur pCR2.1 et complétés à 5 μ l avec de l'eau ultra-pure. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, 2

µl de cette solution sont déposés dans un tube Eppendorf contenant des bactéries *E. coli* compétentes, DH5 α ou TOP10 (Invitrogen). Les vecteurs sont insérés dans les bactéries par choc thermique (20 minutes dans la glace, 35 secondes à 42°C, refroidissement dans la glace). Les bactéries additionnées de 250 µl de milieu SOC sont mises à incuber à 37°C sous agitation (220 rpm) pendant une heure. Elles sont ensuite étalées sur milieu sélectif (LB agar/ampiciline) préalablement recouvert de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) 40 µl à 40 mg.ml⁻¹ par boîte de Petri, et incubées 24 h à 37°C. La présence d'ampicilline dans le milieu garanti que seules les bactéries ayant intégré un plasmide aient la capacité de pousser. La présence de X-Gal permet de différencier les colonies qui ont un plasmide avec (blanches) ou sans (bleu) présence d'un insert. L'amplification des bactéries (culture liquide, LB/ampicilline) permet la multiplication du vecteur, nécessaire à la vérification de la séquence insérée dans le pCR2.1 par séquençage (Biofidal, Vaulx en Velin, France). Les différents vecteurs réalisés sont conservés indéfiniment au sein de bactéries *E. coli* par congélation à -80°C de culture fraîche (milieu de culture/solution de glycérol à 70%, 50/50 (v/v)).

2.2 Construction de vecteur d'expression hétérologue

2.2.1 Insertion de gènes d'intérêt dans le vecteur pYES2

Le vecteur pYES2 (Invitrogen, Carlsbad, USA) est utilisé pour l'expression hétérologue de protéines d'intérêt dans *Saccharomyce cerevisiae*. La présence du gène *URA3* permet la sélection des levures ayant intégré ce vecteur en les rendant prototrophes à l'uracile. L'insertion des gènes d'intérêt se fait en aval du promoteur inductible GAL1 au niveau d'un site multiple de clonage. Ce promoteur est inhibé en présence de glucose et induit en présence de galactose dans le milieu.

Tous les gènes d'intérêt sont insérés dans ce vecteur par « couper/coller » enzymatique à l'aide des enzymes BamHI en 5' et XhoI en 3', à l'exception du gène de V-ATPase sous-unité d de *S. oryzae* qui est inséré en 3' grâce au site de restriction EcoRI. Les coupures enzymatiques sont réalisées selon le protocole suivant : le mélange de réaction (de 1 à 5

µg d'insert ou de vecteur pYES2, 5 µl de tampon de réaction adéquat, 10 U de la première enzyme de restriction qsp 50 µl avec de l'eau ultrapure) est mis à incuber à 37°C dans un bloc chauffant. Au bout d'une heure la deuxième enzyme de restriction est ajoutée (10 U par réaction) et le tout est incubé deux heures supplémentaires. Les produits de la réaction de coupure enzymatique sont déposés sur un gel d'agarose 1 % contenant du BET, et après migration les bandes d'intérêts sont purifiées à l'aide du Kit Nucléospin extract II (Macherey Nagel, Hoerdt, France). Le vecteur pYES2 et le gène d'intérêt sont liés ensemble par une réaction de ligation réalisée par la T4 Ligase (Roche Applied Science, Meylan, France) dans le milieu suivant : ≈ 100 ng de vecteur, ≈ 20 ng de gène d'intérêt, 1,5 µl de tampon de réaction 10X, 2,5 U de T4 Ligase qsp 15 µl avec de l'eau ultrapure). Le milieu est incubé une nuit à 17°C.

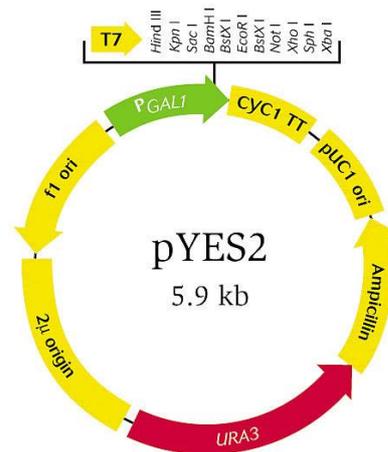


Figure 15 : Carte du vecteur d'expression hétérologue pYES-2 pour *Saccharomyces cerevisiae*, (Invitrogen, Carlsbad, USA).

2.2.2 Insertion de gènes d'intérêt dans le vecteur pMDC32

Le vecteur pMDC32 [CURTIS '03] (figure 16) est utilisé pour l'expression transitoire en plante. Au sein de ce vecteur, la séquence d'intérêt est sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort, le double 35S, et un terminateur Nos (terminateur du gène codant pour la nopaline synthase chez *A. tumefaciens*). Il contient également des gènes de résis-

tance à la kanamycine et à l'hygromycine. Les séquences d'intérêt sont insérées au niveau d'un site multiple de clonage, au sein duquel se trouve le gène *ccdB*. Pour les *E. coli* utilisées dans ce travail, l'expression de ce gène est toxique. L'insertion de la séquence d'intérêt dans le vecteur entraînant l'extrusion du gène *ccdB*, il n'y a alors plus de toxicité pour *E. coli*, permettant de sélectionner les bactéries ayant intégré un vecteur « vide » de celle ayant intégré un vecteur comportant la séquence d'intérêt.

Les différentes constructions sont toutes insérées dans ce vecteur par « couper/coller » enzymatique, selon le protocole présenté en 2.2.1, avec les enzymes de restriction BamHI (en 5') et SacI (en 3') (Roche Applied Science, Meylan, France). La ligation, la transformation des bactéries par choc thermique et la vérification de l'insertion des séquences d'intérêt dans le vecteur pMDC32 sont réalisées dans des conditions identiques à celles détaillées dans la partie 2.2.1.

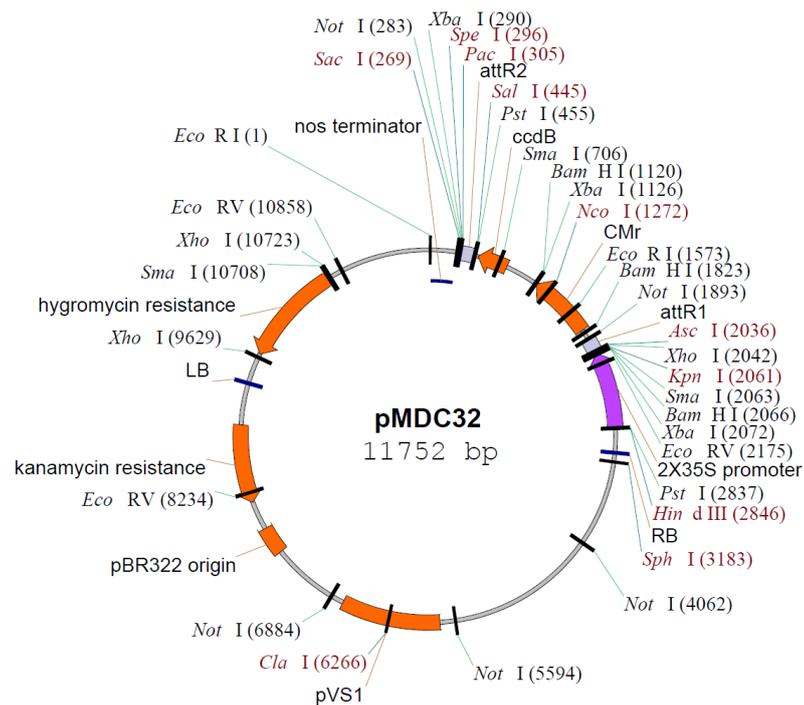


Figure 16 : Carte du vecteur d'expression hétérologue pMDC32 [CURTIS '03]

2.3 Conception d'une cassette d'expression à partir du vecteur pMDC32

2.3.1 Mutation de séquence par PCR

Le principe de toute mutation introduite par PCR repose sur l'observation qu'une stricte complémentarité de l'amorce nucléotidique avec la séquence de l'ADN cible n'est pas absolument nécessaire sur toute la longueur considérée. Cette observation a été très largement utilisée afin d'insérer de part et d'autre d'une séquence d'intérêt des sites de coupures enzymatiques, un site d'initiation de traduction (ATG), ou un site de terminaison de traduction (TAA). Pour cela, en 5' des amorces choisies pour l'amplification PCR, la séquence codante pour la mutation voulue est ajoutée. Dans ce cas, la partie de l'amorce non strictement complémentaire à l'ADN à amplifier est nommée « queue flanquante », elle ne doit pas dépasser 1/3 de la longueur totale de l'amorce.

Pour insérer une mutation au centre d'une séquence il faut alors deux couples d'amorces et trois réactions de PCR (Figure 17). Une paire d'amorces qui apporte la mutation (amorces n°1 et n°2) et une paire qui permet d'étendre l'ADN ainsi modifié de part et d'autre de la mutation (amorces n°3 et n°4). Les amorces n°1 et n°2 sont complémentaires et elles recouvrent toutes les deux la zone du gène d'intérêt à muter. Les amorces n°3 et n°4 bornent le segment d'ADN à modifier et déterminent la longueur du produit final. Dans un premier temps, deux réactions de PCR sont d'abord réalisées en parallèle : une PCR avec les amorces n°2 et n°3 donne un produit d'amplification correctement muté dans la région désirée mais ne contient que la moitié 5' de la séquence à modifier. Une PCR avec les amorces n°1 et n°4 donne un produit, lui aussi correctement muté, mais qui contient l'autre moitié de la séquence. Les deux produits de PCR ainsi obtenus sont alors purifiés afin d'enlever les amorces restantes dans le milieu et réunis dans un même tube. Ces deux fragments du gène à amplifier ont en commun la zone mutée, ce qui permet leur hybridation. Une dernière PCR utilisant les amorces n°3 et n°4 est alors réalisée sur ce mélange et donne la séquence matrice du départ avec la mutation souhaitée.

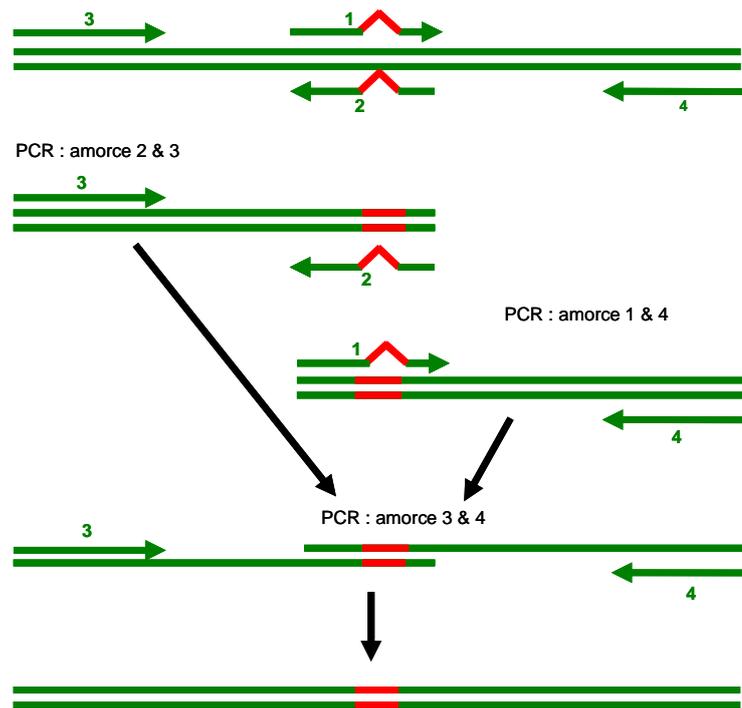


Figure 17 : Principe de la mutagenèse dirigée par PCR : la zone d'insertion de la modification est représentée en rouge. Les différentes amorces sont représentées par des flèches vertes dans le sens d'élongation.

2.3.2 Mutation de séquence PA1 pour l'insertion de deux sites de restriction par mutagenèse dirigée.

Dans le vecteur pCR2.1 PA1 BamHI/SacI sont insérés en position 69 et 207 les sites de restriction SnaBI et Acc651. Les amorces utilisées pour chacune de ces mutations sont présentées dans l'annexe 1. Le mélange d'amplification PCR (20 μ l) est composé de 2 μ l de tampon de réaction 10X ((NH₄)₂SO₄ 160 mM ; Tris-HCL 670 mM, pH 8.8 ; Tween-20 0.1%) (Ozyme, Montigny le Bretonneux, France) 1 μ l de MgCl₂ 50 mM ; 1 μ l de dNTP 10 mM ; 1 μ l d'amorces sens et antisens à environ 1 μ M ; 2 μ l de matrice ADN (vecteur pCR2.1 PA1 BamHI/SacI) et 0,25 μ l de Taq-polymérase Haute fidélité à 5 U μ L⁻¹ (Platinum Taq DNA polymerase High fidelity, Invitrogen, Carlsab, USA) ; le volume est ajusté à 20 μ l avec de l'eau ultrapure. Les réactions PCR sont faites en ne réalisant que 28 cycles et en enlevant les dix minutes terminales à 70°C pour les PCR n°1 et 2. En effet il est impératif que la Taq polymérase n'ajoute pas

d'adénine en fin de réaction. Le produit d'amplification terminal est cloné dans le vecteur pCR2.1 et donne le vecteur nommé pCR2.1 PA1 *Sna*BI.

La mutation *Acc651* est réalisée de façon similaire à la mutation *Sna*BI, en utilisant comme matrice ADN le vecteur pCR2.1 PA1 *Sna*BI. Le vecteur obtenu est nommé pCR2.1 PA1 cassette. L'ADNc de *PA1* modifié avec les deux sites de restriction est inséré dans le vecteur pMDC32.

2.4 Modification de la séquence codant PA1b : mutation par PCR avec de longues amorces.

2.4.1 Principe de mutation par longues amorces

A l'inverse de la mutagenèse dirigée, une seule PCR est nécessaire pour insérer plusieurs mutations au sein de la même séquence, par contre elle n'est pas applicable sur des mutations situées au centre de séquence supérieure à 160 paires de bases (figure 19). Les deux amorces sont complémentaires de la séquence à amplifier sauf au niveau des mutations. Par la synthèse d'amorces de plus de 80 paires de bases (Eurogentec, France SA), nous pouvons insérer des mutations jusqu'à 80 paires de bases en aval du 5' ou en amont du 3'. La séquence codant pour PA1b faisant 139 paires de bases, nous sommes capable grâce à cette technique d'insérer une mutation n'importe où dans la séquence.

2.4.2 Obtention des séquences codant pour différents isoformes de PA1b

A partir du vecteur pCR2.1 PA1 K7, cinq autres isoformes de PA1b ont été clonés par mutation lors d'amplification par PCR avec de longues amorces. Lors de ces amplifications, en plus des mutations différenciant les six isoformes de pois, les sites de restriction *Sna*BI et *Acc651* sont ajoutés en 5' et 3' de chaque séquence PA1b. Les couples d'amorces utilisés et les isoformes de PA1b auxquels ils correspondent sont présentés en annexe 1. Pour les PCR, la température d'amorçage est de 50°C et on utilise la Platinum Taq DNA polymerase High fidelity, (Invitrogen, Carlsbad, USA). Les produits d'amplifications sont clonés dans le vecteur

PCR2.1 puis insérés dans la cassette d'expression pMDC32-PA1-ADNc-cassette au niveau des sites de restriction SnaBI et Acc651. La réaction de coupure enzymatique se fait en utilisant 7,5 U de l'enzyme Acc651 et 7,5 U d'enzyme SnaBI (Promega, Madison, USA).

3 Méthodes de biologie cellulaire

3.1 Expression hétérologue de PA1b par transformation transitoire de *Nicotiana benthamiana*

3.1.1 Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens* par choc thermique

Les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* souche C58 pMP90 sont rendues compétentes avant de pouvoir effectuer la transformation. Pour cela une culture de 50 ml de bactéries (LB/rifampicine 50 mg.L⁻¹, une nuit à 27°C sous agitation douce), est centrifugée cinq minutes, 3000 g à 4°C. Le culot est resuspendu dans 1 ml de solution de CaCl₂ 20 mM. La solution bactérienne est aliquotée par 100 µl (quantité utilisée pour une transformation) et conservée à -80°C.

Un aliquot d'*A. tumefaciens* compétentes est décongelé doucement dans la glace. Après y avoir ajouté 5 µg d'ADN plasmidique (vecteur pMDC32-séquence d'intérêt), le mélange est incubé 20 minutes dans la glace, sept minutes dans de l'azote liquide, puis 35 minutes à 37°C. Les bactéries sont ensuite mises en culture dans 10 ml de LB (1 nuit à 27°, sous agitation 220 rpm). La culture est ensuite centrifugée 15 minutes à 4000 g, et le culot est repris dans 300 µl de LB. Les bactéries sont ensuite étalées sur milieu sélectif (LB/rifampicine/kanamycine). La résistance à la rifampicine étant apportée par le vecteur pMDC32, seules les Agrobactéries ayant intégré le plasmide sont capables de pousser sur ce milieu.

3.1.2 Transformation transitoire de feuilles de *N. benthamiana* par infiltration

Une colonie d'*A. tumefaciens* transformée est mise en pré-culture (5 ml LB/rifampicine/kanamicine, 28°C, 24 h, 220 rpm), en même temps que la souche *A. tumefaciens* p19. A partir de ces pré-cultures, les différentes souches sont mises en culture de 50 ml en Erlenmeyer (LB/rifampicine/kanamicine, 28°C, 24 h, 220 rpm). La D_{0.600} des cultures bactériennes est mesurée, et est ramenée à 0,3 par dilution. Après deux

heures d'incubation (50 ml LB/rifampicine/kanamycine, 28°C, 220 rpm) les cultures bactériennes sont centrifugées (3500 rpm, 10 min) et lavées deux fois dans 10 ml de solution d'incubation (50 mM MES pH 5.6, NaH₂PO₄ 2 mM, acétosyringone 100 µM, 0.5% de glucose). Les solutions d'Agrobactéries portant le vecteur pMDC32 et p19 sont mélangées dans les proportions 50/50 (v/v) et incubées au minimum deux heures. Ces solutions sont co-infiltrées dans les feuilles de *N. benthamiana*. Avec un embout pour pipette de 200 µL, la feuille est délicatement trouée, puis le milieu est injecté à l'aide d'une seringue sans aiguille de 2 ml, en bloquant l'autre côté de la feuille avec un doigt jusqu'à infiltration de la totalité de la feuille. Une fois infiltrés, les plants de tabac sont cultivés dans des conditions similaires aux tabacs non transformés. Après récolte, les feuilles sont conservées au congélateur à -80°C.

Les feuilles de tabac infiltrées, les feuilles non infiltrées, les tiges ou les racines de tabacs sont broyées au mortier et au pilon dans de l'azote liquide directement à la sortie du congélateur. Le broyage est répété trois fois. La suite de l'extraction et de la purification de PA1b est présentée en partie 5.1.

3.2 Complémentation fonctionnelle chez *S. cerevisiae*

3.2.1 Transformation de levure : méthode de l'acétate de lithium

Les souches de *S. cerevisiae* YEL027w, YLR447c et YCL005w sont cultivées en Erlen, dans 50 ml de milieu YNB sélectif, à 27°C sous agitation jusqu'à obtention d'une DO₆₀₀ comprise entre 1 et 2. Les solutions suivantes sont à préparer préalablement et à autoclaver : solution d'acétate de lithium 10X (1M de lithium acétate, le pH est ajusté avec de l'acide acétique à 7,5), solution TE (100 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 10 mM EDTA pH 7,5) et une solution PEG (polyéthylène glycol 4000 50 % dans l'eau). Les cultures sont centrifugées à 3000 rpm, 5 min. Le culot est lavé avec 20 ml d'eau ultra-pure préalablement autoclavée. Après une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans 250 µl de tampon d'acétate de lithium/TE/eau (1/1/8) (v/v/v) et des aliquots de 50 µl sont réalisés (quantité nécessaire pour une transformation). Pour chacune des transformations,

3 µl d'ADN carrier (single strand salmon sperm ADN 10 mg.ml⁻¹, Sigma, France) sont ajoutés dans 50 µl de solution de levure, ainsi que l'ADN transformant (1 à 2 µg dans moins de 5 µl). L'ensemble est mélangé en tapotant légèrement le tube. 350 µl de mélange lithium d'acétate/TE/PEG dans les proportions 1/1/8 (v/v/v), sont ajoutés. La solution est mélangée par inversion et mise à incuber 30 minutes à 30°C, puis 20 minutes à 42°C. Le mélange est centrifugé à 15 000 rpm pendant une minute à température ambiante. Le surnageant est éliminé, et les levures sont resuspendues dans 100 µl de solution TE 1X. Elles sont ensuite étalées sur milieu sélectif en absence d'uracile et incubées à 27°C. Seules les levures ayant intégré le vecteur pYES2 sont capables de se développer.

3.2.2 Transformation de levure : méthode de l'électroporation

Les souches d'*S. cerevisiae* sont cultivées en Erlen, dans 50 ml de milieu YNB sélectif, à 27°C sous agitation jusqu'à obtention d'une DO₆₀₀ comprise entre 0,6 et 1,2. Les cultures sont centrifugées (4000 rpm, 3 min) et le culot est lavé par 20 ml d'eau ultra-pure préalablement autoclavée et à nouveau centrifugées. Le culot est repris dans 5 ml de YPD contenant du DTT 25 mM, et du tampon HEPES 20 mM pH 8 et le tout est mis à incuber 30 minutes à 30°C. Une nouvelle centrifugation est réalisée (4000 rpm, 3 min), et le culot est repris dans 250 µl de tampon EP (10 mM de Tris-HCl pH 7,5 ; 270 mM de saccharose et 1 mM de MgCl₂). Les cuvettes d'électroporation stériles et du milieu YPD sont refroidies sur glace. Dans un tube Eppendorf, 100 à 200 ng (<2µl) d'ADN transformant sont mélangés avec 50 µl de culture de levure dans le tampon EP. Le mélange est transféré dans une cuvette d'électroporation qui est ensuite placée dans l'électroporateur. Un courant de 1000 volts est appliqué. On ajoute rapidement 1ml de YPD, et on transfère les levures dans un tube froid et stérile. Après 60 minutes d'incubation à 27°C, les levures sont étalées sur boîte de Petri contenant un milieu sélectif, en absence d'uracile afin de sélectionner les souches ayant intégré le vecteur pYES2.

3.2.3 Expression de la protéine recombinante et test de complémentation fonctionnelle

Les souches utilisées, en raison de la suppression d'un des gènes codant pour une des sous-unités Vo de V-ATPase, ont perdu leur capacité à pousser sur un milieu alcalin (pH de 7,5), ou à température élevée (37°C). Les tests de complémentation sont réalisés sur milieu inductif solide, soit à une température de 37°C soit sur milieu alcalin (milieu sélectif ; galactose ; 50 mM de MOPS ; 50 mM de MES ; pH7,5). La croissance des levures est regardée quotidiennement pendant cinq jours. Les résultats sont interprétés par comparaison de croissance de souche mutée complé-mentée par leur propre sous-unité par rapport à celle complé-mentée par une sous-unité hétérologue.

4 Méthodes d'histologie

4.1 Immunomarquage d'intestins de *S. oryzae*

4.1.1 Préparation des échantillons

Les insectes adultes, *S. oryzae* souches WAA42 et IsoR3, et *Tribolium castaneum* utilisés pour ces tests sont âgés de plus de 15 jours (après émergence). Exceptionnellement pour cette manipulation, la souche de *S. oryzae* IsoR3 est élevée depuis la ponte des œufs sur grains de blé. Une vingtaine d'insectes pour chaque test est intoxiquée par ingestion en introduisant les composés testés dans leur milieu artificiel habituel pendant 24 h. Un jour après intoxication, les tubes digestifs d'insectes sont prélevés par dissection sous loupe dans du tampon de dissection (25 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 250 mM sucrose, 35 mM Tris-HCl, pH 7,5) et sont stockés dans du PFA 4%. Les tubes digestifs sont ensuite imprégnés pendant 24 h dans une solution de 15% de saccharose, 5% de glycérol en tampon PBS pH 7,2. Les échantillons sont déposés dans du gel Tissue-tek O.C.T compound (Sakura) et congelés à la vapeur d'azote liquide. Lorsque le gel est congelé, il forme un bloc blanc et dur et il permet de conserver les échantillons pendant de longues périodes à -80°C. Les blocs sont coupés au cryostat (Microm HM 560 ; Thermo scientifique) par coupe de 7 µm d'épaisseur et sont déposées sur lame polylysine (Thermo Scientific). Les lames sont conservées à -80°C pendant quelques semaines en les préservant de l'humidité.

4.1.2 Immunomarquage de la caspase 3

Les lames portant les tubes digestifs sont séchées dix minutes sur plaques chauffantes à 60°C, puis incubées 30 minutes dans une solution de Finefix (28% de Finefix (Milestone) et 72% éthanol) ce qui permet de fixer les échantillons aux lames. Les échantillons sont ensuite réhydratés en plongeant les lames dans les bains suivant : deux bains d'EtOH absolu, 2 min ; EtOH 95%, 2 min, EtOH 70%, 2 min. L'étape de réhydratation se

termine par un rinçage et une incubation de cinq minutes dans du tampon PBS. Les sites antigéniques sont démasqués à la chaleur en immergant les lames dans de l'Antigen Retrieval Buffer (Tris base 10 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 0,05%, pH 9) et en incubant le tout à 99°C pendant 20 minutes. Les lames sont ensuite refroidies en les rinçant à l'eau courante pendant dix minutes. Les sites non spécifiques sont bloqués en recouvrant les lames d'une solution de BSA 1% diluée par du PBS pendant 30 minutes. Le contour des lames est dessiné avec un crayon hydrophobe ce qui permet de retenir les différentes solutions sur la lame. Elles sont recouvertes de 390 µl de solution d'anticorps primaire (Rabbit Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody, référence 9661, Ozyme) dilué au 1/200 avec de la BSA 0,1%, ou de 390 µl de sérum de lapin non immun (dilué au 1/200 avec de la BSA 0,1%), pour le contrôle négatif. Les lames sont incubées une nuit à 4°C dans une enceinte humide. Les anticorps primaires sont lavés en incubant les lames dans une solution de PBS/Tween20 0,2%, deux fois cinq minutes. Une fois rincées, chaque lame est recouverte de 390 µl de solution d'anticorps secondaire (Donkey anti-rabbit IgG couplé à l'Alexa 488 (Molecular Probes ; référence A21206)) dilué au 1/600 avec de la BSA 0,1% pendant 1 h à température ambiante et à l'obscurité. Les lames sont rincées par incubation au PBS/Tween-20 0,2% deux fois pour une durée de cinq minutes, puis cinq minutes dans de l'eau. Elles sont séchées à température ambiante et à l'obscurité. Les lames sont ensuite recouvertes de milieu de montage PermaFluor™ Aqueous Mounting Medium (ThermoFisher Scientific, Cheshire, UK) additionné de 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) à 3 µg.ml⁻¹ et recouvertes d'une lamelle en essayant de limiter l'apparition de bulles au maximum.

4.1.3 Observation des échantillons au microscope

Les échantillons sont observés au microscope à épifluorescence IX81 Olympus, sous les filtres spécifiques d'émission suivant : HQ535/50 pour le signal vert (fluorescence de l'anticorps secondaire), D470/40 pour le signal bleu (DAPI) et HQ610/75 pour le signal rouge (auto-fluorescence des tissus). Les images sont prises et analysées en utilisant la camera F-View II couplée avec le logiciel Cell F (Olympus SIS GmbH, Münster, Allemagne).

5 Méthodes de biochimie

5.1 Extraction et purification de PA1b par HPLC

5.1.1 Extraction de PA1b à partir de graine de pois (*Pisum sativum*)

Les pois sont broyés au moulin puis tamisés jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. PA1b est extrait dans une solution d'éthanol/eau (60/40) sous agitation douce pendant deux heures. La solution obtenue est ensuite centrifugée (10 000 g, 20 min, 4°C). L'alcool présent dans le surnageant est ensuite évaporée sous vide d'air. La solution restante est congelée puis lyophilisée.

5.1.2 Purification par HPLC

Après lyophilisation l'extrait obtenu est repris dans de l'éthanol 60% et purifié par HPLC (High Performance Liquid Chromatography, appareillage Agilent 1200) en phase reverse, sur une colonne C₁₈ éluée à 1 ml.min⁻¹ avec un gradient eau/acétonitrile en présence d'acide trifluoroacétique 0.1% (80/20, 2 min, puis jusqu'à 40/60 en 20 min). La présence de PA1b est détectée par un détecteur à barrettes de diodes à 210 nm ; la quantification de la protéine se fait par mesure de l'aire du pic correspondant au temps de rétention de PA1b rapporté à l'aire du pic du peptide pur utilisé comme standard.

5.2 Mesure de la quantité de protéine (BCA)

La quantité de protéines est mesurée par la méthode de l'acide bicinchoninique développée par Pierce (Rockford, USA). Cette méthode est basée sur la propriété des protéines à réduire l'ion cuivrique en cuivre en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique est un réactif colorigène hautement spécifique pour le cuivre, qui forme un complexe pourpre ayant une absorption maximale à 562 nm. Les extraits à tester sont déposés dans

100 μl auxquels on ajoute 2 ml de réactif (BCA Protein Assay Kit ; Thermo Scientific, France). Les tubes sont incubés 30 minutes à 37°C, puis la DO_{562} est mesurée. L'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines. En parallèle une gamme étalon est réalisée avec de la BSA.

5.3 Test de liaison PA1b-récepteur

5.3.1 Préparation des échantillons

Une colonie de levure est mise en culture de 200 ml (27°C, 220 rpm, 24 h) dans un milieu sélectif adapté, puis les levures sont récupérées par centrifugation (4000 g, 15 min) et conservées à -20°C. Les levures sont broyées au mortier et au pilon dans l'azote liquide (quatre fois). La poudre obtenue est reprise dans un tampon d'extraction à 4°C (Tris-HCl 20 mM pH 8, E-64 10 μM , PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) 1 mM, MgCl_2 2 mM et 0,25 M de sucrose) puis soniqué (cinq fois cinq secondes) en prenant garde de bien refroidir les échantillons entre deux passages. Les débris cellulaires sont ensuite fractionnés par centrifugation différentielle, (3 000 g 10 min, puis 10 000 g, 15 min et 45 000 g 45 min). Les trois culots obtenus sont repris dans 200 à 1000 μl de solution (20 mM Tris-HCl, pH 7), et stockés à -80°C dans 30% de glycérol.

5.3.2 Test de liaison PA1b-récepteur

PA1b est marqué radioactivement à l'iode 125 selon le protocole décrit par [GRESSENT '03]. Un extrait protéique de charançon est utilisé comme témoin positif à ce test. Dans une plaque 96 puits, sont déposés dans cet ordre : 2 μl de solution de PA1b marqué à 100 000 cpm. μl^{-1} , 2 μl de méthanol 60% (pour le marquage total) ou 2 μl de PA1b non marqué 1 μM (pour le marquage non spécifique) et 100 μl d'extrait protéique (3 à 20 μg de protéines). Pour chaque mesure, trois répétitions sont réalisées pour le marquage total et pour le marquage non spécifique. Après incubation deux heures à température ambiante, les extraits sont filtrés sur membranes (Whatman membrane GF/C, imbibées d'une solution de poly(éthylèneimine) à 0,4%, et rincée avec 0,5 ml de solution de Tris-HCl 20

mM, pH 7) à l'aide du système de filtration 1225 sampling manifold (Millipore). Le PA1b I¹²⁵ non lié est éliminé des membranes par trois rinçages consécutifs avec du tampon Tris (Tris-HCl 20 mM, pH 7). La radioactivité restée sur les membranes est mesurée avec un détecteur de rayonnements gamma (Riastar-Packard). La liaison de PA1b spécifique est calculée par différence de radioactivité entre les extraits marqués de manière non spécifique et totale.

5.4 Dégradation de PA1b par les enzymes de *N. benthamiana*

Les feuilles congelées sont broyées à l'azote liquide, et la poudre obtenue est reprise dans un tampon d'extraction (20 mM Tris pH 7 ; 0,1 M NaCl et 0,1% CHAPS). Le mélange est centrifugé brièvement deux minutes à 10 000 g, et le culot est éliminé. Le surnageant est centrifugé dix minutes à 10 000 g. Le surnageant est séparé et conservé, et le culot est repris par le tampon d'extraction. Pour la réaction, 100 µl des différents extraits sont incubés une nuit à 30°C en présence de 10 µg de PA1b, et 200 µl de tampon pH 7 (tampon d'extraction), pH 8 (composition identique au tampon d'extraction, en remplaçant le Tris-HCl pH 7 par du Tris-HCl pH 8), ou pH 5 (le Tris pH 7 est remplacé par de l'acétate 50 mM à pH 5). Le lendemain, 450 µl d'éthanol sont rajoutés au mélange pour obtenir une solution à 60% d'éthanol. Le mélange est agité deux heures à température ambiante, puis centrifugé dix minutes à 10 000 rpm. Les solvants sont évaporés sous vide et les extraits sont repris dans 150 µl d'éthanol 60%. La quantité de PA1b contenue dans chaque extrait est mesurée par HPLC.

5.5 Mesure de l'activité enzymatique de la caspase 3

La caspase 3 reconnaît le substrat artificiel DEVD-pNA (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-pNA, Calbiochem, Ref. 235400) et l'hydrolyse, ce qui libère dans le milieu le composé pNA (*p*-nitroaniline), qui émet à une lon-

gueur d'onde de 405nm [GURTU '97, SALVESEN '97]. 24 heures après intoxication, dix tubes digestifs (pour *S. oryzae*) ou douze (*T. castaneum*) sont disséqués, déposés dans 50 µl de tampon de lyse (20 mM PIPES pH 7,2 ; 100 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 63 mM MgCl₂ ; 10% saccharose ; 0.1% CHAPS ; 0.5% Nonidet P-40 et 0.5% Tween 20). Les tubes digestifs sont homogénéisés à l'aide d'un Potter, soniqués pendant dix minutes et centrifugés (10 000g, 10 min). Le surnageant est conservé, et le culot est re-suspendu dans 50 µl de tampon de lyse. La réaction enzymatique est réalisée en ajoutant 20 µl d'extrait de tube digestif à 180 µl de tampon de réaction (20 mM PIPES pH 7,2 ; 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 63 mM MgCl₂, 10% saccharose, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, et 0.1 mM DEVD-pNA) dans une plaque 96 puits. La libération de pNA dans le milieu est mesurée toutes les 15 minutes pendant 12 h, à l'aide d'un lecteur de plaque (Powerwave WS), à une longueur d'onde de 405nm. L'activité caspase 3 est calculée en suivant les instructions du fournisseur du DEVD-pNA.

5.6 Analyse par spectrométrie de masse

Les différents peptides sont identifiés par spectrométrie de masse par le Dr. Lucas SIGNOR (CEA, Grenoble, France). Les échantillons sont analysés par MALDI-TOF MS (Autoflex, Bruker Daltonics), fonctionnant en mode de réflexion positive.

Partie 3

Résultats et discussion

Partie 3

Chapitre 1

Identification du récepteur à PA1b

1.1 Introduction

1.1.1 Les rôles connus de PA1b

Toutes les recherches réalisées sur PA1b par l'équipe « Entomotoxine » sont basées sur les propriétés entomotoxiques de ce peptide. Il semble donc que PA1b joue un rôle de protection contre les insectes dans la plante, mais d'autres travaux ont permis de lui attribuer un rôle différent.

1.1.1.1 Le rôle de PA1b dans la plante

Lors de sa découverte en 1986, la richesse en soufre de PA1b a conduit à sa classification en tant que protéine de réserve de la plante [HIGGINS '86]. Cette théorie est renforcée par la découverte de la régulation de la transcription du gène *PAI* par la quantité de soufre disponible pour la plante [MORTON '98].

La protéine nommée leginsuline est un homologue de PA1b issue du soja. Elle a été nommée ainsi en raison de sa capacité à se lier sur un récepteur de l'insuline et des facteurs de croissance « insuline-like » chez les mammifères [WATANABE '94, HANADA '04]. Ce récepteur de 43 kDa est également retrouvé chez une espèce non légumineuse, la carotte (famille des Apiacés), où il présente les mêmes propriétés de liaison de l'insuline et de la leginsuline. Des expériences en culture *in vitro* sur des cals de carotte ont montré que la présence de leginsuline dans le milieu augmente la division cellulaire. Les auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle la leginsuline interagirait avec le récepteur de 43 kDa en tant qu'hormone végétale impliquée dans la réponse aux stress et dans la transduction de signaux. L'analyse des acides aminés de la leginsuline impliqués dans la liaison à ce récepteur de plante montre qu'ils sont différents de ceux impliqués dans la liaison de PA1b avec le récepteur de charançon. Ce récepteur distinct de celui trouvé chez l'insecte se retrouverait dans de nombreuses espèces de plantes telles que la tomate, *Arabidopsis*, le blé ou le coton. PA1b aurait donc la capacité d'agir sur d'autres végétaux, n'appartenant pas à la famille des légumineuses [YAMAZAKI '03, SHANG '04, SHANG '05].

1.1.1.2 Et sur les mammifères alors...

Des études sur l'intestin de porc ont permis de mettre en évidence un nouveau peptide nommé aglycine, dont l'effet hyperglycémiant a été montré chez la souris, par injection sous cutanée. Ce peptide induit le doublement de la quantité de glucose présent dans le sang de la souris en moins d'une heure (à $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids du corps). Par la suite il a été montré que ce peptide ne provenait pas du porc, mais certainement de son alimentation riche en légumineuses [DUN '07]. L'aglycine, est un homologue de PA1b. Des analyses effectuées sur le rat décrivent que PA1b induit une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire dans les cellules β pancréatiques [HU '07]. Un récepteur à l'aglycine de 34 kDa, a été identifié dans des membranes de cellules pancréatiques. Il s'agit de la VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) [DUN '08] qui est une pompe chlore présente dans les membranes plasmiques [DE PINTO '10].

1.1.2 Les récepteurs de PA1b

Dans la plante le récepteur à PA1b serait une protéine de 43 kDa, jusqu'à présent non identifiée, mais impliquée dans la régulation hormonale. Chez les mammifères, le récepteur à PA1b est un canal ionique nommé VDAC [DUN '08]. Chez l'insecte, il a été montré que le récepteur à PA1b est une pompe à protons nommée V-ATPase [CHOUABE '11]. Ce complexe protéique est composé de 14 sous-unités, parmi lesquelles il faut identifier la ou les sous-unités réceptrices à PA1b. L'action de PA1b étant extracellulaire seules les sous-unités du complexe V_o peuvent être la cible de PA1b. Le clonage de ces sous-unités a, c, d et e ainsi que celui de la protéine Ac45 qui fonctionne en relation avec le complexe V_o a été initié avant mon arrivée au laboratoire, sur le charançon sensible, et sur sa lignée quasi isogénique résistante. J'ai donc commencé par ces clonages, dans le but de faire de la complémentation fonctionnelle de levures déficientes pour les sous-unités V_o de V-ATPase par leurs homologues clonés chez le charançon. La réalisation d'études de liaison à PA1b radiomarqué et/ou des tests de toxicité sur ces levures exprimant les sous-unités de charançon devrait nous permettre d'identifier quelle sous-unité perçoit le signal PA1b.

L'identification de la ou des sous-unité(s) réceptrice(s) à PA1b est une étape primordiale pour la compréhension du mécanisme de sensibilité/résistance de PA1b chez l'insecte. Pour cette raison, nous avons en parallèle établi une collaboration avec des spécialistes de la V-ATPase d'insecte afin de compléter notre approche par des méthodes de microscopie électronique et de biochimie, afin d'identifier le site récepteur de PA1b.

1.2 Résultats

1.2.1 Clonage du gène *VDAC* chez *Sitophilus oryzae*

Le récepteur à PA1b chez les mammifères est une VDAC. Cette protéine existant chez les insectes, il n'est pas exclu qu'elle puisse être le récepteur à PA1b chez ceux-ci. Afin de déterminer s'il existe une différence de séquences protéiques dans la VDAC pouvant expliquer une différence de liaison de PA1b entre le charançon sensible et le charançon résistant, elle a été clonée chez *S. oryzae* souche sensible (WAA42) et sur sa lignée quasi-isogénique résistante (IsoR3). La séquence codant cette protéine n'a jamais été identifiée chez *S. oryzae*, mais est connue chez *Drosophila melanogaster* (GenBank: BT024247.1). La recherche de séquence homologue à l'ADNc codant la VDAC de *D. melanogaster* dans une banque EST de *S. oryzae* [PAUCHET '10] a permis de révéler une séquence homologue. Deux amorces nucléotidiques spécifiques de l'amplification de la VDAC de *S. oryzae* situées en 5' et 3' de la séquence ont pu être synthétisées (annexe 1). L'amplification PCR, le clonage et le séquençage des fragments obtenus à partir de l'ADNc de *S. oryzae* WAA42 et IsoR3, ont permis d'obtenir les séquences codant la VDAC de charançon sensible (WAA42 ; EMBL-EBI numéro d'accèsion FR870467), et résistant (ISOR3, EMBL-EBI numéro d'accèsion FR870468) (figure 18). La traduction de ces séquences nucléiques en séquences protéiques et l'alignement de ces séquences ont révélé une différence d'un acide aminé. En position 131, la souche sensible à PA1b présente une serine, alors que la souche résistante présente soit une serine, soit une thréonine.

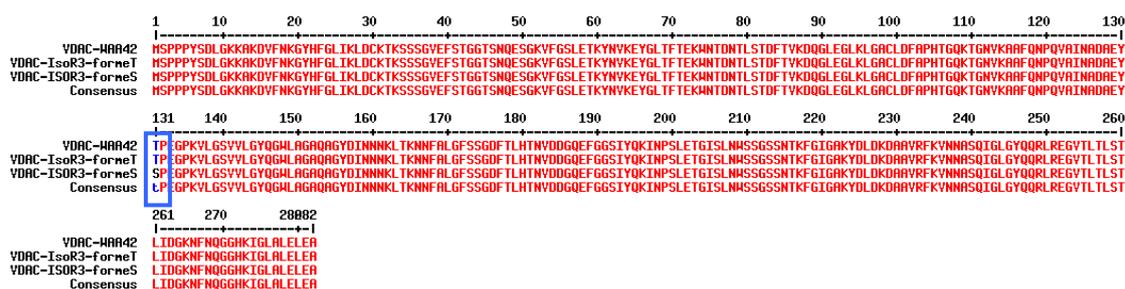


Figure 18 : Séquences protéiques de la VDAC de charançon sensible (WAA42) et résistant (IsoR3). L'alignement est réalisé à l'aide du logiciel multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). La différence de séquence observée en position 131 est entourée d'un rectangle bleu. Deux séquences différentes ont été retrouvées pour la souche résistante (forme T = une thréonine en position 131, et forme S = une serine en position 131), dont l'une d'entre elle (forme T) est identique à la séquence protéique de VDAC issue de la souche sensible.

1.2.2 Clonage des sous-unités du complexe Vo de la V-ATPase

Le complexe Vo de la V-ATPase a été identifié comme récepteur à PA1b chez l'insecte [CHOUABE '11]. Afin de déterminer si une (ou plusieurs) de ces sous-unité(s) présente(nt) une ou des modifications de séquence protéique pouvant expliquer la différence de liaison de PA1b entre les charançons sensibles et résistants, les quatre sous-unités de la V-ATPase du complexe Vo (a, c, d et e) ont été clonées. Ce travail, réalisé à l'aide d'amorces dégénérées, puis les clones complets obtenus par Race-PCR à partir d'ADNc de *Sitophilus oryzae* sensible (WAA42) et résistant (IsoR3), a été initié par Frédéric Gressent et complété par moi même. Après séquençage et traduction, les séquences protéiques obtenues à partir de charançons sensibles et résistants sont comparées. Deux isoformes de la sous-unité a ont été retrouvées chez *S. oryzae* (figure 19). L'isoforme a2 ne présente aucune différence de séquences protéiques entre les souches sensibles et résistantes de charançon. L'isoforme a1 présente quatre différences entre les séquences protéiques obtenues à partir de WAA42 et IsoR3 (Ala 201 Val ; Gly 437 Asp ; Arg 668 Lys et Glu 670 Lys).

L'isoforme a1 présentant des différences de séquences protéiques entre WAA42 et IsoR3, elle a également été clonée chez la souche sensible de *S. oryzae* Bouriz et dans les souches résistantes China et GV. Les résultats sont présentés dans le tableau n°3.

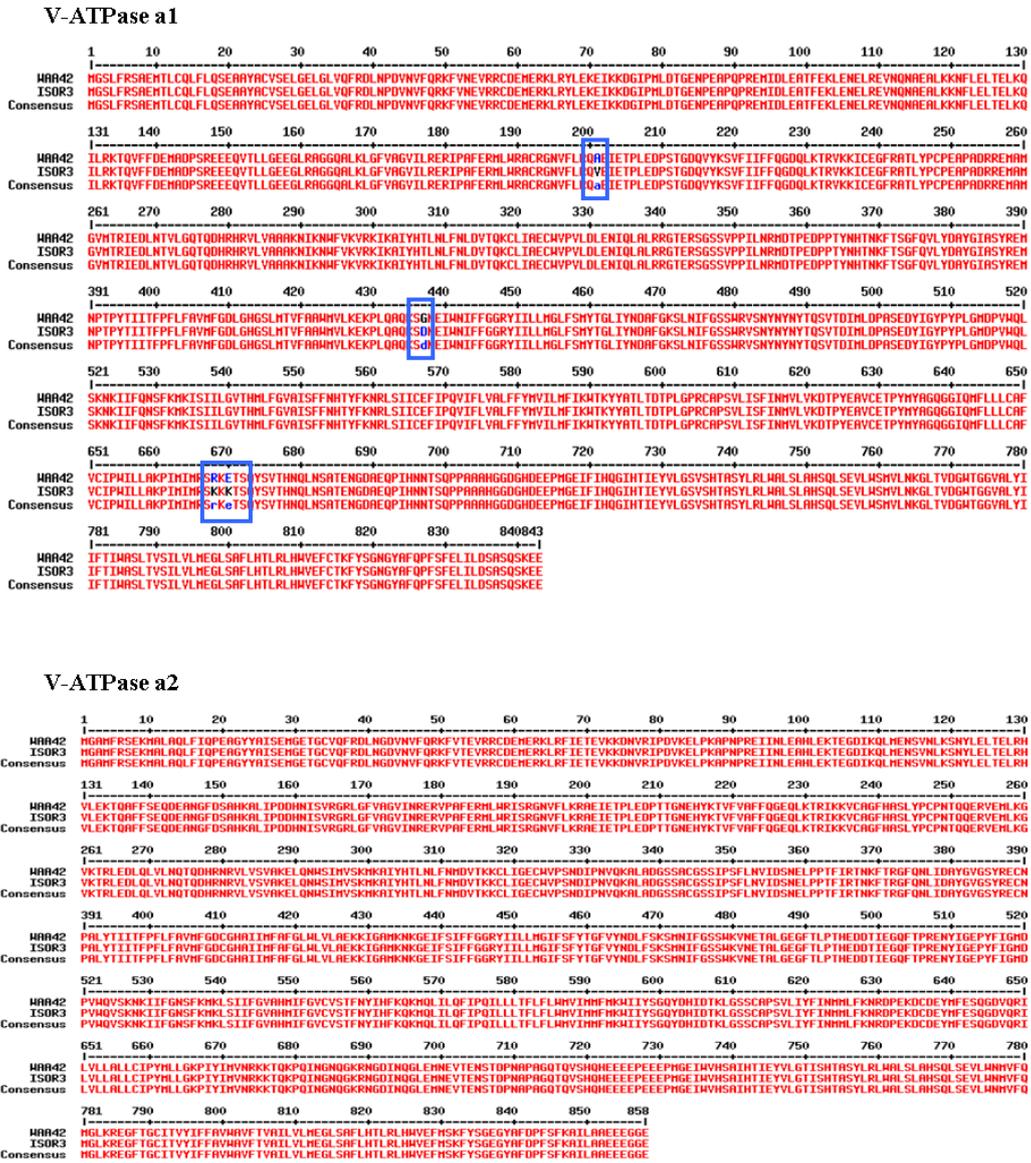


Figure 19 : Alignement des séquences protéiques des isoformes a1 et a2 de V-ATPase issues de charançons sensibles (WAA42) et résistants (IsoR3). L'alignement a été réalisé à l'aide du logiciel multalin. Les différences de séquences protéiques sont entourées d'un carré bleu.

	Acide aminé 201	Acide aminé 437	Acide aminé 668	Acide aminé 670
<i>S. oryzae</i> souche WAA42 (sensible)	A	G	R	E
<i>S. oryzae</i> souche Bouriz (sensible)	A	D	K	E
<i>S. oryzae</i> souche GV (résistant)	A	D	K	E
<i>S. oryzae</i> souche IsoR3 (résistant)	V	D	K	L
<i>S. oryzae</i> souche China (résistant)	A	D	R	E

Tableau n°3 : Comparaison des acides aminés en positions 201, 437, 668 et 670 d'isoformes a1 de la V-ATPase de *S. oryzae* sensibles et résistants à PA1b. Les acides aminés identiques aux souches sensibles (WAA42 et Bouriz) et aux souches résistantes (IsoR3, GV, et China) sont indiqués en blanc.

La souche Bouriz (sensible) et la souche GV (résistante) présentant des acides aminés identiques en position 201, 437, 668 et 670. Aucune des mutations mises en évidence par le séquençage de la sous-unité a1 de V-ATPase de *S. oryzae* n'est spécifique des charançons sensibles ou résistants.

Les sous-unités d et e de la V-ATPase de *S. oryzae* souche sensible (WAA42) et souche résistante (IsoR3) ont été clonées et séquencées. L'alignement de ces séquences protéiques présentées en figure 20 a montré qu'il n'y a aucune variabilité de séquences protéiques pour ces sous-unités entre les charançons sensibles et résistants.

La sous-unité c de V-ATPase de *S. oryzae* a été clonée et séquencée chez les souches sensibles WAA42, Bouriz, et Bénin et chez les souches résistantes IsoR3, Chine, GV et Mex1. L'alignement des séquences protéiques (figure 21) permet de mettre en évidence la présence de trois différences (Ser 83 Asn ; Tyr 157 Phe et Ala 158 Thr) spécifiques des souches sensibles et résistantes analysées.

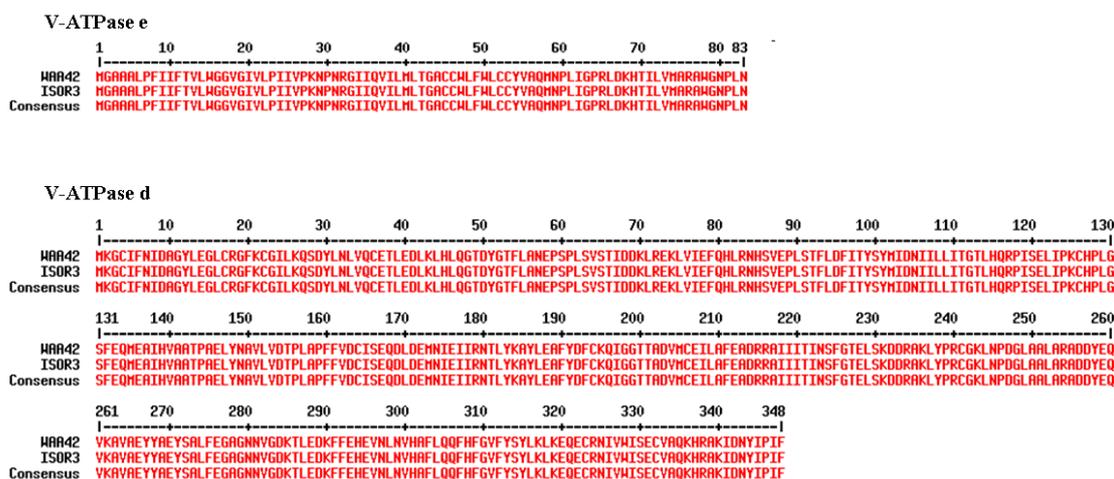


Figure 20 : Alignement des séquences protéiques des sous-unités d et e de V-ATPase issues de charançons sensible (WAA42) et résistant (IsoR3). L'alignement a été réalisé à l'aide du logiciel multalin.

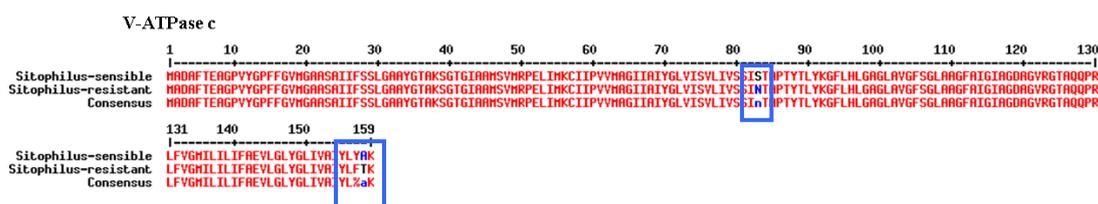


Figure 21 : Alignement des séquences protéiques des sous-unités c de V-ATPase issues de charançons sensible et résistants. « *Sitophilus* sensible » représente les séquences (identiques) des souches WAA42, Bouriz et Bé-nin. La séquence « *Sitophilus* résistant » représente les séquences des souches IsoR3, GV, Chine, et Mex1. L'alignement a été réalisé à l'aide du logiciel multalin. Les différences de séquences sont encadrées par un rectangle bleu.

1.2.3 Recherche de sous-unités c' et c'' de la V-ATPase et de la protéine Ac45 chez *S. oryzae*

Le complexe Vo de la V-ATPase de *Manduca sexta* a été défini comme ne comportant qu'une seule isoforme de la sous-unité c, alors que trois formes sont retrouvées chez la levure (c, c', et c''). La protéine Ac45 est liée au complexe Vo chez le bœuf. Elle a été identifiée chez *Drosophila melanogaster*, mais pas chez *M sexta*. L'existence d'une autre forme de sous-unité c et de la protéine Ac45 a donc été recherché chez *S. oryzae*. La

sous-unité c' de *S. cerevisiae* (numéro d'accèsion GenBank NM_001184048), la sous-unité c'' de *S. cerevisiae* (numéro d'accèsion GenBank NM_001179156) et la protéine Ac45 de *D. melanogaster* (numéro d'accèsion GenBank: AE003834) ont été utilisées pour rechercher des homologues potentiels dans une banque EST de *S. oryzae* [PAUCHET '10]. Aucune séquence homologue de c' n'a été identifiée dans la banque d'EST de *S. oryzae*. Une séquence homologue de c'' a été identifiée (*Sor-zae_assembly_genbank.accurate._1rc361*). Cette séquence a été clonée et séquencée à partir de l'ADNc de *S. oryzae* sensible (WAA42) et résistant (IsoR3). L'alignement de ces séquences est présenté en figure 22. Aucune différence n'est observée entre les séquences protéiques traduites des gènes des charançons de souche WAA42 et de souche IsoR3.

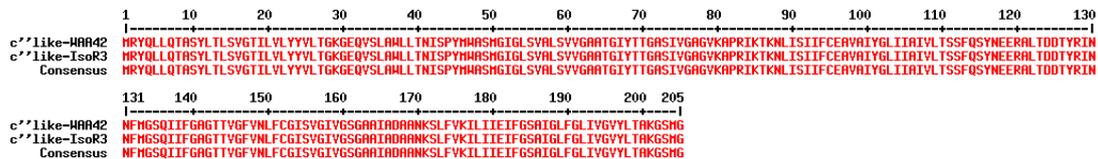


Figure 22 : Alignement des séquences protéiques des sous-unités c''-like de V-ATPase issues de *S. oryzae* sensible (c'' like-WAA42) et résistant (c'' like-IsoR3). L'alignement a été réalisé à l'aide du logiciel multalin.

Une séquence homologue à la séquence codante pour la protéine Ac45 de *D. melanogaster* (numéro d'accèsion NP_610470.1) a été identifiée, clonée et séquencée à partir de l'ADNc de *S. oryzae* sensible (WAA42) et résistant (IsoR3). L'alignement de ces séquences est présenté en figure 25. Une différence de séquence protéique est observée entre les séquences protéiques issues des charançons de souche WAA42, et de souche IsoR3, en position 218 une thréonine est remplacée par une lysine.

Cette séquence a également été clonée et séquencée à partir de l'ADNc de *S. oryzae* souche GV (résistante). En position 218, la séquence de GV présente une thréonine, tout comme la souche sensible WAA42. Cette différence de séquence n'est pas spécifique à un phénotype, elle ne peut donc pas expliquer la différence de liaison de PA1b entre le charançon sensible et résistant.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Ac45like-HA042	MAGTKSTSDPVPALHKLSONSFKDYISDVLKSNPTVYLFVEQSLSPEDFGQRDLGNSPFNYLSKARKSSKYTYLPYVQNPDKAIRHSSSEDFVETSIEQLTDDVEIPDSKVIIVALNDARDNEQRFDLLK													
Ac45like-IsoR3	MAGTKSTSDPVPALHKLSONSFKDYISDVLKSNPTVYLFVEQSLSPEDFGQRDLGNSPFNYLSKARKSSKYTYLPYVQNPDKAIRHSSSEDFVETSIEQLTDDVEIPDSKVIIVALNDARDNEQRFDLLK													
Consensus	MAGTKSTSDPVPALHKLSONSFKDYISDVLKSNPTVYLFVEQSLSPEDFGQRDLGNSPFNYLSKARKSSKYTYLPYVQNPDKAIRHSSSEDFVETSIEQLTDDVEIPDSKVIIVALNDARDNEQRFDLLK													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
Ac45like-HA042	RHDSFIASVYKPLKDDSNVLAFTYAHARASHIGSGEIHRSKRALLFASDEQSPNQYFSESIFFYTSGNRMVTLNANNVETVALSYETN TDSVVLGAAANTSNIQFSLDFLKSSTGYHYIQSVMLTVNN													
Ac45like-IsoR3	RHDSFIASVYKPLKDDSNVLAFTYAHARASHIGSGEIHRSKRALLFASDEQSPNQYFSESIFFYTSGNRMVTLNANNVETVALSYEKN TDSVVLGAAANTSNIQFSLDFLKSSTGYHYIQSVMLTVNN													
Consensus	RHDSFIASVYKPLKDDSNVLAFTYAHARASHIGSGEIHRSKRALLFASDEQSPNQYFSESIFFYTSGNRMVTLNANNVETVALSYEKN TDSVVLGAAANTSNIQFSLDFLKSSTGYHYIQSVMLTVNN													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	373	
Ac45like-HA042	TLTQFNINGSIYAPFRFSYACGDQTFGNATAGITLPGFQVQPVFLSTIFTKQGFDDPYNVYVGFITIPINSGLFVTFILMIHISGLTHAMDIKTHORFDRAKSKTITINVSE													
Ac45like-IsoR3	TLTQFNINGSIYAPFRFSYACGDQTFGNATAGITLPGFQVQPVFLSTIFTKQGFDDPYNVYVGFITIPINSGLFVTFILMIHISGLTHAMDIKTHORFDRAKSKTITINVSE													
Consensus	TLTQFNINGSIYAPFRFSYACGDQTFGNATAGITLPGFQVQPVFLSTIFTKQGFDDPYNVYVGFITIPINSGLFVTFILMIHISGLTHAMDIKTHORFDRAKSKTITINVSE													

Figure 23 : Alignement des séquences protéiques des sous-unités Ac45-like de V-ATPase issues de *S. oryzae* sensible et résistant. Les différences de séquences sont entourées d'un rectangle bleu. L'alignement a été réalisé à l'aide du logiciel multalin

1.2.4 Comparaison des sous-unités du complexe Vo de la V-ATPase de *S. oryzae* avec celles correspondantes d'autres organismes

Nous avons recherché dans les bases de données les séquences avec la séquence protéique des sous-unités a1, a2, c, c', d, e, et Ac45 de la V-ATPase chez d'autres organismes. A l'aide du logiciel Clustal Omega, l'identité entre chacune de ces séquences et celle de *S. oryzae* a été déterminée. Les résultats sont présentés dans le tableau n°4 et ils montrent que la sous-unité c de la V-ATPase est une protéine très conservée, dans l'ordre des insectes, mais également, au sein des autres organismes testés. En effet la sous-unité c de la V-ATPase de *S. oryzae* présente une identité de 76% avec la sous-unité humaine correspondante, qui fait partie d'un autre embranchement, et de 72%, avec celle de la levure *S. cerevisiae* qui fait partie d'un autre règne. La sous-unité d de la V-ATPase de *S. oryzae* est également très conservée au sein du règne animal puisqu'elle présente un pourcentage d'identité supérieur à 75% chez les espèces animales testées. Les sous-unités a1, a2, c' et e de *S. oryzae*, présentent des pourcentages d'identité avec les espèces testées beaucoup moins importants. Ac45 est la protéine qui présente le moins d'identité de séquence entre celle de *S. oryzae* et celle des espèces testées. De plus cette protéine n'est pas présente chez *S. cerevisiae*, et nous n'avons pas pu trouver de séquence correspondante chez l'araignée *Ixodes scapularis*.

Tableau n°4 : Pourcentage d'identité entre les sous-unités a1, a2, c, c'', d, e et Ac45 de la V-ATPase de *S. oryzae* et celles d'autres organismes. Le calcul d'identité est réalisé par le logiciel Clustal Omega. * : aucune séquence protéique correspondante n'a pu être identifiée dans les bases de données. ** : la protéine Ac45 n'existe pas chez *S. cerevisiae*.

1.2.5 Complémentation fonctionnelle de *S. cerevisiae* par les sous-unités c, d et e de la V-ATPase de *S. oryzae*

Espèce	Classification	a1	a2	c	c''	d	e	Ac45
<i>Tribolium castaneum</i>	Classe : insecte Ordre : Coléoptère	86.04	76.52	85.53	65.85	94.54	90.39	30.96
<i>Drosophila melanogaster</i>	Classe : insecte Ordre : Diptère	75.66	67.76	83.02	66.34	89.08	61.73	21.66
<i>Ixodes scapularis</i>	Classe : arachnide	51.60	54.00	75.64	63.64	77.01	49.37	*
<i>Homo sapiens</i>	Vertébrés	64.53	54.80	76.77	54.00	78.45	40.74	15.62
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nématodes	59.55	50.00	65.41	53.17	76.72	39.76	10.68
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Règne : champignon	39.76	35.66	72.0	53.50	48.39	19.18	**

Il existe des souches de levure *S. cerevisiae* déficientes pour les sous-unités a, c, d et e de la V-ATPase. La complémentation fonctionnelle de ces différentes souches de levures par les sous-unités c, d et e de *S. oryzae* a été envisagée.

Après insertion par PCR des sites de restriction BamHI et XhoI en 5' et 3' des séquences codant les sous-unités c, d et e de la V-ATPase de *S. oryzae*, chaque séquence est insérée dans le vecteur d'expression de levure pYES2 par couper /coller enzymatique (Figure 24). Le gène *VMA3* (gène de la sous-unité c de la V-ATPase de levure) est également cloné à partir de la souche BY4741 (souche non mutée) afin de servir de témoin positif pour cette expérimentation, et est inséré dans le vecteur d'expression pYES2 de la même façon que précédemment. L'insertion correcte des cDNAs dans le vecteur d'expression est vérifiée par séquençage.

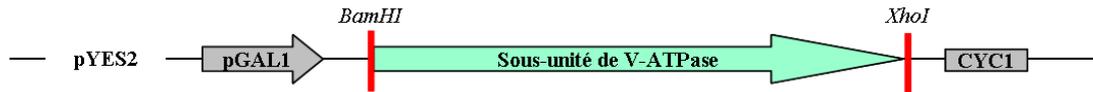


Figure 24 : Insertion du cDNA de *S. oryzae* dans le vecteur pYES2.

Les ADNc des sous-unités c, d ou e de la V-ATPase de *S. oryzae*, ou de la sous-unité c de *S. cerevisiae* (en vert) sont insérés dans le vecteur d'expression pYES2, sous le contrôle du promoteur inducible pGAL1 et du terminateur CYC1, au niveau des sites de restriction BamHI et XhoI (indiqués en rouge).

Les levures déficientes pour une des sous-unités de la V-ATPase sont incapables de pousser à une température de 37°C ou à un pH de 7,5. La complémentation de la V-ATPase de *S. cerevisiae* doit entraîner une restauration de sa fonctionnalité et donc la capacité à pousser en conditions extrêmes (pH et température élevés).

Les vecteurs pYES2-V-ATPase-c-WAA42, pYES2-V-ATPase-c-IsoR3 et pYES2-VMA3 sont insérés dans *S. cerevisiae* YEL027w, une souche déficiente pour le gène *VMA3*. La complémentation de la souche *S. cerevisiae* YEL027w transformée par ces différents vecteurs d'expression a été définie par comparaison de leur croissance en milieu à pH 7,5 et à pH 5,5 avec la souche *S. cerevisiae* non transformée, pendant cinq jours après la mise en culture (figure 25).

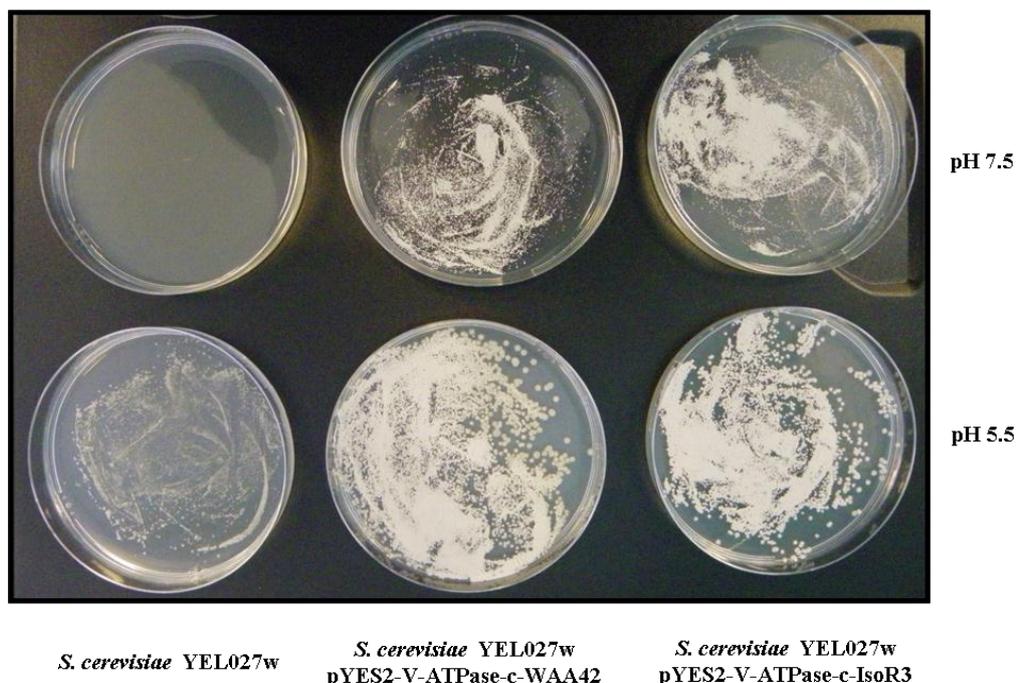


Figure 25 : Test de complémentation fonctionnelle de *S. cerevisiae* YEL027w par les sous-unités c de *S. orizea* sensible (WAA42) ou résistant (IsoR3) à PA1b. La souche *S. cerevisiae* YEL027w, non transformée, transformée par le vecteur pYES2-V-ATPase-c-WAA42 ou pYES2-V-ATPase-c-ISO3 est mise à pousser sur milieu inductif solide à pH5,5 ou 7,5. La croissance est évaluée cinq jours après la mise en culture.

Les résultats présentés sur la Figure 25 montrent qu'en milieu acide (pH 5,5), la souche *S. cerevisiae* YEL027w présente une croissance plus faible que la même souche transformée par les vecteurs pYES2-V-ATPase-c-WAA42 ou pYES2-V-ATPase-c-IsoR3. En milieu basique, la souche *S. cerevisiae* YEL027w non transformée ne présente aucune croissance alors que les deux souches transformées par pYES2-V-ATPase-c-WAA42 et pYES2-V-ATPase-c-IsoR3 présentent une croissance ralentie. La sous-unité c de V-ATPase de charançon permet une complémentation fonctionnelle du gène *VMA3* chez *S. cerevisiae* YEL027w.

Le manque de reproductibilité de la complémentation fonctionnelle en fonction du pH nous a conduit à réaliser un test de complémentation fonctionnelle dans des conditions de haute température. La complémentation de la souche *S. cerevisiae* YEL027w transformée par les vecteurs pYES2-V-ATPase-c-WAA42 ou pYES2-V-ATPase-c-IsoR3, est définie par comparaison de leur croissance à température élevée (37°C)

avec la souche *S. cerevisiae* YEL027w pYES2-V-ATPase-VMA3. Les résultats sont présentés en figure 26.

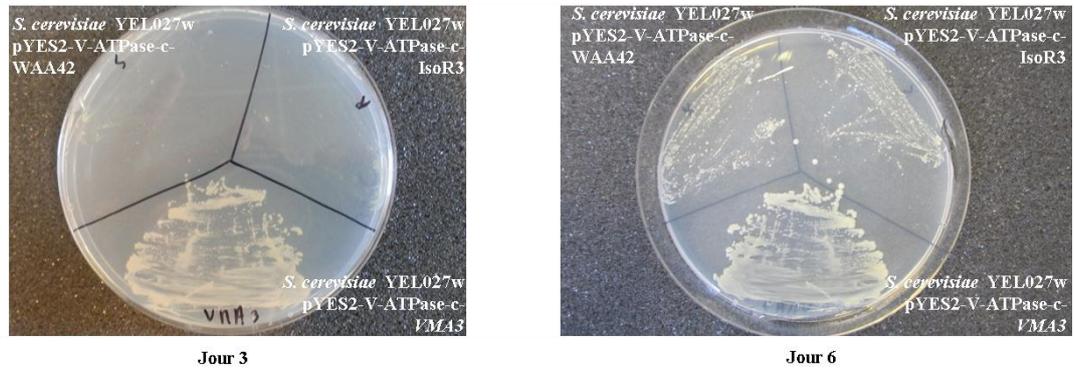


Figure 26 : Test de complémentation fonctionnelle de *S. cerevisiae* YEL027w par les sous-unités c de *S. oryzae* sensible (WAA42) ou résistant (IsoR3) à PA1b ou par la sous-unité c de *S. cerevisiae*. La souche *S. cerevisiae* YEL027w transformée avec le vecteur pYES2-V-ATPase-c-WAA42, pYES2-V-ATPase-c-ISO3, ou pYES2-V-ATPase-c-VMA3 sont mises à pousser sur milieu inductif solide à 37°C. La croissance est évaluée six jours après la mise en culture.

Au troisième jour après la mise en culture sur milieu inductif, la souche *S. cerevisiae* YEL027w transformée par le vecteur d'expression pYES2-V-ATPase-c-VMA3 a eu une croissance beaucoup plus importante que les souches transformées par pYES2-V-ATPase-c-WAA42 ou pYES2-V-ATPase-c-IsoR3 qui n'ont qu'une croissance très faible à peine visible. Au sixième jour après la mise en culture sur milieu inductif, les souches transformées par pYES2-V-ATPase-c-WAA42 ou pYES2-V-ATPase-c-IsoR3 montrent une croissance moindre que celle transformée par pYES2-V-ATPase-c-VMA3. L'expression hétérologue de la V-ATPase c de *S. cerevisiae* permet la complémentation fonctionnelle de la V-ATPase puisque l'on observe une restauration de fonction de la V-ATPase. L'expression hétérologue de la V-ATPase c de *S. oryzae*, sensible ou résistant, permet une complémentation partielle chez *S. cerevisiae* déficiente pour cette sous-unité.

La restauration de la fonction V-ATPase de *S. cerevisiae* par les sous-unités c de *S. oryzae* sensible et résistant, nous informe que la sous-

unité c de charançon produite par expression hétérologue en levure est capable de s'insérer dans le complexe Vo de V-ATPase de levure et de fonctionner avec les autres sous-unités du complexe.

Le vecteur d'expression pYES2-V-ATPase-d, est inséré dans *S. cerevisiae* YLR44c, une souche déficiente pour le gène *VMA6* (sous-unité d de V-ATPase de levure). Le vecteur d'expression pYES2-V-ATPase-e est inséré dans *S. cerevisiae* YCL005w (*Saccharomyces* genome database, numéro d'accèsion Y03413), une souche déficiente pour le gène *VMA9* (sous-unité e de V-ATPase de levure).

La complémentation des souches de *S. cerevisiae* transformées est définie par comparaison de leur croissance en milieu à pH 7,5 et à pH 5,5 ou à 27° et 37°C avec les souches de *S. cerevisiae* non transformées correspondantes. En milieu acide, ou à 27°C les souches de levure déficientes transformées ou non transformées par le vecteur pYES2-V-ATPase-d présentent une croissance identique. En revanche au bout de cinq jours, la souche transformée par le vecteur pYES2-V-ATPase-d présente une croissance beaucoup plus importante que la souche déficiente. L'expression hétérologue de la sous-unité d de la V-ATPase de *S. oryzae*, permet une complémentation chez *S. cerevisiae* déficiente pour cette sous-unité. La sous-unité d de V-ATPase de charançon permet donc une complémentation fonctionnelle du gène *VMA6* chez *S. cerevisiae* YLR44c.

Aucune complémentation fonctionnelle n'a pu être observée dans les levures exprimant la sous-unité e de la V-ATPase de *S. oryzae*. En effet les levures déficientes pour l'expression de cette sous-unité n'ont pas présenté de phénotype de croissance altérée pour les conditions testées, nous n'avons donc pas pu déterminer s'il y avait bien restauration du phénotype sauvage, et donc complémentation fonctionnelle par la sous-unité e de la V-ATPase de charançon.

1.2.6 Sensibilité à la toxine des levures complémentées par les sous-unités c, d et e du complexe Vo de la V-ATPase de *S. oryzae*.

Afin de vérifier si la présence d'une des sous-unités c, d ou e de *S. oryzae* dans la V-ATPase de levure affecte sa sensibilité à PA1b, des tests de toxicité à PA1b ont été réalisés.

Les différentes souches transformées sont mises en culture sur milieu inductif à 37°C, en présence ou en absence de PA1b (1 ml à 1 mg.ml⁻¹ étalé par boîte de Petri) (figure 27).

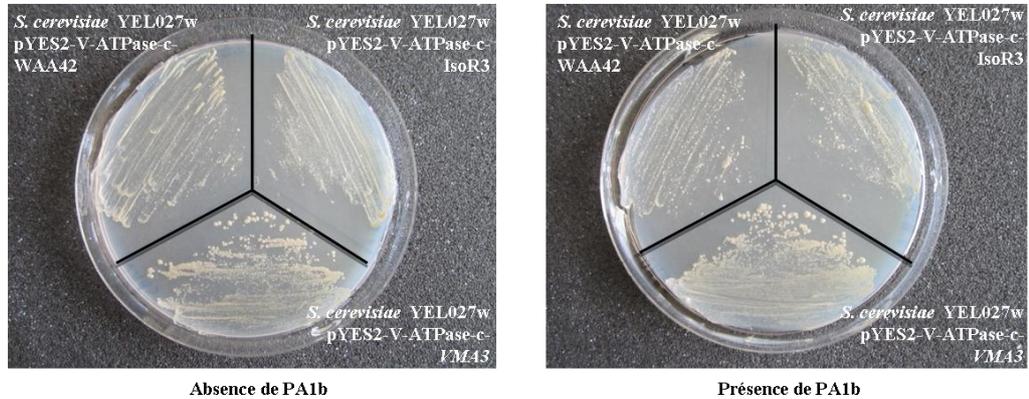


Figure 27 : Test de toxicité à PA1b de *S. cerevisiae* YEL027w exprimant les sous-unités c de *S. oryzae* sensible (WAA42) ou résistant (IsoR3) ou par la sous-unité c de *S. cerevisiae*. La souche *S. cerevisiae* YEL027w transformée par le vecteur d'expression pYES2-V-ATPase-c-WAA42, pYES2-V-ATPase-c-ISOR3, ou pYES2-V-ATPase-c-VMA3 est mise en culture sur milieu inductif solide à 37°C, en présence (photo de droite) ou en absence (photo de gauche) de PA1b (1 ml à 1 mg ml⁻¹ par boîte de Petrie). La croissance est évaluée cinq jours après la mise en culture.

Cinq jours après la mise en culture, on ne constate aucune différence de croissance entre les levures exprimant les cDNAs des sous-unités c, d ou e de la V-ATPase de *S. oryzae* ayant poussé en présence ou en absence de PA1b. PA1b ne présente donc aucune toxicité à la concentration testée pour les V-ATPase de levure comportant ou non ces sous-unités.

Des tests de liaison à PA1b I¹²⁵ sont réalisés sur des extraits membranaires (fractions sédimentant à 3 000 g, 10 000 g et 45 000g), de *S. cerevisiae* non transformée, ou transformée avec les différents vecteurs d'expressions. Aucune activité spécifique de liaison n'a pu être montrée dans aucune des fractions protéiques testées, et ce pour les levures transformées par les cDNAs des trois sous-unités de la V-ATPase de charançon.

Tableau n°5 : Complémentation fonctionnelle de *S. cerevisiae* déficientes pour les sous-unités c, d ou e de la V-ATPase, et résultats du test de liaison à PA1b.

Vecteurs	Souche <i>S. cerevisiae</i>	Complémentation fonctionnelle	Sensibilité à PA1b	Liaison à PA1b
pYESS2-V-ATPase-c-WAA42	YEL027w (délétion de la sous-unité c de V-ATPase)	oui	non	non
pYES2-V-ATPase-c-IsoR3	YEL027w (délétion de la sous-unité c de V-ATPase)	oui	non	non
pYES2-V-ATPase-VMA3	YEL027w (délétion de la sous-unité c de V-ATPase)	oui	non	non
pYES-2-V-ATPase-e	YLR447c (délétion de la sous-unité e de V-ATPase)	non	non	non
Yes2-V-ATPase-d	YCL005w (délétion de la sous-unité d de V-ATPase)	oui	non	non

1.3 Discussion

Chez les mammifères le récepteur à PA1b est un canal ionique nommé VDAC [DUN '08]. Cette protéine est également retrouvée chez les insectes, il est donc envisageable qu'elle puisse être le récepteur à PA1b chez ceux-ci. Le clonage de la séquence codant pour cette protéine chez *S. oryzae* sensible à PA1b (WAA42), et de sa lignée quasi isogénique résistante (IsoR3) n'a pas permis de mettre en évidence une différence de séquence pouvant potentiellement expliquer la différence de liaison de PA1b entre le charançon sensible et résistant, ce qui montrerait que cette protéine n'est pas le récepteur à PA1b chez l'insecte.

Le complexe Vo de la V-ATPase a été identifié comme récepteur à PA1b chez l'insecte [CHOUABE '11]. L'identification de la ou des sous-unité(s) du complexe Vo réceptrice(s) à PA1b est une étape primordiale pour la compréhension du mécanisme de sensibilité/résistance chez l'insecte. Une différence de séquence protéique entre les sous-unités du complexe Vo de la V-ATPase de *S. oryzae* sensible et résistant pourrait

expliquer la différence de liaison de PA1b sur ce complexe. Chez *M. sexta*, seules quatre sous-unités sont connues pour former le complexe Vo : a, c, d et e. L'analyse des V-ATPases chez d'autres organismes a permis de révéler l'existence d'autres sous-unités : les sous-unités c' et c'' découvertes chez la levure, et la protéine Ac45 identifiée chez *Bos Taurus* et par la suite chez *D. melanogaster*. Des homologues de ces séquences ont été recherchés sur une banque EST de *S. oryzae* ce qui a permis de mettre en évidence l'existence d'une sous-unité c''-like de la V-ATPase et de la protéine Ac45-like. Les séquences codantes pour les sous-unités a, c, d, e et Ac45-like ont été clonées chez une souche de *S. oryzae* sensible (WAA42) et sur sa lignée quasi isogénique résistante (IsoR3). Les résultats ont révélés que les sous-unités a2, d, e, c''-like, et Ac45-like ont une séquence protéique identique chez *S. oryzae* WAA42 et IsoR3, une différence de ces séquences n'est donc pas impliquée directement dans l'absence de liaison de PA1b chez *S. oryzae* résistant. L'isoforme a1 présente quatre acides aminés différents entre les souches WAA42 et IsoR3 (Ala 201 Val ; Gly 437 Asp ; Arg 668 Lys et Glu 670 Lys), mais la souche Bouriz, sensible à PA1b et la souche résistante GV présentent les mêmes acides aminés, ce qui montre que ces mutations ne sont pas spécifiques de la sensibilité ou de la résistance à PA1b.

La comparaison des séquences protéiques de la sous-unité c de la V-ATPase de *S. oryzae* WAA42 et IsoR3 a montré trois différences d'acide aminé (Ser 83 Asp; Tyr 157 Phe et Ala 158 Thr). L'analyse de séquence de cette sous-unité dans d'autres souches de *S. oryzae*, (Bouriz et Bénin qui sont des souches sensibles, et GV, Chine et Mex1, qui sont des souches résistantes) montre que pour les séquences étudiées, les acides aminés présents en position 83, 157 et 158 sont spécifiques d'un phénotype sensible ou résistant. PA1b agissant à l'extérieur des cellules, seules les parties extracellulaires de cette protéine peuvent être la cible de PA1b. Lorsqu'on regarde une modélisation de cette protéine chez *M. sexta* (figure 28) on s'aperçoit que les trois acides aminés qui diffèrent entre les souches sensibles et résistantes de *S. oryzae* sont situés sur la partie extracellulaire, là où PA1b peut potentiellement agir.

Toutefois, il semble que les positions 157 et 158 soient peu importantes pour le maintien du caractère sensible de l'insecte. En position 157, une tyrosine, un acide aminé aromatique, est remplacée chez l'insecte résistant par un autre acide aminé aromatique, la phénylalanine. Ce chan-

gement d'acide aminé entraîne très peu de changement de propriété de la protéine, et n'est donc probablement pas impliqué dans l'interaction avec PA1b. En position 158, la sous-unité c de la V-ATPase de la souche résistante de *S. oryzae* présente une thréonine, tout comme chez la plupart des insectes, dont *M. sexta*, dont la V-ATPase est sensible à PA1b. Seule la différence d'acide aminé en position 83 peut donc potentiellement être responsable du caractère sensible ou résistant chez *S. oryzae*.

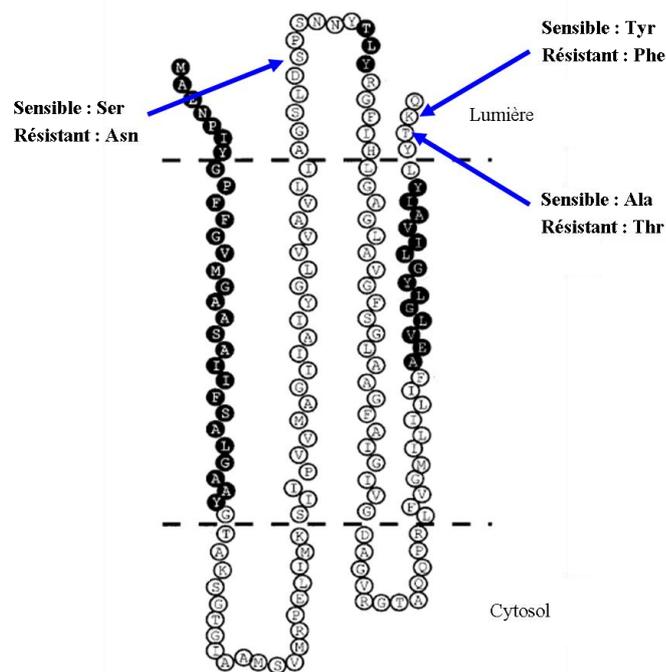


Figure 28 : Structure secondaire putative de la sous-unité c de la V-ATPase de *M. sexta* [WIECZOREK '03]. La position des acides aminés spécifiques des phénotypes sensible/résistant chez *S. oryzae* est pointée d'une flèche bleue.

Ces résultats nous ont conduit à fortement suspecter la sous-unité c de la V-ATPase comme étant le récepteur à PA1b chez l'insecte. Chez la levure, la V-ATPase n'est pas essentielle à la vie [PERZOV '01], et il existe des souches de *S. cerevisiae* déficientes pour chacune des sous-unités de la V-ATPase. Afin de vérifier si la sous-unité c de la V-ATPase

est le récepteur à PA1b chez l'insecte, nous avons exprimé dans une souche de *S. cerevisiae* déficiente pour cette sous-unité, les sous-unités c sensible et résistante de *S. oryzae*. Cette expérimentation a déjà été réalisée avec succès en complétant cette souche de *S. cerevisiae* par la sous-unité c de la V-ATPase de *D. melanogaster* [FINBOW '94]. La restauration de la capacité de la levure déficiente à se développer dans des conditions non optimales (37°C ou à pH 7,5) prouve que la sous-unité c de la V-ATPase de *S. oryzae* souche WAA42 ou IsoR3 peut compléter, au moins partiellement la déficience du gène *VMA3* (gène codant la sous-unité c de la V-ATPase de *S. cerevisiae*). La sous-unité c de la V-ATPase de charançon est donc bien produite par la levure et de manière fonctionnelle puisqu'elle peut intégrer et fonctionner avec les autres sous-unités du complexe V_o de la V-ATPase de *S. cerevisiae*. La présence de PA1b dans le milieu de culture à une dose relativement élevée (1 ml à 1 mg.ml⁻¹ par boîte de Petri) n'affecte en rien la croissance de ces levures, qu'elles soient complétées par la sous-unité c de la V-ATPase sensible ou résistante à PA1b. De plus, aucune activité de liaison à PA1b-I¹²⁵ n'est détectable chez les levures transformées. Ces résultats montrent que la présence de la sous-unité c de la V-ATPase n'est pas suffisante pour que PA1b se lie à son récepteur, mais ils ne permettent pas de rejeter l'hypothèse selon laquelle la sous-unité c de la V-ATPase est impliquée dans la perception de PA1b. La plupart des inhibiteurs connus de la V-ATPase, tels que la bafylomicine ou l'apicularen ne se fixent pas sur une, mais sur deux sous-unités du complexe V_o de la V-ATPase [OSTERESCH '12].

L'identification de la sous-unité de la V-ATPase réceptrice de PA1b chez l'insecte a également été entreprise par d'autres méthodes, en collaboration avec Stephen Muench (Univ. Leeds, GB), et Markus Huss (Univ. Osnabrueck, All). La liaison de PA1b-biotinylé avec le complexe V-ATPase de *M. sexta* a pu être visualisée par cryo-microscopie électronique (figure 29). Les résultats ont montré que la protéine PA1b semble se lier sur le complexe V_o de la V-ATPase, et plus particulièrement sur l'anneau de sous-unité c, du côté extracellulaire et à l'opposé de la sous-unité a. Les sous-unités a et d semblent donc exclues du site de perception de PA1b. Cependant, l'anneau rotatif serait constitué de 10 sous-unités c alors qu'une seule molécule de PA1b se fixe sur cet anneau. De plus ces résultats sont en contradiction avec l'absence de liaison de PA1b sur les

levures complémentées par la sous-unité c de la V-ATPase de *S. oryzae* sensible à PA1b.

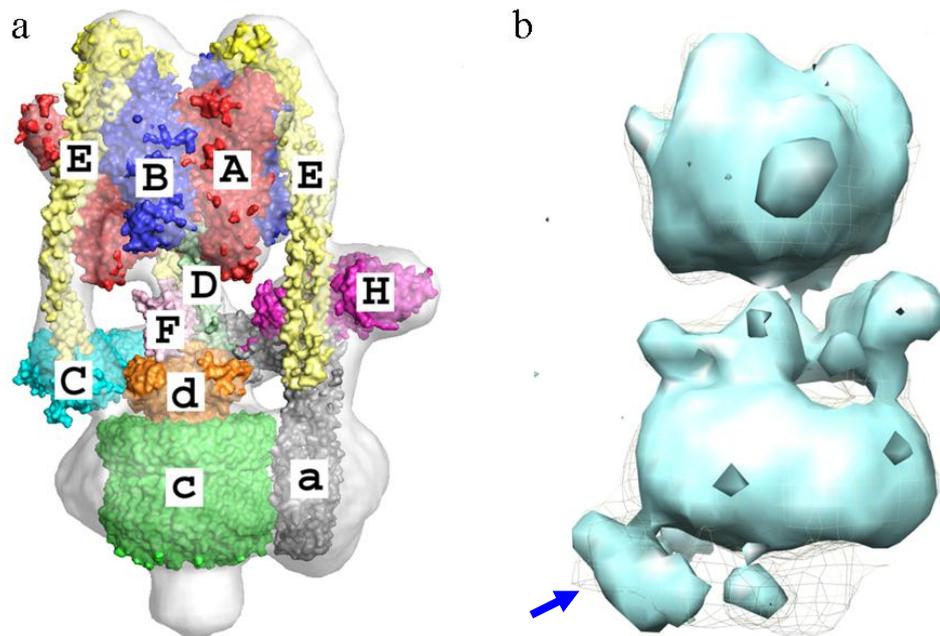


Figure 29 : Visualisation de la liaison PA1b-V-ATPase par cryo-microscopie électronique. a. Reconstruction de la V-ATPase de *M. sexta* par microscopie électronique. La position des différentes sous-unités de V-ATPase est indiquée en couleurs. b. Représentation de la liaison de la V-ATPase de *M. sexta* avec la protéine PA1b, dans la même orientation que a. La protéine PA1b biotinylée est repérée grâce à sa liaison à la streptavidine. L'ensemble est pointé d'une flèche bleue sur la représentation. (D'après [MUENCH '14]).

Afin de déterminer si la sous-unité c de la V-ATPase est bien réceptrice de PA1b, des expériences de marquage par photo-affinité ont été réalisées. Le complexe de la V-ATPase a été purifié à partir d'intestin de *M. sexta*, et a été marqué à l'aide d'un PA1b comportant un groupement benzophénone (sur la Met12, ce qui ne modifie pas les capacités de liaison de la protéine) ainsi qu'un marquage à l'iode 125. L'irradiation aux rayons UV induit la liaison covalente de PA1b-benzophénone avec la ou les protéines les plus proches. Les différentes sous-unités de la V-ATPase sont ensuite séparées par SDS-PAGE, et PA1b-I¹²⁵ est détecté par autora-

diographie. Les résultats sont présentés en figure 30 et ils permettent de montrer qu'une bande radioactive est détectable dans la zone de migration de la sous-unité e de la V-ATPase. Cette sous-unité est donc probablement impliquée dans la perception de PA1b.

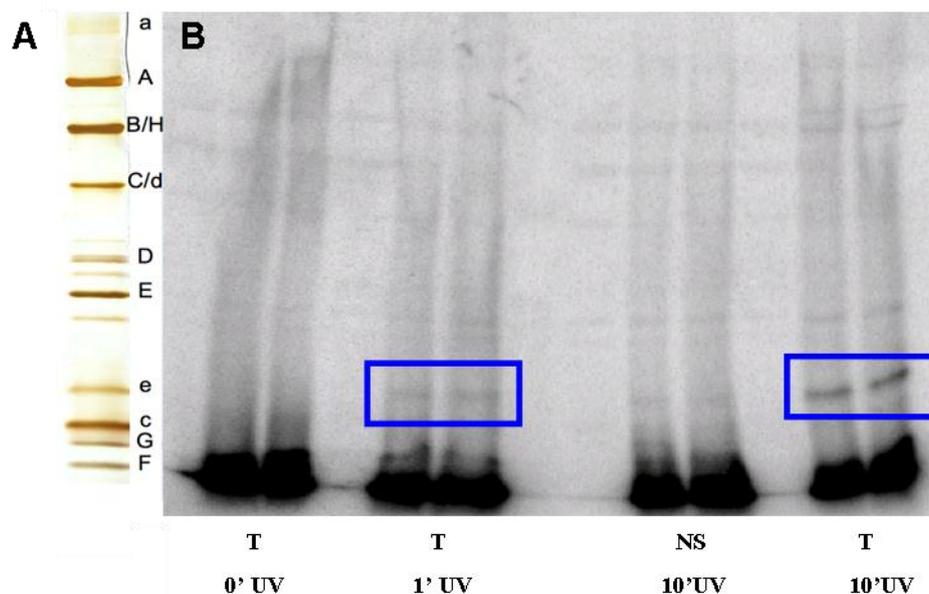


Figure 30 : Identification de la sous-unité de la V-ATPase réceptrice de PA1b par photo-affinité et marquage radioactif. A. Gel SDS-PAGE coloré à l'argent, montrant la zone de migration des différentes sous-unités du complexe V-ATPasique de *M. sexta*. B. PA1b-benzophénone radiomarqué à l'iode 125 est incubé en présence de la V-ATPase purifiée de *M. sexta*. Après exposition aux UV pendant 0, 1 ou 10 minutes du mélange, les protéines composant le complexe V-ATPase sont séparées sur un gel SDS-PAGE. La présence de PA1b-I125 est détectée par autoradiographie et les bandes spécifiquement marquées sont encadrées en bleu). T : marquage total, NS : marquage non spécifique. D'après [MUENCH '14].

Ces expériences ont permis de montrer l'importance de la sous-unité e de la V-ATPase dans la liaison de PA1b sur le complexe Vo. Pourtant le séquençage de cette sous-unité chez *S. oryzae* sensible et résistant n'a montré aucune différence en faveur d'une interaction de PA1b sur cette sous-unité.

La bafilomycine est un inhibiteur de la V-ATPase dont la toxicité a été testée sur les souches de *S. oryzae* sensible (WAA42) et sur sa lignée quasi-isogénique résistante (IsoR3) à PA1b. Les *S. oryzae* sensibles à

PA1b sont sensibles à la bafilomycine (à une dose de 600 µg de bafilomycine par gramme de nourriture), alors que les *S. oryzae* souche IsoR3 sont résistants à cette toxine aux mêmes doses. Cette souche ne devient sensible qu'à des doses très élevées (2000 µg.g⁻¹). La modification impliquée dans la résistance à PA1b de *S. oryzae* IsoR3 induit donc une modification du site d'action ou de l'accès au site d'action de la bafilomycine, bien qu'il soit différent pour ces deux toxines. En effet la liaison de PA1b à son récepteur n'est pas affectée par la présence de bafilomycine (à 10⁻⁵ M) dans le milieu [MUENCH '14], ce qui signifie que PA1b et la bafilomycine ont une cible différente. La bafilomycine est un inhibiteur de V-ATPase agissant sur le complexe Vo, en se liant aux sous-unités a et c de la V-ATPase. Il est envisageable que la sous-unité c de la V-ATPase soit le facteur commun entre PA1b et la bafilomycine. Dans la V-ATPase, les sous-unités c forment un anneau rotatif composé de 6 à 10 protéines identiques chez *M. sexta*. Les deux toxines auraient alors comme site de liaison la sous-unité c, mais sur une position différente, ainsi que la sous-unité a (pour la bafilomycine) et la sous-unité e pour PA1b.

Ces résultats nous ont incités à réaliser l'expression hétérologue de cette sous-unité ainsi que celle des autres sous-unités de la V-ATPase dans des levures déficientes pour ces sous-unités. La complémentation fonctionnelle de *S. cerevisiae* déficiente pour les deux isoformes de sous-unités a, a déjà été testée à l'aide d'une sous-unité homologue humaine et n'a pas permis de restaurer la fonction de la V-ATPase [OSTERESCH '12]. De plus, les résultats obtenus par microscopie électronique nous ont fournis des preuves suffisantes pour conclure que la sous-unité a de la V-ATPase n'était pas le récepteur à PA1b. La protéine Ac45 n'est pas présente chez *S. cerevisiae*, il n'existe donc pas de souche déficiente pour cette protéine. La complémentation fonctionnelle de levures déficientes a donc été réalisée à l'aide des sous-unités e et d de la V-ATPase de *S. oryzae*. Nous avons pu observer la complémentation fonctionnelle de la levure déficiente pour la sous-unité d. En revanche, aucune complémentation de la sous-unité e de levure par sa sous-unité correspondante de *S. oryzae* n'a pu être observée. Une des raisons qui pourrait expliquer cet échec est le manque d'identité entre les sous-unités e de la V-ATPase de *S. cerevisiae* et celle de *S. oryzae*. En effet les sous-unités c et d de la V-ATPase de *S. oryzae* et de *S. cerevisiae* présentent respectivement 72% et

42% d'identité, alors que les sous-unités e de la V-ATPase de *S. oryzae* et de *S. cerevisiae* présentent seulement 19% d'identité.

PA1b n'a montré ni activité toxique ni site de liaison chez les souches de levures exprimant les sous-unités c, d ou e de la V-ATPase de *S. oryzae*. Il est probable que l'absence de capacité de liaison de PA1b sur les extraits membranaires de la souche de levure complétée par la sous-unité c de *S. oryzae* sensible soit due au faible taux d'identité entre les sous-unités e de *S. oryzae* et de *S. cerevisiae*. Même si les sous-unités c de la V-ATPase de *S. oryzae* et de *S. cerevisiae* présentent un taux d'identité important, il persiste certainement une différence ne permettant pas la liaison de PA1b sur les extraits membranaires de la souche de levure complétée par la sous-unité e de *S. oryzae*. En effet, dans l'hypothèse où le récepteur à PA1b chez l'insecte est constitué des sous-unités c et e de la V-ATPase, la présence des deux sous-unités de *S. oryzae* est requise pour la liaison de PA1b dans la levure.

Nous avons regardé la diversité des sous-unités du complexe Vo de la V-ATPase et de la protéine Ac45 chez différents organismes, plus ou moins éloignés phylogénétiquement. La protéine Ac45 est absente chez *S. cerevisiae* et est très peu conservée dans les espèces étudiées. Aucune séquence correspondante n'a pu être identifiée chez l'arachnide *Ixodes scapularis*. Les sous-unités a1, a2 et c'' de la V-ATPase de *S. oryzae* présentent une identité avec leurs sous-unités correspondantes dans d'autres espèces bien moins importante que la sous-unité d de la V-ATPase. Cette sous-unité semble être très conservée au sein du règne animal, puisque sur les espèces testées, le taux d'identité minimum observé avec la sous-unité de *S. oryzae* est de 76%. Nos résultats précédents nous conduisant à penser que le récepteur à PA1b est la sous-unité c et la sous-unité e de la V-ATPase, nous avons donc élargi ce travail à d'autres espèces pour ces deux sous-unités. L'identité entre les sous-unités c de la V-ATPase de *S. oryzae* et d'autres organismes a montré que cette protéine est extrêmement conservée. En effet, au sein de la classe des insectes, un minimum de 82.9% d'identité a été observé entre les sous-unités c de la V-ATPase de *S. oryzae* et celles d'insectes d'ordres différents. La sous-unité c de la V-ATPase d'arachnide, de crustacé ou de vertébrés, présente une identité importante (environ 75%) avec la sous-unité correspondante de *S. oryzae*. *S. cerevisiae* est une espèce qui appartient non pas au règne animal, mais au règne fongique, et sa sous-unité c de la V-ATPase présente un taux

d'identité de 72% avec la sous-unité c de la V-ATPase de *S. oryzae*. Ces résultats montrent que la sous-unité c de la V-ATPase est une protéine très conservée.

La sous-unité e de la V-ATPase de *S. oryzae*, présente une identité de séquence d'un minimum de 61% avec les sous-unités correspondantes des espèces étudiées au sein de la classe des insectes. Ce pourcentage diminue aux alentours des 40% d'identité lorsque l'on compare les sous-unités e de la V-ATPase d'espèces d'autres embranchements comme les crustacés, les mollusques, les nématodes ou les vertébrés, à la sous-unité de *S. oryzae*. Cette identité diminue jusqu'à 19% lorsque l'on compare la sous-unité e de la V-ATPase de *S. oryzae* avec celle de *S. cerevisiae* qui appartient à un autre règne, ce qui permet de conclure que cette sous-unité est beaucoup moins conservée entre les différents organismes que la sous-unité c de la V-ATPase. De plus, pour les conditions testées, *S. cerevisiae* déficiente pour cette sous-unité e de la V-ATPase, ne présente pas un phénotype de croissance altérée dans les conditions testées. Cette sous-unité ne semble donc pas être primordiale pour le fonctionnement du complexe V-ATPasique, et sa séquence tolérerait de grandes variations ce qui pourrait expliquer l'importante variabilité observée entre les organismes. Il a été montré que la sous-unité e de la V-ATPase de *M. sexta* est très glycosylée, contrairement à celle de *Bos taurus* [MERZENDORFER '99]. Nous nous sommes interrogés si la glycosylation de cette sous-unité était caractéristique des insectes. A l'aide d'un logiciel de prédiction de modifications post-traductionnelles, nous avons montré que si *M. sexta* possédait deux sites potentiels de glycosylation, ce n'est pas le cas de *S. oryzae*, *T. castaneum* ou *D. melanogaster*. De plus, les sous-unités e de la V-ATPase de *H. sapiens* et *I. scapularis* possèdent un site potentiel de glycosylation, mais pas celles de *S. cerevisiae* et *C. elegans*. La glycosylation de la sous-unité e de la V-ATPase n'est pas spécifique de l'ordre des insectes, et ne peut donc pas être responsable de la spécificité de PA1b aux insectes.

Partie 3

Chapitre 2

De la liaison de PA1b à la mort des insectes

2.1 Introduction

Le récepteur à PA1b chez l'insecte est le complexe Vo de la V-ATPase (sous-unités e et peut-être c) [CHOUABE '11], une pompe à protons essentielle à la vie des eucaryotes. Chez l'insecte, la V-ATPase est présente au niveau de la bordure en brosse des intestins, et joue un rôle primordial dans l'absorption des nutriments [BEYENBACH '06]. Dans un premier temps, il a été envisagé que l'activité insecticide de PA1b serait due au blocage de la V-ATPase, ce qui empêcherait l'absorption des nutriments et entraînerait donc la mort des insectes par famine, mais cette hypothèse est rejetée en raison du caractère dominant de la sensibilité à PA1b. La raison pour laquelle la liaison de PA1b sur la V-ATPase entraîne la mort chez *Sitophilus oryzae* est encore inconnue.

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un mécanisme essentiel pour la vie des organismes pluricellulaires, qui est très conservé à travers l'évolution. L'apoptose est activée lors de phénomènes tels que l'élimination des cellules surnuméraires lors du développement, ou pour l'élimination de cellules génétiquement endommagées. Une cellule qui entre en apoptose présente des caractéristiques typiques telles que la contraction généralisée du volume et du noyau de la cellule, la perte d'adhérence aux cellules voisines, la formation de cloques sur la surface cellulaire, le découpage de la chromatine en petits fragments puis la phagocytose rapide de la cellule mourante. Les caspases (Cysteiny Aspartate-Specific ProteinASEs) sont des protéines qui sont exprimées dans toutes les cellules sous forme de pro-caspases inactives, jusqu'à réception d'un signal d'apoptose ; par clivage elles deviennent alors actives [COHEN '97, RICHARDSON '02].

Des concentrations nanomolaires d'inhibiteurs de V-ATPases tels que la bafilomycine ou l'apicularen conduisent clairement à l'induction de l'apoptose *via* l'activation des caspases [NAKASHIMA '03, HONG '06]. Par exemple la liaison de l'archazaloïde b sur la V-ATPase induit dans un premier temps un stress énergétique dans la cellule, qui, s'il perdure, conduit à la mort de la cellule par activation du mécanisme d'apoptose [VON SCHWARZENBERG '13].

L'observation de cellules Sf9 par microscopie électronique à transmission (Figure 31) a permis de montrer qu'au bout de 24h d'intoxication par PA1b, un inhibiteur de V-ATPase, induisait des modifications des cellules telles que la perte de sa forme arrondie, la condensation de la chromatine, ou l'apparition de phagosomes, pour finir par la perte de l'intégrité de la membrane et la fuite du cytoplasme dans le milieu [RAHIOUI '07]. Ces différentes modifications des cellules étant caractéristiques des figures d'apoptose [MARTAU '98, MENESES-ACOSTA '01], on peut raisonnablement émettre l'hypothèse selon laquelle l'intoxication par PA1b implique une étape d'apoptose des cellules.

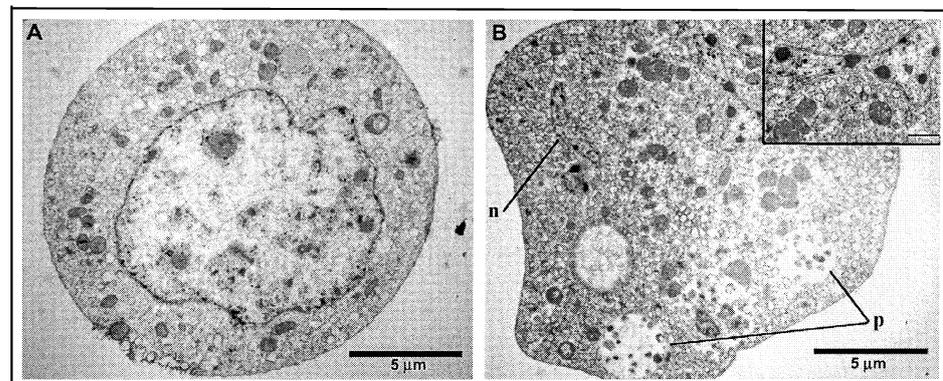


Figure 31 : Morphologie de cellules Sf9 en présence ou absence de PA1b[RAHIOUI '07]. Les cellules sont incubées en présence ou non de PA1b (1 mg.ml^{-1}) pendant 24 h à 27°C . Les cellules sont observées au microscope électronique. (A) Cellule témoin et (B) Cellule intoxiquée par PA1b. Insert: détail du noyau de la cellule intoxiquée. n, nucleus; p, phagosome.

Afin de vérifier si l'interaction de PA1b avec la V-ATPase induit l'apoptose chez les insectes sensibles à PA1b, nous avons utilisé des méthodes d'histologie et de biochimie appliquées à des insectes sensibles à PA1b, mais également sur des insectes résistants (avec ou sans liaison de PA1b).

2.2 Résultats

2.2.1 Analyse biochimique de l'activité caspase-3 dans les intestins d'insectes

Les insectes utilisés pour ces expérimentations sont des charançons *Sitophilus oryzae* souche WAA42, qui ont le récepteur à PA1b et sont sensibles à cette toxine, *S. oryzae* souche IsoR3, qui ne présente pas le récepteur à PA1b, et de ce fait est résistant à cette toxine, et *Tribolium castaneum*, des coléoptères qui ont le récepteur, tout en étant insensibles à la toxine.

Dans un premier temps l'activité de l'enzyme caspase-3 est mesurée dans les intestins de *S. oryzae* WAA42 alimentés pendant 24 heures sur un milieu artificiel, additionné de 10% de farine de pois, ou additionné de PA1b (400 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de nourriture). Les résultats sont présentés dans la figure 32.

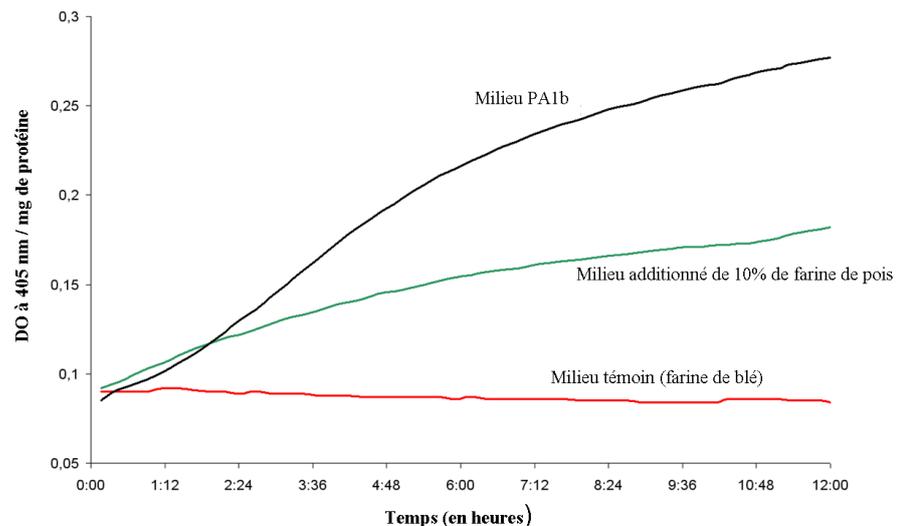


Figure 32 : Mesure de l'activité de la caspase-3 dans les intestins de *S. oryzae* WAA42 intoxiqués par PA1b. Les charançons sont nourris sur un milieu artificiel composé de farine de blé (courbe rouge), additionnée de 10% de farine de pois (courbe verte), ou de PA1b (400 μg par gramme de nourriture, courbe noire). 24 heures après intoxication, l'activité de la caspase-3 est mesurée dans les intestins.

Le DEVD-pNA est un substrat artificiel, qui est reconnu et clivé par la caspase-3 active, ce qui libère dans le milieu le pNA, qui émet à une longueur d'onde de 405 nm. L'augmentation de la DO_{405} lors de l'expérimentation est caractéristique de la présence d'une activité caspase-3. Aucune activité de la caspase-3 n'est mesurée chez *S. oryzae* WAA42 non intoxiqué par PA1b. En revanche on constate une activité de la caspase-3 chez *S. oryzae* WAA42 intoxiqué avec 10% de farine de pois. Cette activité est encore plus importante chez les insectes intoxiqués par PA1b.

Une cinétique de l'activité caspase-3 a été réalisée sur des *S. oryzae* WAA42 intoxiqués par PA1b, à partir de la troisième heure après le début de l'intoxication jusqu'au quatrième jour (figure 33).

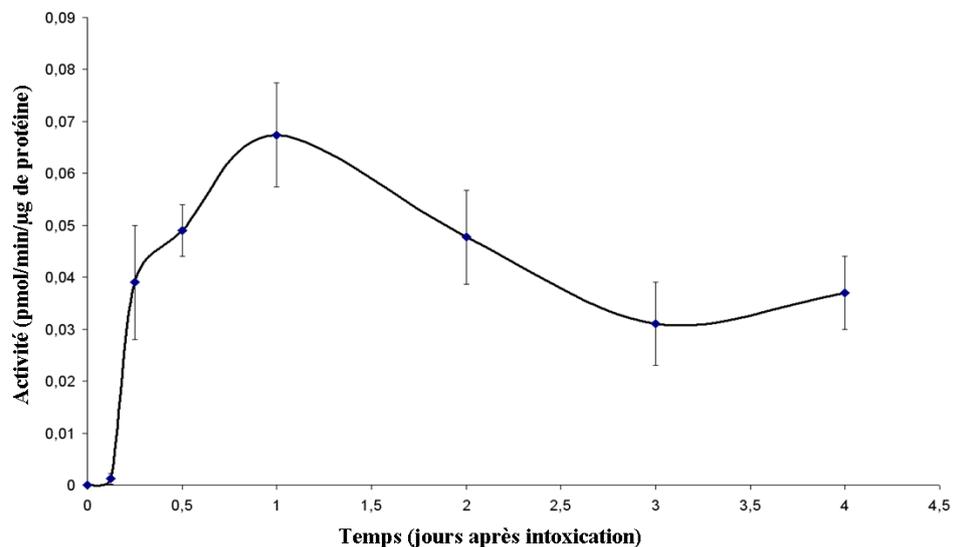


Figure 33 : Cinétique de l'induction de l'activité de la caspase-3 par PA1b dans des intestins de *S. oryzae* WAA42 : Les insectes sont nourris sur milieu artificiel (farine de blé / PA1b (400 µg.g-1de nourriture) durant des temps de 0 à 96 heures). L'activité de la caspase-3 est mesurée à partir d'extrait d'intestins.

L'activité de la caspase-3 est détectable dans les intestins de *S. oryzae* souche WAA42 à partir de 6 heures après le début de l'intoxication, et augmente fortement jusqu'à la 24^{ème} heure jusqu'à une activité atteignant pratiquement les 0,7 picomole par minute et par micro-

gramme de protéine. L'activité diminue ensuite lentement jusqu'au quatrième jour après intoxication où elle se situe aux environs de 0,4 pmol/min/ μ g de protéine. L'activité caspase-3 étant à son maximum 24 heures après le début de l'intoxication, les insectes seront intoxiqués pendant 24 heures pour tous les tests de mesure de l'activité caspase-3.

L'activité de la caspase-3 induite par PA1b est ensuite mesurée sur des intestins de *S. oryzae* souche IsoR3 (résistante à PA1b), intoxiqué pendant 24 heures sur milieu artificiel (farine de blé / PA1b (400 μ g.g⁻¹ de nourriture)), ainsi que sur des intestins de *S. oryzae* souche WAA42 intoxiqué pendant 24 heures sur milieu artificiel contenant soit PA1b, soit l'isoforme inactif de PA1b F10A, soit une forme réduite et alkylée de la toxine à 400 μ g.g⁻¹ de nourriture (figure 34).

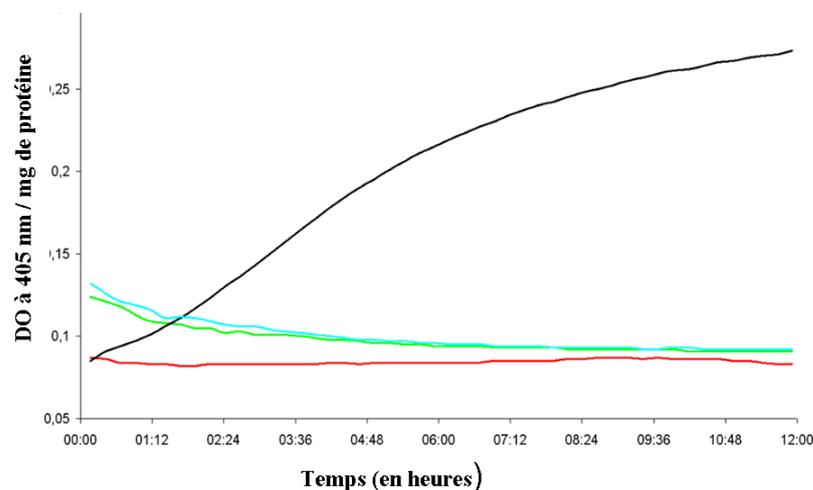


Figure 34 : Mesure de l'activité de la caspase-3 dans les intestins de *S. oryzae* WAA42 et IsoR3. Les *S. oryzae* WAA42 sont nourris pendant 24h sur un milieu artificiel composé de farine de blé additionnée de PA1b (courbe noire), additionnée de l'isoforme inactif F10A (courbe verte), additionnée de PA1b sous forme réduite et alkylée (courbe cyan) à 400 μ g par gramme de nourriture. Les *S. oryzae* IsoR3 sont nourris sur un milieu artificiel composé de farine de blé additionnée de PA1b (courbe rouge). 24 heures après intoxication, l'activité de la caspase-3 est mesurée à partir d'extraits d'intestins.

Après 24 heures, les *S. oryzae* WAA42 intoxiqués par PA1b présentent une activité caspase-3 tout au long de l'expérience. Au contraire, ceux intoxiqués par l'isoforme inactif de PA1b F10A, et par une forme réduite et alkylée de PA1b, ne présentent aucune activité de la caspase-3, tout comme les *S. oryzae* IsoR3.

L'activité de la caspase-3 est également mesurée sur des intestins de *S. oryzae* WAA42 et IsoR3 intoxiqués pendant 24 heures, par de la bafilomycine, un autre inhibiteur de V-ATPase, à des doses de 150 ou 500 µg par gramme de nourriture (soit 0,25 et 0,8 nM) (figure 35).

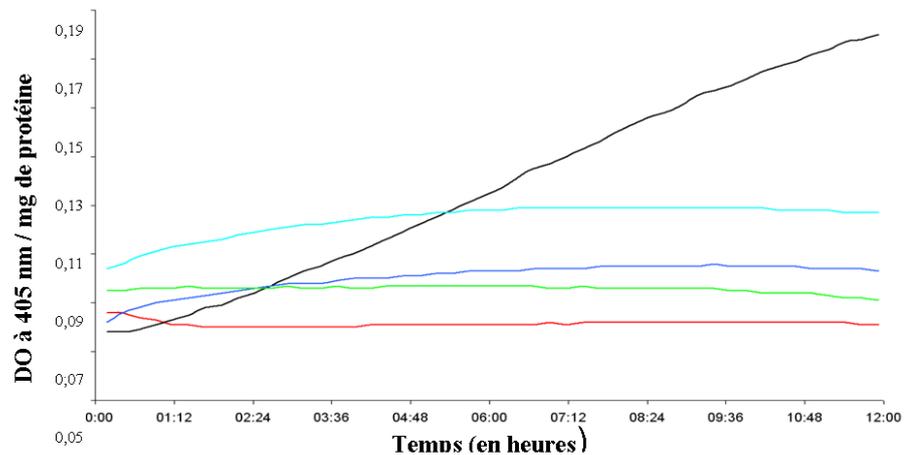


Figure 35 : Mesure de l'activité de la caspase-3 dans les intestins de *S. oryzae* WAA42 et IsoR3 intoxiqué à la bafilomycine. Les *S. oryzae* souche WAA42 et IsoR3 sont nourris pendant 24h sur un milieu artificiel composé de farine de blé additionnée de PA1b à 400 µg (souche WAA42, courbe noire, souche IsoR3 courbe rouge), ou additionnée de bafilomycine à 500µg (souche WAA42, courbe cyan ; souche IsoR3 courbe verte) et 150 µg (souche WAA42 courbe bleu) par gramme de nourriture. L'activité de la caspase-3 est mesurée à partir d'extraits d'intestin.

L'intoxication à la bafilomycine induit une activité caspase-3 dans les intestins de *S. oryzae* sensible à PA1b de manière plus importante à la concentration de 500 µg qu'à la concentration de 150 µg par gramme de nourriture. A ces deux concentrations, la bafilomycine induit une activité de la caspase-3 moins importante que celle induite par une concentra-

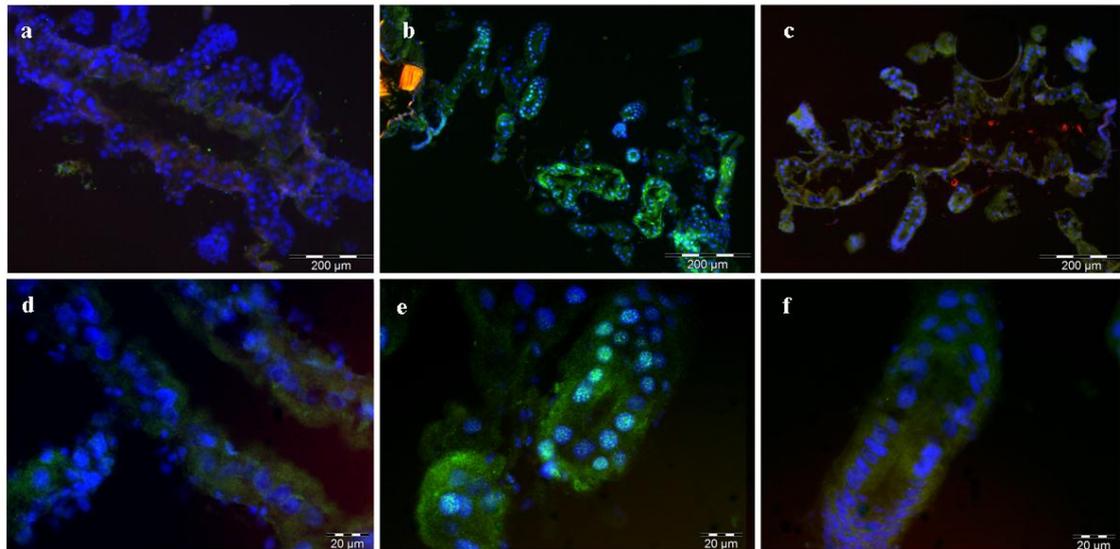
tion de PA1b à $400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de nourriture. En revanche, aucune activité de la caspase-3 n'est présente dans les intestins de *S. oryzae* IsoR3, intoxiqué par des doses de bafilomycine de $500\mu\text{g}$ par gramme de nourriture.

L'effet de PA1b sur l'activité de la caspase-3 est également testé sur *Tribolium castaneum*, un coléoptère possédant le récepteur à PA1b, mais insensible à la toxine. Les *T. castaneum* sont intoxiqués pendant 24 heures sur un milieu artificiel composé de farine de blé additionnée de 10% ou 25% de farine de pois. Aucune activité caspase-3 n'est retrouvée dans les intestins des *T. castaneum* alimentés sur un milieu contenant 10% de PA1b. Lorsque la proportion de farine de pois présente dans l'alimentation passe à 25%, une légère activité de la caspase-3 est visible.

2.2.2 Analyse de l'activité caspase-3 dans les intestins d'insectes par immunomarquage

En raison des résultats obtenus par les méthodes biochimiques, les insectes sont intoxiqués pendant 24 heures. Une dizaine de tubes digestifs sont ensuite disséqués, fixés, congelés, coupés et placés sur lames. La caspase-3 active est révélée par un anticorps primaire anti-caspase-3 active, puis avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa fluor 488. Du DAPI est ajouté lors du montage de la lame, ce qui permet la visualisation des noyaux en bleu à 470 nm.

Dans un premier temps, des charançons *S. oryzae* souche WAA42 sont alimentés sur milieu artificiel composé soit uniquement de farine de blé (témoins négatif), soit de farine de blé additionnée de PA1b à $400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de nourriture, soit de farine de blé additionnée du mutant inactif PA1b R21A, à $400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de nourriture. Le marquage de la caspase-3 active dans le tube digestif est visualisé par microscopie à épifluorescence. Les images obtenues sont présentées en figure 36.



S. oryzae WAA42 non intoxiqué

S. oryzae WAA42 intoxiqué PA1b

S. oryzae WAA42 intoxiqué R21A

Figure 36 : Immunomarquage de la caspase-3 active dans les intestins de *S. oryzae* souche WAA42, intoxiqué par PA1b. Avant dissection de l'intestin, les *S. oryzae* souche WAA42 sont nourris pendant 24 heures sur milieu artificiel composé de farine de blé uniquement (témoin non intoxiqué, photographies a et d), additionné de PA1b à $400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de nourriture (photographies b et e) ou additionné de l'isoforme inactif de PA1b R21A à $400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de nourriture (photographies c et f). Les coupes d'intestin sont visualisées au microscope à épifluorescence à l'objectif 10X (photographies a, b et c) ou à l'objectif 50X (photographie d, e et f). La caspase-3 active est localisée dans les cellules en vert, les noyaux en bleu, et l'autofluorescence en rouge.

Lorsque les *S. oryzae* WAA42 sont alimentés sur milieu non intoxiqué, la forme active de la caspase-3 n'est pas détectée par immunomarquage dans les tubes digestifs. Des résultats similaires sont obtenus lorsque ces charançons sont alimentés sur milieu artificiel comportant l'isoforme inactif de PA1b R21A. En revanche, lorsque la souche *S. oryzae* WAA42 est élevée sur milieu artificiel contenant du PA1b à $400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de nourriture pendant 24 heures, la forme active de la caspase-3 est détectable sur tout le tube digestif, et de manière plus appuyée au niveau des caecae mésentériques.

Dans un second temps, l'effet de l'intoxication par PA1b sur la présence de la forme active de la caspase-3 dans les tubes digestifs est testé sur des insectes résistants ne possédant pas le récepteur (*S. oryzae* souche IsoR3) et sur des insectes résistants possédant le récepteur à PA1b (*T. castaneum*). Les *S. oryzae* sont alimentés sur milieu artificiel composé

soit uniquement de farine de blé, soit de farine de blé additionné de PA1b à 400 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de nourriture. Les *T. castaneum* sont alimentés sur milieu artificiel additionné ou non (témoin négatif) de PA1b à 400 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de nourriture. Le marquage de la caspase-3 active dans le tube digestif est visualisé par microscopie à épi-fluorescence. Les images obtenues sont présentées en figure 37.

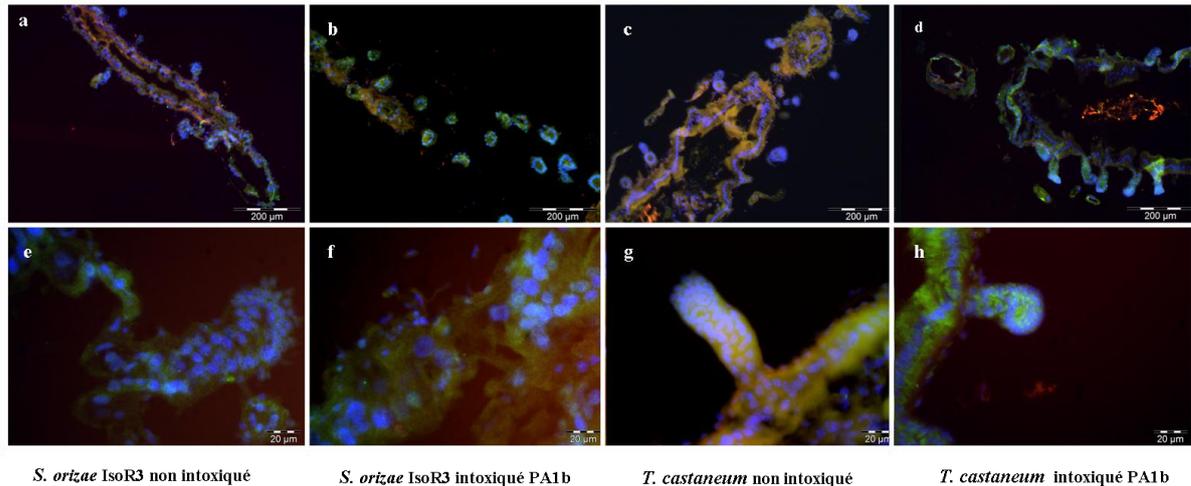


Figure 37 : Immunomarkage de la caspase-3 active dans les intestins de *T. castaneum* et de *S. oryzae* IsoR3 intoxiqués par PA1b. Les *S. oryzae* souche IsoR3 et *T. castaneum* sont nourris pendant 24 heures sur milieu artificiel seul (témoin non intoxiqué, photographies a, c, e et g), ou additionné de PA1b à 400 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de nourriture (photographies b, d et h). Les coupes d'intestin sont visualisées au microscope à épifluorescence à l'objectif 10X (photographies a, b, c et d) ou à l'objectif 50X (photographie e, f, g, et h). La caspase-3 active est localisée dans les cellules en vert, les noyaux en bleu, et l'autofluorescence en rouge.

Aucune activité de la caspase-3 n'est détectée par immunomarkage sur les intestins de *S. oryzae* IsoR3, que se soit en absence ou en présence de PA1b dans le milieu artificiel. Lorsque les *T. castaneum* sont alimentés sur milieu témoin, aucune activité de la caspase-3 n'est détectée, alors que lorsque le milieu artificiel contient du PA1b, une très faible activité de la caspase-3 est détectée sur les tubes digestifs.

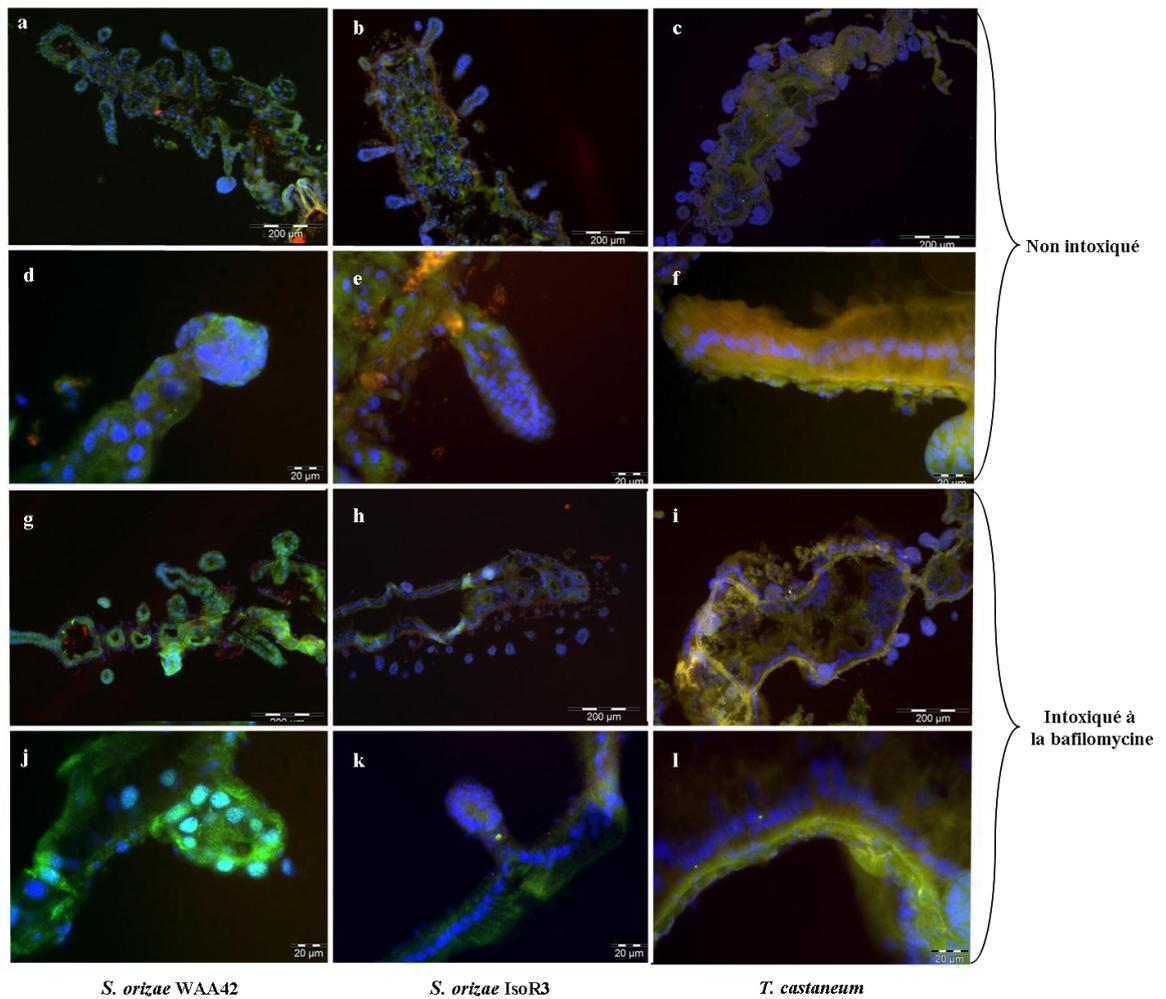


Figure 38 : Immunomarkage de la caspase-3 active dans les intestins de *T. castaneum* et de *S. oryzae* intoxiqués par la bafilomycine.

Avant dissection de l'intestin, les *S. oryzae* et *T. castaneum* sont nourris pendant 24 heures sur milieu artificiel seul (témoin non intoxiqué, photographies a, c, e et g), ou additionné de bafilomycine à $150 \mu\text{g.g}^{-1}$ de nourriture (photographies b, f, d et h). Les coupes d'intestin sont visualisées au microscope à épifluorescence à l'objectif 10X (photographies a, b, c et d) ou à l'objectif 50X (photographie e, f, g, et h). La caspase-3 active est localisée dans les cellules en vert, les noyaux en bleu, et l'autofluorescence en rouge

La bafilomycine est un inhibiteur de la V-ATPase inducteur d'apoptose. L'effet de l'intoxication par cet inhibiteur sur la présence de la caspase-3 active dans les tubes digestifs d'insectes sensibles à PA1b (*S. oryzae* souche WAA42) et sur des insectes résistant à PA1b (*S. oryzae* souche IsoR3 et *T. castaneum*) est testé. Les insectes sont alimentés pendant 24 heures sur milieu artificiel additionné ou non de bafilomycine à $150 \mu\text{g.g}^{-1}$ de nourriture. Les résultats obtenus sont présentés en figure 38.

Les *S. oryzae* souche WAA42 et IsoR3 et les *T. castaneum* alimentés sur milieu artificiel non intoxiqué, ne présentent pas d'activité de la caspase-3 détectable par immunomarquage dans leurs tubes digestifs. Lorsqu'il y a addition de bafilomycine dans le milieu artificiel, la caspase-3 est légèrement détectée dans les tubes digestifs de *S. oryzae* IsoR3 et *T. castaneum*. En revanche, un marquage fort de la caspase-3 est détecté dans les tubes digestifs, particulièrement au niveau des noyaux des cellules intestinales de *S. oryzae* WAA42

2.3 Discussion

Le complexe Vo de la V-ATPase est le récepteur à PA1b chez l'insecte [CHOUABE '11]. Mais le mécanisme qui conduit de la liaison de PA1b sur le récepteur à la mort de l'insecte sensible est jusqu'alors inconnu. L'observation au microscope électronique de cellules Sf9 intoxiquées a permis de mettre en évidence des figures d'apoptose [RAHIOUI '07]. De plus, dans la littérature, les inhibiteurs connus de la V-ATPase tels que la bafilomycine et l'apicularen induisent l'apoptose des cellules [NAKASHIMA '03]. Ces données nous ont incitées à rechercher la présence de marqueur d'apoptose dans les intestins d'insectes intoxiqués par PA1b. Il existe deux voies d'induction de l'apoptose, la voie membranaire et la voie mitochondriale. Ces deux voies enclenchent une chaîne d'activation de protéine caspases qui passe obligatoirement par l'activation de la caspase-3. Une fois initié, ce phénomène n'est pas réversible [WOLF '99, LINK '01].

L'activité de la caspase-3 est mesurée biochimiquement dans des extraits d'intestin de *S. oryzae* souche WAA42. Aucune activité de cette enzyme n'est détectée dans les intestins de *S. oryzae* non intoxiqués, en revanche, l'addition de PA1b (pur à 400 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de nourriture ou présent dans la farine de pois) dans le milieu artificiel induit l'activité de cette enzyme dans les tubes digestifs des charançons sensibles à PA1b. L'addition des formes inactives F10A ou PA1b réduit et alkylé n'induit pas l'activité de la caspase-3. La forme inactive F10A diffère de PA1b par un seul acide aminé, modifiant sa capacité de liaison au récepteur, mais pas sa structure générale [DA SILVA '10]. La mesure de l'activité de la caspase-3 réalisée

sur des extraits d'intestins de *S. oryzae* résistants à la toxine, et qui ne possèdent pas le site de liaison à PA1b, n'a révélé aucune activité de cette enzyme. L'ensemble de ces résultats démontrent que l'ingestion de PA1b induit un phénomène d'apoptose dans les cellules intestinales de *S. oryzae* sensible, et que cet effet passe par sa liaison sur son récepteur.

Les analyses histologiques confirment les résultats précédents en montrant la présence de la forme active de la caspase-3 dans les coupes d'intestins de *S. oryzae* sensible intoxiqués par PA1b, mais pas dans les intestins de cette même souche intoxiqués par une forme inactive de PA1b, ni dans ceux de *S. oryzae* résistant intoxiqués à PA1b.

L'ensemble de ces résultats nous permet de déterminer que PA1b provoque la mort des insectes par un mécanisme d'apoptose qui conduit à la mort des cellules intestinales, puis à la mort de l'insecte. Il a été montré que la liaison de PA1b sur le complexe Vo de la V-ATPase bloquait son activité ATPasique [CHOUABE '11]. Il est très probable, tout comme il a été montré pour un autre inhibiteur de la V-ATPase, l'archazolide [VON SCHWARZENBERG '13], que le blocage de la pompe à protons induit un stress énergétique dans la cellule qui serait responsable du déclenchement de l'apoptose. Lorsque les *S. oryzae* WAA42 ne sont plus alimentés, en moyenne ils meurent de faim en 4,53 +/- 0,21 jours après le début de la diète. Lorsque ces mêmes insectes sont intoxiqués par une forte dose de PA1b la TL50 est de 5,23 +/- 1,1. Il est donc probable que l'intoxication des charançons par PA1b induit l'apoptose des cellules du tube digestif, entraînant l'incapacité des insectes à s'alimenter et donc à mourir de faim.

Les *T. castaneum* sont des insectes insensibles qui possèdent le site de liaison à PA1b. Une dose importante de PA1b (10% de farine de pois dans le milieu artificiel), tout comme l'absence de toxine dans le milieu, n'entraînent pas d'activité de la caspase-3. Une très forte dose de PA1b dans le milieu (25% de farine de pois) permet d'obtenir une faible activité de la caspase-3. Les méthodes d'immunomarquages ont montré une faible quantité de la forme active de la caspase-3 dans les tubes digestifs de *T. castaneum* intoxiqués par PA1b, ce qui n'est pas le cas dans les tubes digestifs de *T. castaneum* non intoxiqués. Chez *T. castaneum*, et probablement chez tous les insectes insensibles à PA1b et possédant le site de liaison, il semble que le mécanisme moléculaire de sensibilité à la toxine soit présent comme le prouvent les tests de toxicité réalisés sur la

drosophile, qui montrent qu'un changement de milieu artificiel peut entraîner un changement de sensibilité à la toxine. L'ingestion de PA1b puis sa liaison sur le récepteur peut entraîner l'apoptose des cellules, mais un mécanisme de résistance encore inconnu semble empêcher la fixation de PA1b sur son récepteur, et donc empêcher l'apoptose.

La bafilomycine est un inhibiteur de la V-ATPase connue pour induire l'apoptose des cellules intoxiquées. L'intoxication des *S. oryzae* WAA42 par la bafilomycine induit une activité caspase-3 dans les extraits de tubes digestifs, tandis que l'intoxication de *S. oryzae* souche IsoR3 ou de *T. castaneum* par la bafilomycine n'induit aucune activité de la caspase-3. La bafilomycine est un inhibiteur connu pour agir sur toutes les V-ATPases, pourtant elle n'induit pratiquement aucune activité de la caspase-3, donc de l'apoptose sur les *S. oryzae* IsoR3 et *T. castaneum*, alors qu'elle induit l'apoptose des *S. oryzae* WAA42 sensibles à PA1b. Ces résultats sont en accord avec les tests de toxicité réalisés sur *S. oryzae*, qui montrent une insensibilité à la bafilomycine de la souche IsoR3 à la dose importante de $600 \mu\text{g.g}^{-1}$ de nourriture, alors que la souche WAA42 est sensible pour cette même concentration. La souche IsoR3 étant une lignée quasi-isogénique de la souche WAA42, sélectionnée sur le caractère résistant à PA1b, il est très probable que ce soit la différence responsable de la résistance à PA1b, qui induit également une résistance à la bafilomycine chez la souche IsoR3.

Nous avons également entrepris la co-localisation par immunomarquage de la V-ATPase (par marquage de la sous-unité c), de PA1b et de l'activité de la caspase-3, afin de pouvoir mettre en relation la liaison de PA1b sur la V-ATPase et le déclenchement de l'activité apoptotique des cellules atteintes. De manière individuelle, ces trois protéines sont détectées sur les coupes d'intestins de *S. oryzae* WAA42 intoxiqués par PA1b. En revanche la co-localisation nécessite des étapes de mise au point que nous réalisons actuellement.

Partie 3

Conclusion des chapitres 1 et 2

Mécanisme d'action de PA1b : modèle hypothétique de la perception du signal PA1b

Chez l'insecte, le complexe Vo de la V-ATPase a été identifié comme étant le récepteur à PA1b [CHOUABE '11]. Parmi les sous-unités qui composent ce complexe, il est nécessaire d'identifier la ou les sous-unités réceptrices. Nos recherches nous ont conduit à cloner les différentes sous-unités du complexe Vo de la V-ATPase chez le charançon sensible à PA1b et sur sa lignée quasi isogénique résistante qui ne possède pas le site de liaison à la toxine. Ainsi les sous-unités a1, a2, c, c'', d et e du complexe Vo de la V-ATPase, mais également la protéine Ac45 qui est une protéine associée au complexe, ont été clonées. La comparaison de séquence entre *S. oryzae* sensible et résistant à PA1b a montré que seule la sous-unité c de la V-ATPase présente des différences de séquences capables d'expliquer l'absence de liaison de PA1b chez le charançon résistant.

La complémentation fonctionnelle de *S. cerevisiae* déficiente pour la sous-unité c de la V-ATPase, et exprimant la sous-unité correspondante de *S. oryzae* sensible à PA1b a fonctionné. En revanche la présence de la sous-unité c de la V-ATPase dans le complexe V-ATPasique de levure ne permet pas la liaison de PA1b sur son récepteur.

La visualisation par cryo-microscopie électronique de la liaison de PA1b-biotinylé avec le complexe V-ATPase de *M. sexta* a montré que la protéine PA1b semble se lier sur le complexe Vo de la V-ATPase, et plus particulièrement sur l'anneau de sous-unité c, du coté extracellulaire et à l'opposé de la sous-unité a. Les sous-unités a et d semblent donc exclues du site de perception de PA1b. Cependant, l'anneau rotatif serait constitué de plusieurs sous-unités c alors qu'une seule molécule de PA1b se fixe sur cet anneau.

Les données obtenues grâce au ligand photoactivable ont permis de montrer clairement l'association de PA1b à la V-ATPase par l'intermédiaire d'une sous-unité de petite taille, la sous-unité e. Mais l'identité de séquence de la sous-unité e de la V-ATPase des souches de *S. oryzae* sensible et résistante à PA1b ne permet pas d'expliquer la différence de liaison de PA1b chez ces deux insectes.

La bafilomycine est un inhibiteur de la V-ATPase agissant sur le complexe Vo, qui se lie aux sous-unités a et c de la V-ATPase. Les tests de toxicité réalisés sur *S. oryzae* ont montré que la souche de charançon résistante à PA1b est également partiellement résistante à cette toxine. La

modification impliquée dans la résistance à PA1b chez *S. oryzae* induit donc une modification du site d'action ou de l'accès au site d'action de la bafilomycine, bien qu'il soit différent pour ces deux toxines [MUECH '14].

Comme schématisé sur la figure 39a l'ensemble de ces résultats est en faveur de l'hypothèse selon laquelle le récepteur à PA1b chez l'insecte sensible impliquerait les sous-unités c et e de la V-ATPase. Ensuite, les travaux de biochimie et d'immunomarquage ont montré que l'ingestion de PA1b chez les insectes sensibles induit l'apoptose des cellules intestinales suite à la fixation sur la V-ATPase, entraînant finalement la mort de l'insecte.

L'analyse du spectre d'hôte de PA1b a montré que cette toxine ciblait uniquement les insectes, et que tous les autres organismes ne présentaient pas d'activité de liaison à PA1b. L'analyse des séquences des sous-unités c et e du complexe Vo de la V-ATPase chez différents organismes plus ou moins éloignés phylogénétiquement a montré une très forte conservation de la sous-unité c de la V-ATPase entre les espèces, ce qui n'est pas le cas pour la sous-unité e. La sous-unité e de la V-ATPase d'insecte est très glycosylée, mais pas celle des autres organismes [MERZENDORFER '99]. La résistance à PA1b des organismes non insectes pourrait donc être dû à cette sous-unité (Figure 39 b).

Chez *S. oryzae* souche résistante, la résistance vient également d'une absence de liaison au récepteur. Cependant, la sous-unité e des charançons résistants est identique à celle des sensibles, et ne peut donc pas expliquer la résistance. Ce mécanisme pourrait alors être expliqué par la différence de séquence de la sous-unité c de la V-ATPase mise en évidence par clonage chez *S. oryzae* souches sensible et résistante. Cette mutation sur la position 83 serait responsable du caractère résistant en empêchant la fixation de PA1b sur son récepteur et de ce fait son action (figure 39 c). Cette théorie est appuyée par l'insensibilité partielle à la bafilomycine des *S. oryzae* résistant à PA1b, dont la modification responsable de l'absence de liaison de PA1b, empêcherait également la bafilomycine d'atteindre son site de réception situé sur les sous-unités a et c de la V-ATPase.

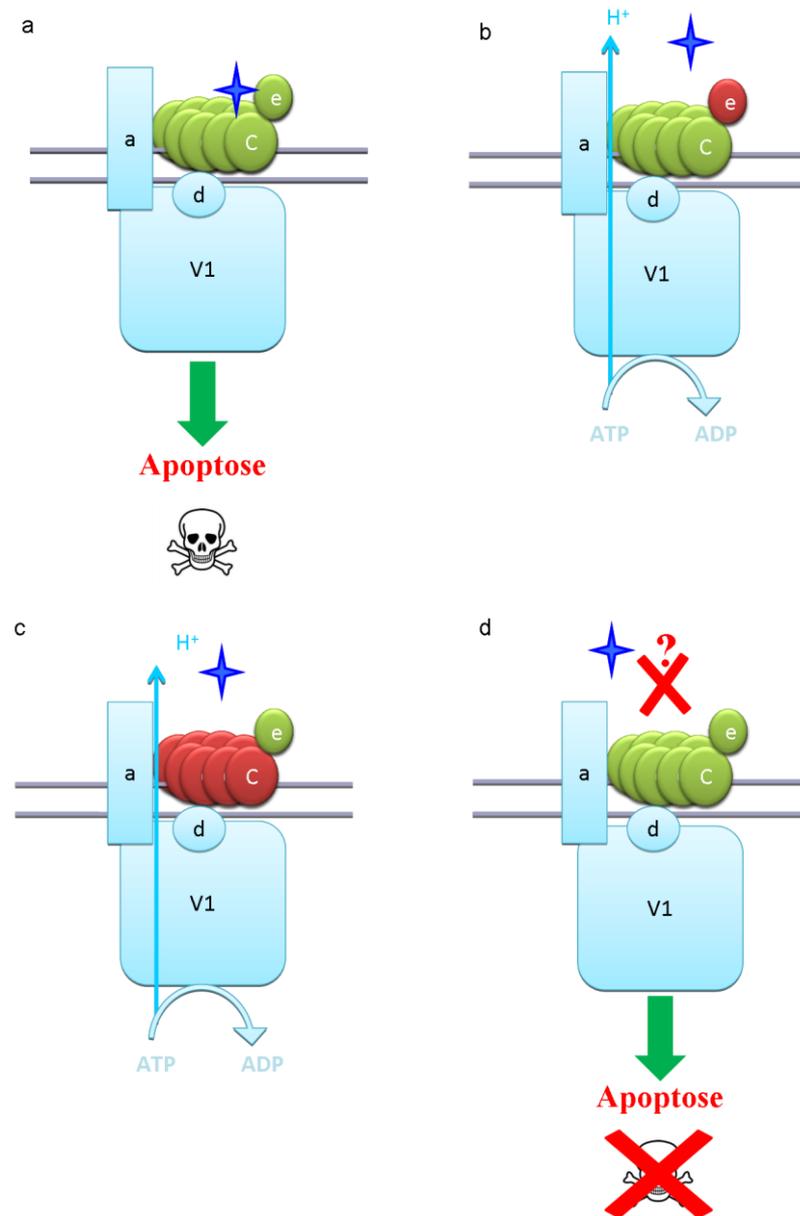


Figure 39 : modèle hypothétique de perception du signal à PA1b. a. Modèle de perception du signal chez l'insecte sensible à PA1b. La liaison de PA1b sur les sous-unités c et e de la V-ATPase déclenche l'apoptose des cellules intestinales, ce qui conduit à la mort de l'insecte intoxiqué. b. Chez les organismes non insectes PA1b ne peut pas se lier sur le récepteur, probablement en raison d'une modification de la séquence de la sous-unité e de la V-ATPase. c. Chez l'insecte résistant *S. oryzae* IsoR3, une modification de la séquence protéique de la sous-unité c de la V-ATPase empêche la liaison de PA1b sur son récepteur, ce qui empêche l'effet toxique de ce peptide. d. Chez l'insecte insensible, tout le mécanisme moléculaire de la toxicité à PA1b est présent, mais un facteur actuellement inconnu empêche PA1b d'agir, probablement en amont du récepteur. PA1b est représenté par une étoile bleu marine du côté extra-cellulaire. La membrane plasmique est représentée en gris. V1 = complexe V1 de la V-ATPase. Les sous-unités du complexe Vo de la V-ATPase non impliquées dans la liaison à PA1b et V1 et le complexe V1 de la V-ATPase sont représentées en bleu clair.

Chez les chrysomèles la résistance à la toxine est également due à une modification du récepteur. En analysant les séquences de la sous-unité c, et particulièrement l'acide aminé correspondant à celui présent en position 83, chez les chrysomèles *Leptinotarsa decemlineata* (le doryphore) et *Diabrotica virgifera* (la chrysomèle des racines de maïs), on remarque que ces deux espèces présentent à cette position respectivement une asparagine et une glutamine, des acides aminés identiques ou aux propriétés similaires à l'acide aminé de *S. oryzae* résistant. Ceci nous permet d'envisager chez ces insectes un mécanisme de résistance à PA1b similaire à celui présent chez *S. oryzae*, dû à une mutation de la sous-unité c de la V-ATPase qui empêcherait PA1b de se lier. Mais la chrysomèle *Bruchus pisorum*, qui est un insecte se nourrissant exclusivement sur pois, présente un acide glutamique sur le site hypothétique de liaison de PA1b, comme de nombreux insectes sensibles.

Les bruches sont le seul groupe d'insectes à avoir acquis la capacité à se nourrir de graines de Légumineuses. Il semble clair que cette évolution provient de l'apparition dans la famille des chrysomèles, qui englobe les bruches, de la résistance de cible à PA1b.

Un mécanisme d'insensibilité à la toxine est également observé chez de nombreux insectes, malgré la présence du site de liaison de PA1b. Cependant, chez ces insectes insensibles à PA1b, tout le mécanisme cellulaire nécessaire à la toxicité de PA1b est présent. En effet *Spodoptera frugiperda* est un lépidoptère insensible à PA1b, mais la lignée cellulaire Sf9, issue de cet insecte, est sensible à la toxine. De plus, *D. melanogaster* est un insecte insensible à PA1b lorsque les tests de toxicité sont réalisés dans un milieu artificiel classique, mais lorsque ces tests sont réalisés sur un milieu à base de fruits, la mouche s'est alors avérée sensible à la toxine. Ces résultats montrent que ces insectes insensibles à PA1b ont tout l'équipement moléculaire (perception et transduction du signal) nécessaire à la toxicité de PA1b, mais qu'un facteur actuellement inconnu empêcherait l'action toxique de ce peptide (figure 39 d).

Chez les insectes insensibles comme *T. castaneum*, il faut des doses très fortes de PA1b pour induire une activité apoptotique dans certaines cellules intestinales. Cette activité extrêmement faible ne nuit pas à la survie de l'insecte, mais montre bien que contrairement aux espèces avec une résistance vraie comme les charançons résistants ou les chrysomèles, le fac-

teur d'insensibilité est moins protecteur. Cette insensibilité pourrait par exemple être due à un composé de l'alimentation qui fixerait PA1b, mais qui montre que, dans le cadre de la valorisation, les tests en laboratoire ne sont pas nécessairement viables et que chaque insecte doit être testé en conditions réelles.

Partie 3

Chapitre 3 Expression de PA1b en système de production hétérologue

3.1 Introduction

3.1.1 Intérêt de produire PA1b en système hétérologue

L'utilisation de PA1b, en l'état actuel des connaissances, n'est envisageable que pour de petites zones, comme le traitement des étangs, ou chez des particuliers. L'utilisation de PA1b comme bio-pesticide à grande échelle reste compromise en raison de sa toxicité à des concentrations relativement élevées (400 µg par gramme de nourriture pour les tests de toxicité sur charançon). Un des objectifs majeurs de l'équipe « Entomotoxine » est donc d'optimiser la séquence de PA1b afin d'en augmenter la toxicité.

Une des premières étapes a été la conception d'une collection de mutants alanine qui a permis de montrer que les acides aminés phénylalanine 10, arginine 21, isoleucine 23, et leucine 27 sont impliqués directement dans la toxicité de la molécule. L'optimisation de la séquence de PA1b passe également par l'analyse de la variété de PA1b par bioinformatique. Par cette technique, de multiples isoformes de PA1b ont été mis en évidence au sein de nombreuses légumineuses. Les méthodes bioinformatiques permettent l'obtention de nombreuses séquences PA1b, mais dont l'activité toxique est inconnue. Afin de connaître la toxicité de chacun de ces isoformes, il est nécessaire de pouvoir les tester de manière individuelle. De plus, il existe une diversité des PA1b au sein des espèces. Par exemple chez le pois, *Pisum sativum*, six isoformes du peptide PA1b ont été mis en évidence. Il est extrêmement difficile de les extraire et de les purifier de manière isolée, leur toxicité individuelle n'a donc jamais pu être testée. La mise en place d'un système de production hétérologue de PA1b est donc primordiale pour l'optimisation de sa séquence. Il permettrait la production de nombreux isoformes PA1b naturels de manière isolée, ce qui permettrait de relier une séquence donnée à une toxicité. De plus la production en système hétérologue permet également de produire des isoformes synthétiques de séquences déterminées selon les données de structure / fonction disponibles et potentiellement optimales.

3.1.2 Les différents systèmes de production hétérologue envisagés de PA1b

La production hétérologue dans *Pichia pastoris* a été tentée au laboratoire BF2I puis en collaboration dans un laboratoire du CNRS à Lille. Toutefois ces essais de production n'ont pas permis de produire un PA1b actif (Zhang 2001, données non publiées).

La production a également été testée dans des *E. coli*, souche Origami, une souche bactérienne capable de réaliser les ponts disulfure. Ces expériences ont été réalisées au laboratoire et en collaboration avec l'INRA de Nantes. Le peu de protéines obtenues se sont avérées inactives en raison de leur mauvaise conformation [LOUIS '04].

La production de PA1b a également été testée en système baculovirus / Sf9. Les cellules d'insectes Sf9 ont été choisies puisqu'elles sont *a priori* adaptées à la production de peptides soufrés et capable de maturer les peptides végétaux et de les produire en grande quantité [VETSCH '00]. De plus, les protéines exprimées dans les cellules d'insectes présentent, dans la grande majorité des cas, des activités biologiques semblables à celles des protéines natives. Ces essais ont permis l'obtention d'une protéine aux propriétés toxiques conservées, mais en quantité insuffisante pour envisager l'utilisation de ce système dans la recherche de PA1b optimum [KARAKI '13].

La production hétérologue de PA1b a également été réalisée en système végétal dans le riz, avec pour objectif la protection des plantes contre les insectes cibles de PA1b.

En collaboration avec l'équipe « Adaptation du riz - Transgénèse végétale » (CIRAD, Montpellier) le cDNA de *PAI* a été exprimé dans le riz. Il a été montré que les grains de riz de ces plantes contiennent un PA1b aux propriétés identiques à celui issu du pois. Dans les premières générations, les grains de riz avaient des quantités de PA1b suffisantes pour une protection contre les charançons, mais l'activité insecticide du grain s'estompe fortement à partir de la cinquième génération sur les insectes adultes, mais reste actif sur les larves. Le riz fut ainsi le premier système d'expression hétérologue à se révéler adapté à la production du peptide PA1b correctement replié [PETIT '06]. Toutefois, ce système n'est pas adapté pour la production rapide de nombreux isoformes de PA1b.

3.1.3 Production hétérologue par agroinfiltration chez *Nicotiana benthamiana*

L'agroinfiltration est une technique simple, rapide et relativement peu coûteuse, qui est largement utilisée pour l'expression transitoire en plante. Elle est utilisée pour de nombreux types d'expériences tels que l'étude de la fonction de gène, des interactions hôte-pathogène et protéine-protéine, la localisation subcellulaire de protéine ou la production de protéine. Cette technique est basée sur l'infiltration d'une culture d'*Agrobacterium tumefaciens* dans les feuilles de jeunes plants. Cette bactérie a la capacité de transférer un segment d'ADN, nommé ADN-T, dans les cellules de plantes, induisant chez la plante un développement d'une tumeur nommée galle du collet. En laboratoire, la bactérie est « désarmée », et certaines parties essentielles au transfert de l'ADN (les bordures droite et gauche) sont placées sur un autre plasmide (plasmide Ti). On appelle ce système « vecteur binaire ». C'est le gène contenu entre les bordures droite et gauche qui est transféré dans la plante, et peut donc être notre gène d'intérêt, intégré par des méthodes de biologie moléculaire. Cette infiltration à l'aide d'une seringue est efficace sur des espèces telles que la tomate, la laitue, la rose ou le pois, mais l'espèce *N. benthamiana* est la plus utilisée en raison de son cycle de vie relativement court, de son taux de production de protéines important, et de la taille et de la capacité de ses feuilles à supporter l'infiltration sans se nécroser [D'Aoust '09, MA '12].

En raison des résultats positifs d'expression hétérologue de PA1b dans le riz et son échec en systèmes bactérien, baculovirus/Sf9 et levure, nous avons décidé de produire PA1b en système végétal. Notre choix c'est porté sur l'expression hétérologue par agroinfiltration de *N. benthamiana* en raison de la faisabilité, des moyens disponibles au laboratoire, et des compétences que j'avais acquises dans ce domaine lors de mon stage de Master.

3.2 Résultats

3.2.1 Production de PA1b par transformation transitoire de tabac

L'ADNc de *PAI*, qui contient une séquence signal, la séquence codant PA1b, un propeptide, la séquence codant PA1a et un second propeptide terminal est présentée dans la figure 40. Elle est composée de 393 paires de bases à partir du codon d'initiation de la transcription ATG

jusqu'au codon d'arrêt de la traduction. Cette séquence sera considérée comme la séquence codante de référence pour PA1b pendant tout ce travail.

a.

atggcttcggttaaactcgtctcttgatcgtcttgtttgccacattaggtatgttctt-
gacaaaaaacgtaggagcagcaagctgcaatggggtttgttctcatttgatgccac-
catgtggctcttcagcctgtcgtatcctgttggtctattaataggtactgca-
gaaatccatctggagtttcttgaaggggaatgatgaacaccctaacttatgtgagtctgatgccgattgtaa
gaagaaaggaagcggtaacttttgcggtcattatcctaatacctgataattgaatatggatgg-
tgtttgcctctaaatctgaagcagaagacgtttctctaagattaccccaaaagacttggtt-
gaagagtgttccactgcttaa

b.

MASVKLASLIVLFLATLGMFLTKNVGAASCNGVCSPFEMP-
PCGSSACRCIPVGLLIGYCRNPSGVFLKGNDEHPNLCES-
DADCKKKGSGNFCGHYPNPDIYGWCFASKSEAEDVFSKIT-
PKDLLKSVSTA

Figure 40 : Séquence de PA1 (à partir de la séquence génique AJ574595). a. ADNc de PA1 ; b. Séquence protéique. Schématisation de la séquence protéique. En bleu la séquence signal, en vert PA1b, en orange PA1a, en noir les deux propeptides.

Par PCR avec le couple d'amorces PA1F SacI/PA1R BamHI (annexe 1) et clonage dans le vecteur pCR2.1, les sites de restrictions BamHI et SacI sont insérés de part et d'autre de l'ADNc de PA1. Par coupure avec ces deux enzymes puis ligation enzymatique, la séquence a été insérée dans le vecteur pMDC32 (figure 41).



Figure 41 : Insertion de l'ADNc de PA1 dans le vecteur pMDC32. PA1 est sous le contrôle d'un double promoteur 35S (flèches grises) et le terminateur Nus (rectangle gris). Les enzymes de restrictions sont indiquées en rouge, l'ADNc de PA1 en bleu. LB (left border) et RB (right border).

L'insertion correcte de l'ADNc *PA1* dans le vecteur est vérifiée par séquençage. Le vecteur d'expression pMDC32-PA1-ADNc est transfecté par choc thermique dans *Agrobacterium tumefaciens* (*A.t* pMDC32-PA1-ADNc) et coinfiltré dans de jeunes feuilles de *Nicotiana benthamiana* en même temps qu'une culture d'agrobactéries portant un vecteur exprimant une protéine suppresseur de silencing (p19), nommées *A.t* p19. Des feuilles de tabac non transformées et des feuilles infiltrées uniquement par la solution d'*A.t.* p19 sont utilisées comme témoins négatifs d'expression de PA1b pour cette expérimentation. Les feuilles co-infiltrées par *A.t* pMDC32-PA1-ADNc / *A.t* p19 sont récoltées au bout de cinq jours. Après broyage des feuilles et extraction de PA1b à l'éthanol 60%, les extraits sont analysés par HPLC (figure 42).

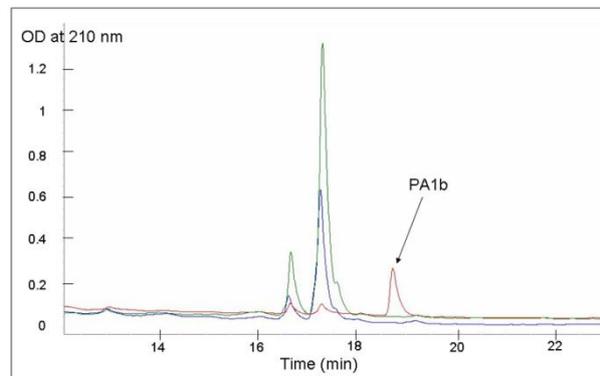


Figure 42 : Chromatogramme HPLC des extraits de feuilles de tabac au 5ème jour après infiltration. En vert, extrait de feuilles de tabac non infiltrées (contrôle). En bleu, extrait de feuilles de tabac infiltrées avec la culture d'agrobactérie souche p19 (contrôle). En rouge, extrait de feuilles de tabac coinfiltrées par les souches *A.t* p19 et *A.t* pMDC32-PA1-ADNc. Le signal correspondant au temps de rétention habituel de PA1b natif de pois est pointé d'une flèche.

Lors des extractions réalisées sur graine de pois, le temps de rétention de PA1b dans les conditions habituelles d'analyse est compris entre 18 et 20 minutes. Les résultats d'analyse HPLC des feuilles contrôles ne présentent pas signal pouvant correspondre à PA1b. Par contre l'extrait obtenu à partir des feuilles coinfiltrées avec *A.t.* pMDC32-PA1-ADNc / *A.t.* p19 présente un signal à environ 19 minutes, qui pourrait correspondre à la protéine PA1b. En revanche, aucun signal n'est observé dans la zone d'éluion de PA1a (10 à 11 minutes) pour les trois conditions testées.

Le pic d'élution correspondant au temps de rétention de PA1b est récolté et analysé par spectrométrie de masse, permettant d'identifier trois masses distinctes : la première correspond à la masse attendue de PA1b avec une valine additionnelle en position 38 ($m/z = 3855.0$). La seconde correspond à la masse de PA1b natif de pois (3857.0). La dernière forme, en large majorité, correspond à la masse de PA1b sans la glycine terminale en position 37 (3755.6). La masse de chacune de ces protéines correspond à un peptide contenant six cystéines impliquées dans trois ponts disulfure (-6 sur la masse), et à la méthionine 12 oxydée (+16 sur la masse). Ces variants ont été obtenus en mélange avec un rendement de 21,4 μg de PA1b par gramme de feuille fraîche récoltée.

La toxicité de PA1b produit par le tabac est déterminée par un test biologique sur *S. oryzae*, sur la souche sensible WAA42 et la souche résistante IsoR3 (tableau n°6). Les extraits de feuilles de tabac infiltrées par les *A.t.* p19 ne présentent aucune toxicité sur les charançons sensibles et résistants. Le PA1b extrait des feuilles de tabac infiltrées avec une solution d'*A.t.* pMDC32-PA1-ADNc / *A.t.* p19 tue les insectes sensibles avec une TL_{50} de 5,8 +/- 1,13 jours et n'affecte pas les insectes résistants, de la même manière que le PA1b natif de pois ($TL_{50} = 5,23 +/- 1,1$). Les tests de toxicité réalisés sur les cellules en culture Sf9 ont montré une DL_{50} de 84 +/-21 nM pour le PA1b exprimé dans le tabac, et 68 +/- 15 nM pour le PA1b natif.

Tableau n°6 : Tests de toxicité réalisés à partir de PA1b extrait de *Pisum sativum*, ou à partir de PA1b produit dans le tabac, sur charançons sensibles (WAA42) et sur charançons résistants (IsoR3).

	Charançons	TL_{50} (jours)
PA1b (<i>Pisum sativum</i>)	WAA42	5,23 +/- 1,1
	IsoR3	Pas de mortalité
PA1b (<i>N. benthamiana</i> / <i>A. t.</i> pMDC32-PA1-ADNc/ <i>A.t.</i> p19)	WAA42	5,8 +/- 1,13
	IsoR3	Pas de mortalité
Extrait (<i>N. benthamiana</i> / <i>A. t.</i> p19)	WAA42	Pas de mortalité
	IsoR3	Pas de mortalité

3.2.2 Cinétique de la production de PA1b dans le tabac

Avec pour objectif l'amélioration de la production de la protéine PA1b dans le tabac, nous avons réalisé une cinétique de production de PA1b. Après inoculation de 120 jeunes feuilles de tabac par *A.t.* pMDC32-PA1-ADNc / *A.t.* p19, cinq feuilles ont été récoltées aléatoirement quotidiennement des jours 1 à 13, puis aux jours 17 et 20. PA1b est extrait et quantifié par HPLC. L'expérimentation a été réalisée trois fois et les résultats présentés en figure 43 sont la moyenne des données obtenues pour chaque jour.

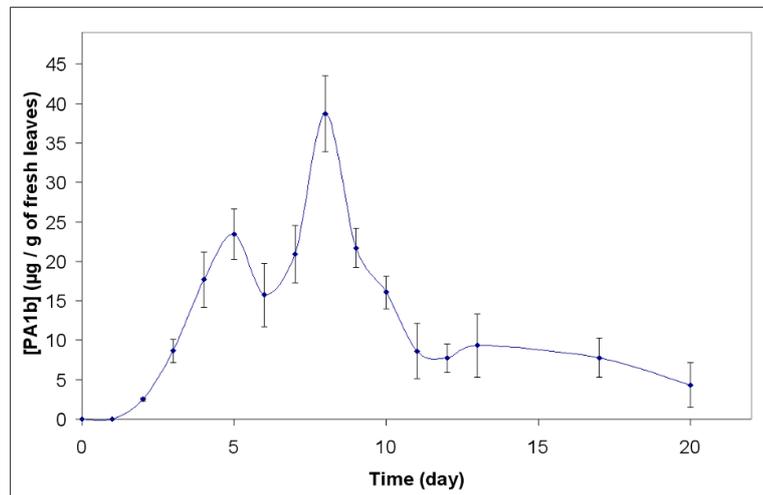


Figure 43 : Cinétique de production de PA1b dans *N. benthamiana*. Des feuilles de *N. benthamiana*, infiltrées par une solution d'*A.t.* pMDC32-PA1-ADNc / *A.t.* p19, sont récoltées quotidiennement pendant 13 jours après infiltration, puis aux jours 17 et 20. Les feuilles sont broyées et PA1b est extrait. La quantité de PA1b obtenue par gramme de feuilles fraîches infiltrées est mesurée par HPLC. Les résultats correspondent à la moyenne de trois expériences distinctes.

PA1b est détectable deux jours après inoculation ($2,5 \pm 0,2 \mu\text{g}$ par gramme de feuille fraîche) et connaît ensuite une augmentation importante, avec une dépression au 6ème jour, pour atteindre un maximum de $38,7 \pm 4,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ feuille fraîche au 8ème jour. A partir du 9ème jour la concentration en PA1b chute brutalement, pour se stabiliser au 11ème jour

aux alentours de $7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de feuille fraîche. Au cours de cette cinétique, nous n'avons jamais observé la présence de la protéine PA1a. Le PA1b exprimé par le tabac au 8^{ème} jour après infiltration est analysé par spectrométrie de masse. Contrairement au cinquième jour après infiltration où trois isoformes de la protéine PA1b sont retrouvés dans le tabac, seule la masse correspondant au variant PA1b de 36 acides aminés, c'est-à-dire sans la glycine terminale et oxydé sur la méthionine 12 est retrouvée ($m/z = 3755.6$).

3.2.3 Exportation et dégradation de PA1b dans le tabac

La quantité de PA1b produite par le tabac chute brutalement après le jour huit. Afin de comprendre cette baisse drastique de la production, nous avons vérifié si PA1b a été exporté dans d'autres organes végétaux, ainsi que sa stabilité dans le tabac.

La présence de la protéine PA1b dans tous les organes de la plante a été déterminée au 6^{ème} jour, au 8^{ème} jour et au 10^{ème} jour après infiltration. Chaque organe de la plante (tiges, racines, feuilles transformées, feuilles non transformées) est récolté, broyé et PA1b est extrait et analysé par HPLC. Pour les trois temps analysés, la toxine est détectable dans les feuilles transformées avec une concentration la plus élevée au huitième jour. Par contre PA1b n'est détectable dans aucun autre organe, que ce soit par analyse HPLC ou par spectrométrie de masse sur l'extrait de plante séparé par HPLC et récolté dans la zone d'élution de PA1b (entre 17 et 21 minutes).

La dégradation de 10 μg de PA1b par des extraits de protéines membranaires et solubles de feuilles de tabac a été testée avec des broyats de feuilles datées des jours 0, 7 et 9 après inoculation, dans différents tampons de pH 5, 7 et 8. Après une nuit d'incubation à 30°C, le peptide présent dans la mixture est quantifié par HPLC. Dans toutes les conditions testées, aucune dégradation de la protéine PA1b n'a pu être observée.

3.2.4 Identification de la séquence de *PA1* optimum pour la production de PA1b

Nous avons ensuite étudié l'importance de chaque partie du gène *PA1* dans la production de la protéine PA1b. Différentes constructions ont été réalisées, comportant la séquence de l'ADNc *PA1* à laquelle on a enlevé progressivement le propeptide terminal, la séquence codant PA1a, le propeptide central, et enfin la séquence signal. Une construction comportant l'ADN génomique, c'est-à-dire avec la présence de l'intron dans la séquence signal, a également été réalisée et est nommée pMDC32-PA1. Ces constructions sont présentées dans la figure 44. Chaque construction a ensuite été exprimée dans le tabac, et huit jours après infiltration les feuilles de tabac sont récoltées et PA1b est extrait. La quantité de peptide contenue dans chaque extrait est mesurée par HPLC et indiquée dans la Figure 44. La construction pMDC32-PA1 entraîne une production maximale de PA1b, avec 59,6 µg de PA1b par gramme de feuilles fraîches transformées. Les constructions pMDC32-PA1-ADNc et pMDC32-PA1-Ps-PA1b-pp1-PA1a entraînent une production importante de PA1b, avec respectivement 37,4 et 36,6 µg de PA1b par gramme de feuille fraîche. Les tests de toxicité sur insectes montrent que ces deux constructions permettent la synthèse d'une protéine PA1b active.

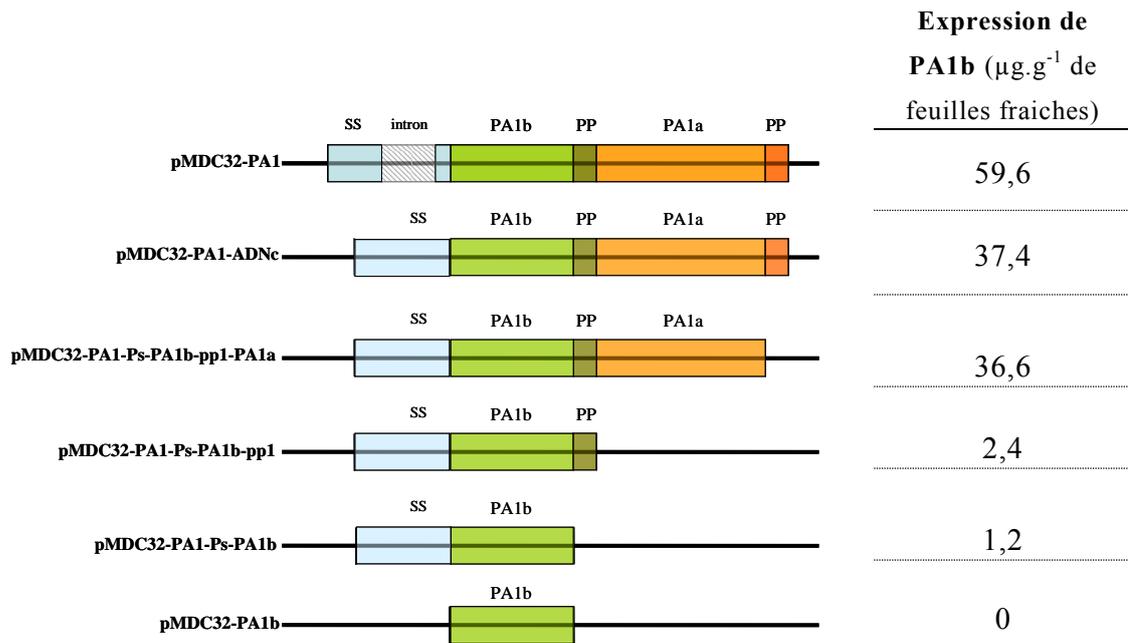


Figure 44 : Constructions de PA1 insérées dans le vecteur pMDC32 et la quantité de peptide synthétisée par le tabac correspondante. Les différentes constructions réalisées à partir de l'ADNc ou de l'ADNg PA1 sont insérées dans le vecteur pMDC32. Une fois transfectée dans *A. tumefaciens*, chacune de ces constructions est co-infiltrée avec *A.t.* p19 dans de jeunes feuilles de *N. benthamiana*. Huit jours après infiltration les feuilles sont récoltées et broyées. La protéine PA1b est extraite puis quantifiée par HPLC. Les résultats de la quantification sont présentés dans le tableau. SS = Séquence Signal ; PP = ProPeptide. Les constructions pMDC32-PA1-Ps-PA1b-pp1, pMDC32-PA1-Ps-PA1b, produisent des PA1b dont la fonctionnalité reste inconnue car ils ont été produits en trop faible quantité pour pouvoir réaliser les essais biologiques (2,4 μg et 1,2 μg respectivement). Aucune protéine PA1b n'a pu être détectée par HPLC ou par spectrométrie de masse avec la construction pMDC32-PA1b.

3.2.5 Production des six isoformes de PA1b de pois à l'aide de la cassette d'expression pMDC32

Les résultats précédents montrent qu'il faut la séquence complète de l'ADNc de *PAI* (avec ou sans le propeptide terminal) pour une production optimale de PA1b. Dans l'objectif de faciliter la production de nombreux isoformes de PA1b, sans obligation de cloner la séquence complète

du gène *PAI*, j'ai créé à partir du vecteur pMDC32-PA1-ADNc une cassette de production. Par mutagenèse dirigée, de part et d'autre de la séquence codant PA1b deux sites de restriction sont insérés. Ces sites de restriction ne doivent pas être présents dans le vecteur pMDC32, ni dans la séquence ADNc de *PAI*. L'insertion des sites de restriction nécessite un changement de séquence génomique et protéique. Afin d'interférer au minimum dans la production de la protéine, les changements de la séquence protéique induit par l'insertion de ces deux sites de restriction doivent être mimines. En position 23 de la séquence protéique, une asparagine est remplacée par une tyrosine par le changement d'une adénine en thymine en position 67 dans la séquence de l'ADNc de *PAI*. Ce changement permet la création du site de restriction *SnaBI*. En position 69 de la séquence protéique, une asparagine est remplacée par une thréonine, par le changement des nucléotides en position 204, 206 et 207, (g en t, a en c et t en c). Ces modifications entraînent l'apparition du site de restriction de l'enzyme *Acc651* (figure 45). L'utilisation d'un logiciel de prédiction de coupure protéolytique montre que la mutation en position 23 de la séquence protéique ne devrait pas affecter la coupure protéolytique du peptide signal (http://web.expasy.org/peptide_cutter/). Il n'existe pas de logiciel permettant la prédiction du site de coupure entre la séquence codant PA1b et le premier propeptide, nous ne pouvons donc pas prédire l'impact de la présence du site de restriction *Acc651* sur la maturation de la protéine.

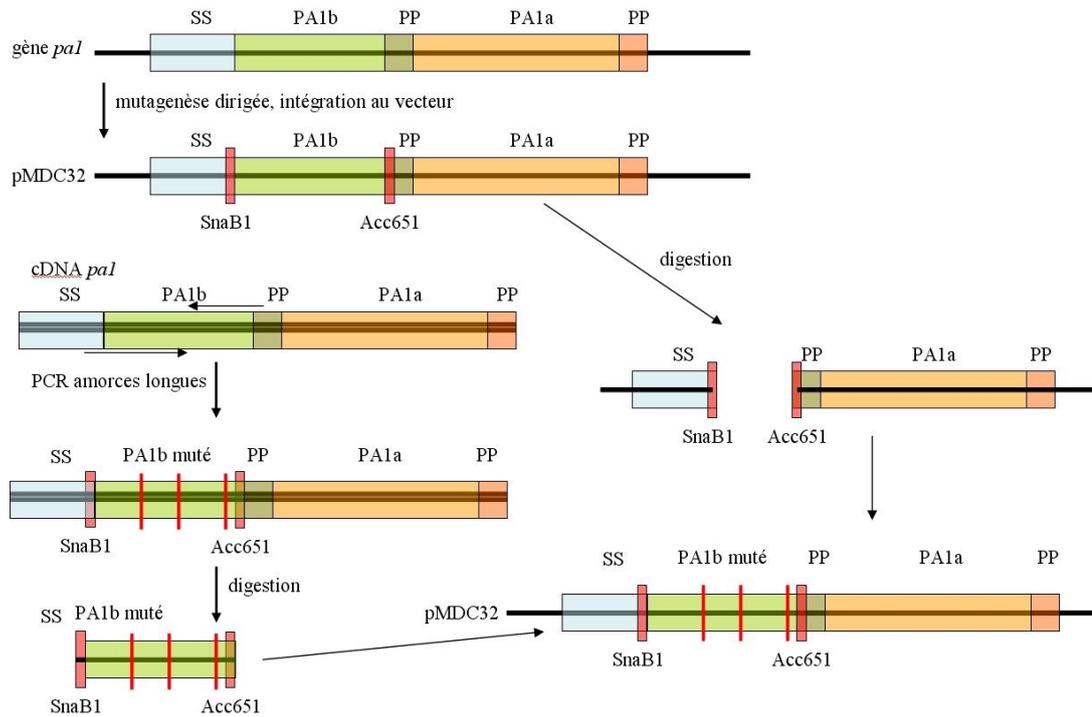


Figure 45 : Conception de la cassette d'expression à partir du vecteur pMDC32, et insertion de différentes séquences de PA1b. Par mutagenèse dirigée, le site de restriction SnaBI est inséré en amont de la séquence codant PA1b, et le site de restriction Acc651 est inséré en aval. Par PCR avec de longues amorces la séquence codant PA1b est modifiée, puis elle est insérée à l'aide des sites de restriction SnaBI et Acc651 dans la cassette d'expression pMDC32-PA1-ADNC-cassette. SS = Séquence Signal ; PP = ProPeptide

Après expression dans le tabac, la production de PA1b est quantifiée et la toxicité est testée sur insectes et sur cellules Sf9. La protéine PA1b produite par transformation de feuilles de *N. benthamiana* par pMDC32-PA1-ADNc-cassette présente une toxicité similaire au PA1b natif du pois, ou à celui produit par *N. benthamiana* transformé par pMDC32-PA1-ADNc (séquence non modifiée de *PA1*).

Tableau n°7 : Séquences des six isoformes de pois produits dans le tabac, et tests de toxicité. Les différences de séquence entre les isoformes sont surlignées en bleu. La glycine terminale, absente chez tous les isoformes est représentée en gris. La dénomination des isoformes, le numéro d'accèsion du gène, et la masse obtenue par spectrométrie sont indiqués pour chacun des variants. * Les séquences M13790 et AJ276882 codent toutes les deux pour la même séquence peptidique de PA1b.

Numéro de l'isoforme - n° d'accèsion GenBank - Masse – Séquence protéique	Production (µg de PA1b /g de feuilles fraiches)	CL ₅₀ Sf9 (nM)	⁵ TL ₅₀ WAA42 TL ₅₀ ISOR3
1 - AJ574795 – 3701 Da ASCNGVCSPFEM _{ox} PPCGSSACRCIPVGLLIGYCRNPSG	53.33	82 (24)	9.2 +- 0.9 no mortality
2.1 - AJ574794 - 3750 Da ASCNGVCSPFEM _{ox} PPCGTTSACRCIPVGLFIGYCRNPSG	48.8	82 (36)	9.5 +- 0.7 no mortality
2.2 - AJ574794 - 3734 Da ASCNGVCSPFEMPPCGTTSACRCIPVGLFIGYCRNPSG	24.6	53 (16)	8.9 +- 0.6 no mortality
3 - AJ574796 - 3732 Da ISCNGVCSPFDIPPCGSPLCRCIPAGLVIGNCRNPYG	8.7	>1500	no mortality no mortality
4 - M13790 et AJ276882* - 3696 Da ASCNGVCSPFEM _{ox} PPCGSSACRCIPVGLVVG YCRHPSG	41.95	269 (55)	12.9 +- 1.1 no mortality
5 - M13709 - 3688 Da ASCNGVCSPFEM _{ox} PPCGTTSACRCIPVGLVVG YCRNPSG	19.92	99 (31)	9.35 +- 0.7 no mortality
6 - AJ574793 - 3700 Da ASCNGVCSPFEM _{ox} PPCGTTSACRCIPVGLVIGYCRNPSG	17.61	96 (22)	8.9 +- 0.7 no mortality

Les séquences codantes pour les cinq autres isoformes PA1b du pois ne sont pas disponibles au laboratoire. A partir de la séquence pMDC32-PA1b, les nouvelles séquences sont synthétisées par PCR à l'aide de longues amorces (annexe 1). Elles sont nommées de 1 (isoforme modèle) à 6, de manière arbitraire pour faciliter leur identification. Une fois les séquences synthétisées, elles sont insérées dans le vecteur d'expression pMDC32-PA1-ADNc-cassette par coupure enzymatique SnaBI/Acc651, puis exprimées dans le tabac.

Les résultats de l'expression de ces isoformes dans le tabac sont présentés dans le tableau n°7. Huit jours après infiltration PA1b a d'abord été extrait, quantifié et purifié par HPLC, montrant que les rendements varient d'une isoforme à l'autre entre 8,7 (isoforme 3) à 53,33 (isoforme 1) µg de PA1b par gramme de feuille fraîche. Une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée pour chacun des six isoformes. Deux formes de la protéine PA1b sont produites par le tabac exprimant l'isoforme 2 : deux 36-mer différenciés par l'oxydation ou non de la méthionine 12. Pour les autres variants de PA1b, l'analyse par spectrométrie de masse a montré l'absence de la glycine 37 et l'oxydation de la méthionine 12. Des tests de toxicité sur cellules Sf9 et sur charançons ont ensuite été réalisés, et montrent que cinq des isoformes ont une toxicité similaire au mélange d'isoformes PA1b extraits du pois utilisé pour les tests en routine. En revanche l'isoforme PA1b numéro 3, codée par le gène AJ574796, ne présente pas de toxicité sur les charançons sensibles ni sur les cellules Sf9. Tous les isoformes sont inactifs sur les charançons résistants IsoR3, ce qui confirme que la toxicité est bien de type PA1b.

3.2.6 Production de PA1b issus d'autres légumineuses

La présence de PA1b a été identifiée dans de nombreuses espèces de légumineuse dont *Sophora japonica* (*Styphnolobium japonicum*). Afin de vérifier si la cassette d'expression, qui comprend la séquence de PA1a du pois, est utilisable pour la production de PA1b issus d'autres légumineuses, la séquence codant PA1b d'un des isoformes de *Sophora japonica* (figure 46) est introduite dans la cassette d'expression et produite dans le tabac. Les feuilles sont récoltées au 8^{ème} jour et après extraction de PA1b l'extrait est analysé par HPLC. Aucune protéine correspondante à PA1b de *S. japonica* n'a pu être identifiée.

ASCNGVCSPFEMPPCGSSACRCIPVGLLIGYCRNPSG
 ADCSGACSPFEMPPCRSTDCRCIPIVLVGGFCIYPTG

Figure 46 : Comparaison des séquences PA1b de *Pisum sativum* et *Sophora japonica*. Séquence protéique de PA1b (accession number AJ574595), issue du pois (en haut) et la séquence protéique de PA1b issue de *Sophora japonica* (en bas). Les différences de séquence sont montrées en rouge.

3.2.7 Production de PA1b cyclique

Les cyclotides sont des knottines cycliques, qui présentent de nombreuses activités biologiques et dont la stabilité est renforcée par la cyclisation. Nous avons voulu savoir si PA1b pouvait se cycliser, et si cette cyclisation pouvait avoir un impact positif sur ses propriétés. Pour cela, la cyclisation de PA1b nécessite de modifier sa séquence (figure 47), en changeant le premier acide aminé de la séquence protéique de PA1b (position 27 dans la cassette d'expression, Ala₂₇ en Gly), ainsi que l'acide aminé terminal de PA1b Gly₆₃ en Asn et les deux premiers acides aminés en aval de la séquence de PA1b : Val₆₄ en Ala et Phe₆₅ en Leu.

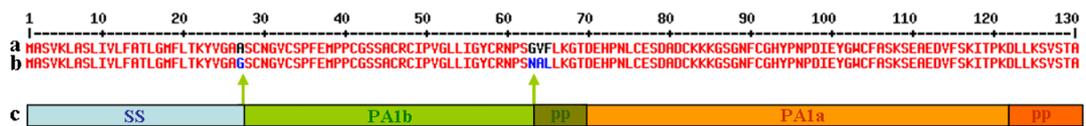


Figure 47 : Comparaison de la séquence protéique de PA1 contenue dans la cassette d'expression pMDC32-PA1-ADNc – (a) et des modifications protéiques nécessaires à la cyclisation de la protéine PA1b par le tabac (b). Les différences de séquences sont en bleu. L'alignement est réalisé avec le logiciel multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). c. Représentation schématique de la préprotéine, alignée avec les séquences protéiques.

Ces modifications de séquences protéique sont obtenues par des mutations réalisées à partir du vecteur d'expression pMDC32-PA1-ADNc-cassette, et créées par PCR avec l'utilisation d'amorces contenant les modifications souhaitées (annexe1), en position 80 (c en g), et en position 187 à 191 (ggagttt en aacgctc). Les vérifications par séquençage montrent que toutes les mutations ont été correctement réalisées. Cette construction est exprimée dans *N. benthamiana* et huit jours après infiltration les feuilles sont récoltées et PA1b est extrait. Les résultats de l'analyse en HPLC de ces extraits montrent la présence de plusieurs isoformes potentiels de PA1b, mais les analyses réalisées par spectrométrie de masse montrent qu'aucune de ces isoformes ne correspondent à un PA1b cyclisé. Les formes retrouvées sont des 36-mer, où l'acide aminé terminal, qui est dans ce cas une Asn et non une Gly, est coupé. Il existe deux variants de ce 36-mer, une forme majoritaire oxydé sur la méthionine 12 ($m/z = 3686$) et une forme non oxydée ($m/z = 3670$).

3.2.8 Production d'une cyclotide

La présence de la protéine PA1a dans une des séquences codantes pour les cyclotides et une conformation génique relativement similaire, permet d'envisager la production de cyclotide avec la cassette d'expression pMDC32 PA1-ADNc. La cyclotide choisie est issue de la plante *Clitoria ternatea* (GenBank : JF501210.1). La création de cette séquence est réalisée par PCR avec de longues amorces à partir du vecteur pMDC32 PA1-ADNc. Une fois obtenue, cette séquence est insérée dans la cassette d'expression pMDC32-PA1-ADN-cassette par couper /coller enzymatique (figure 48).

MASVKLASLIVLFATLGMFLT-
 KYVGA**GLPTCGETCTLGTCYVPDCSCSWPIC-**
 MKNVFLKGTDEHPNLCES-
 DADCKKKGSGNFCGHYPNPDIEYGWCFASKSEAEDVFSKITPKDLLK
 SVSTA

Figure 48 : Séquence protéique de la cassette d'expression pMDC32-PA1-ADNc, ou PA1b est remplacée par une cyclotide (en violet). La séquence codant la protéine PA1b est remplacée par la séquence codante la protéine

cyclotide issue de *Clitoria ternatea*. La séquence signal de *PA1* est en bleu, la séquence codant PA1a est en orange, et les deux propeptides sont en noir.

Cette protéine est exprimée dans le tabac et les feuilles transformées sont récoltées cinq jours après infiltration. Par analyse HPLC et spectrométrie de masse, aucune protéine correspondant à cette cyclotide n'a pu être identifiée.

3.3 Discussion

L'obtention d'un système de production hétérologue à PA1b est une étape clé pour l'étude et l'amélioration de la toxicité du peptide. Tous les systèmes de production jusqu'à présents testés ne permettent pas l'obtention de protéines fonctionnelles (systèmes bactérien et levure), ou dans des quantités suffisantes (Baculovirus / Sf9 [KARAKI '13]), ou encore est trop onéreux pour envisager de produire de très nombreux isoformes de PA1b (synthèse chimique [DA SILVA '09]). La production hétérologue par transformation transitoire de tabac est le premier système d'expression hétérologue de PA1b efficace [EYRAUD '13]. Pour ce travail, l'ADNc du gène *PA1* a été inséré dans le vecteur binaire pMDC32, sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire fort double 35S. Ce vecteur a été créé spécialement pour la transformation par agrobactéries [CURTIS '03]. La transformation de jeunes feuilles de *N. benthamiana* par le vecteur pMDC32-PA1-ADNc permet l'obtention de trois isoformes de PA1b, de 36, 37, et 38 acides aminés au cinquième jour après infiltration, mais d'un seul isoforme de 36 acides aminés au huitième jour après infiltration. Il semblerait que chez le tabac le site de clivage de la préproprotéine soit différent de chez le pois et se situerait en aval de la valine 38, alors qu'elle est située en amont chez le pois. Les acides aminés valine 38 et glycine 37 pourraient ensuite être clivés par des carboxypeptidases non présentes chez le pois. Le remplacement de la glycine 37 par une asparagine ne change rien à ce phénomène, comme nous l'avons constaté lors des essais de cyclisation de PA1b. Le décalage de la coupure protéolytique par les enzymes de tabac a déjà été observé lors de la production en système hétérologue de cyclotides, qui sont des peptides faisant partie de la famille des knottines. Dans ces plantes, les

enzymes de *N. benthamiana* ont la possibilité de décaler le site de coupure protéique jusqu'à quatre acides aminés en C-term après la zone de coupure originelle [SASKA '07]. L'oxydation de la méthionine 12 est retrouvée régulièrement dans PA1b purifié à partir du pois, et est probablement due aux conditions d'extraction à l'alcool. Les masses obtenues par spectrométrie correspondent à des peptides contenant six cystéines impliquées dans trois ponts disulfure, ce qui est un signe du repliement correct de PA1b. Les tests de toxicité réalisés sur charançons sensibles et résistants et sur cellules Sf9 montrent une similarité de toxicité entre PA1b natif du pois et celui produit par le tabac, ce qui valide le repliement correct du peptide et une activité toxique conservée chez le 36-mer. La transformation transitoire de *N. benthamiana* par l'ADNc de *PAI* permet l'obtention de PA1b avec un rendement de 21,4 µg de PA1b par gramme de feuille fraîche récoltée. Pour la réalisation des différents tests de toxicité, une centaine de microgrammes est nécessaire, soit environ cinq grammes de feuille fraîche. Sur un jeune plant de tabac, en moyenne trois à cinq feuilles sont transformées, donc trois plants suffisent pour la réalisation des tests de toxicité.

Le rendement de production de protéines par agroinfiltration de *N. benthamiana* est généralement à son maximum entre les jours quatre et six après infiltration [WYDRO '06, CHEN '11]. La cinétique de production de PA1b montre que le maximum de production de la protéine est au huitième jour après infiltration. Il est probable que ce décalage du maximum de production soit dû à la structure tridimensionnelle de PA1b. Le nœud de cystine confère à PA1b une très forte stabilité aux facteurs environnementaux comme les peptidases [JOUVENSAL '03, DA SILVA '10], ce qui permet au peptide de s'accumuler dans la plante jusqu'au jour huit. Après le huitième jour, la quantité de PA1b chute brutalement.

La production de protéine recombinante dans la plante est rapidement stoppée (au troisième jour) en raison du phénomène de silencing. L'expression simultanée d'une protéine suppresseur de silencing (co-infiltration d'*A.t.* p19) retarde ce phénomène. On peut penser qu'au huitième jour la production de PA1b est stoppée par silencing, ce qui pourrait expliquer l'arrêt de l'augmentation de la quantité de PA1b dans les feuilles. En revanche cela n'explique pas la chute brutale de la quantité de PA1b au neuvième jour. Comme PA1b n'a pas été retrouvé dans d'autres parties de la plante (racines, tiges, ou feuilles non transformées), on peut conclure que PA1b n'est pas exporté dans un autre organe. Dans les conditions testées, la dégradation de PA1b *in vitro* par les enzymes de tabac n'a pas pu être montrée. Mais l'hypothèse selon laquelle PA1b serait dégradé dans le tabac

n'est pas exclue, tout comme le fait que PA1b pourrait être couplée avec d'autre(s) molécule(s). Ces phénomènes pourraient avoir lieu en réponse à la surproduction de la protéine.

La protéine PA1b est codée par le gène *PAI*, qui code également pour une seconde protéine nommée PA1a. Afin de déterminer quelles parties du gène sont primordiales pour la production de PA1b dans le tabac, nous avons réalisé six constructions, que nous avons exprimées dans le tabac (figure 44). Le meilleur rendement est obtenu lorsque la transformation est réalisée avec le gène complet. L'absence de l'intron entraîne une diminution de la production du peptide, mais n'affecte pas les propriétés de la protéine produite. L'absence du propeptide terminal n'affecte pas la production de PA1b. En revanche l'absence de la séquence codant PA1a entraîne une chute brutale du rendement qui est pratiquement divisé par 20. Dans un premier temps, ces résultats nous permettent de comprendre pourquoi les premiers essais de production hétérologue de PA1b en système bactérien et levure ont été des échecs puisque l'ADNc utilisé était tronqué après la séquence codant PA1b. Comme dans le tabac en absence de la séquence codant PA1a, PA1b a été retrouvé en très faible quantité. Il serait maintenant intéressant de retenter la production de PA1b en système bactérien ou levure en utilisant cette fois l'ADNc complet de *PAI*, voire même l'ADNg.

Lors de sa découverte, en raison de sa richesse en acides aminés soufrés PA1a a été décrite comme une protéine de réserve de la graine. Nos résultats nous incitent à reconsidérer le rôle de cette protéine. Il est possible que la protéine PA1a joue un rôle dans la stabilisation de l'ARNm de *PAI*, en son absence l'ARNm PA1b serait moins stable, donc plus facilement dégradé et empêcherait un taux de production élevé du peptide. Il est aussi envisageable que PA1a joue un rôle de chaperonne pour le repliement correct de PA1b. Le rôle de chaperonne de PA1a avait déjà été envisagé par l'équipe « Entomotoxine ». Il a été montré que l'ajout de la protéine PA1a dans le milieu réactionnel, lors du repliement *in vitro* de PA1b synthétisé chimiquement, n'améliorait pas le rendement de repliement du peptide. Il est aussi possible que l'action positive de PA1a sur la production de PA1b intervienne avant coupure protéique de la préprotéine PA1 en deux peptides indépendants.

Lorsque les extractions de PA1b se font à partir de graines de pois, la protéine PA1a est retrouvée dans l'extrait PA1b, à un temps de ré-

tention compris entre 10 et 11 minutes. Lorsque l'extraction de PA1b se fait à partir du tabac transformé, la protéine PA1a n'est jamais retrouvée dans le milieu. Dans le tabac PA1a n'est pas stable et doit probablement être dégradée dès la libération des deux peptides PA1a et PA1b. Cette dégradation, plus importante chez le tabac que chez le pois, renforce l'hypothèse d'une dégradation de PA1b dans le tabac après le jour huit.

La mise en place d'un système de production hétérologue de PA1b avait pour objectif la production de nombreux isoformes, naturels ou synthétiques, de toxicité inconnue, afin de faciliter la découverte d'un PA1b à la toxicité accrue. L'analyse de l'intérêt des différents éléments composant l'ADNc *PAI* pour la production de PA1b a permis de montrer l'importance de la conservation de la séquence codant la protéine PA1a. Le clonage de l'ADNc de *PAI* est plus complexe que le clonage de la séquence codant PA1b [LOUIS '07]. La production hétérologue de PA1b nécessite le clonage de l'ADNc *PAI* complet, mais les variants PA1b artificiels, imaginés en laboratoire ne sont associés à aucune séquence *PAI*. De plus, seule la variabilité de PA1b nous intéresse dans ce travail. Pour ces raisons, nous avons mis en place un système de cassette d'expression. Dans le vecteur pMDC32-PA1-ADNc, deux sites de restriction encadrant la séquence codant PA1b sont insérés par mutagenèse dirigée. Ces changements de séquence n'affectent en rien le rendement et l'activité de la protéine obtenue, mais permettent par simple coupé/collé enzymatique l'insertion de n'importe quelle séquence PA1b dans la séquence ADNc de *PAI*. Pour les séquences PA1b cibles qui ne sont pas déjà clonées au laboratoire, ou si la séquence voulue est artificielle, les nouvelles séquences codant PA1b peuvent être créées par PCR avec de longues amorces. Cette technique nous a permis d'insérer dans la cassette d'expression pMDC32-PA1-ADNc et faire produire par le tabac les isoformes 2, 3, 4, 5 et 6 de PA1b du pois.

Les tests de toxicité réalisés en routine au laboratoire sont réalisés à partir du mélange des six isoformes PA1b de pois. La purification de manière individuelle de ces six isoformes est complexe et de ce fait leur toxicité propre n'a jamais pu être testée. La mise en place du système de production hétérologue a permis la production de manière isolée de chacun de ces variants. Parmi les six formes, tous ont présenté une toxicité similaire à celle obtenue à partir du mélange d'isoformes de pois, à l'exception de l'isoforme 3 qui s'est avéré inactif. Ce peptide diffère des autres isoformes de pois par sept acides aminés (Ala 1 Ile, Glu 11 Asp, Met 12 Ile, Ser 18 Pro, Ala 19 Leu, Val 25 Ala, Tyr 31 Asn, Ser 36 Tyr). Les analyses

structure / fonction réalisées au laboratoire avaient montré l'absence ou le très faible effet sur la toxicité des changements d'acides aminés en position 11, 12, 25 et 31. Lors des essais de cyclisation de PA1b, le premier acide aminé a également été muté sans changer la toxicité du peptide. On peut donc supposer que l'absence de toxicité de l'isoforme 3 est due aux mutations en position 18, 19 et 38. Par modélisation moléculaire de cet isoforme, on voit que la mutation de ces trois acides aminés, positionnés côte à côte lorsque la protéine est repliée, conduit à la perte du caractère amphiphile de PA1b, en changeant un pôle hydrophile en pôle hydrophobe (figure 49).

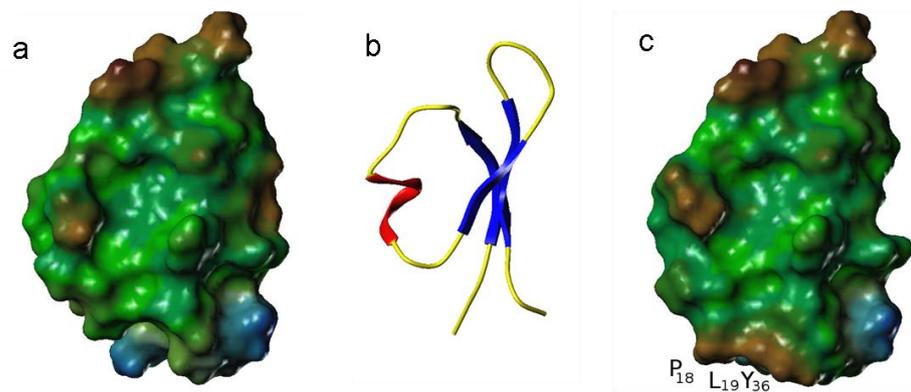


Figure 49 : Modélisation du potentiel hydrophobe et hydrophile de la surface accessible de deux isoformes de PA1b. Le potentiel hydrophobe et hydrophile de la surface est calculé avec le logiciel MOLCAD (option Sybyl) pour l'isoforme 1 de PA1b de *Pisum sativum*, à l'activité toxique conservée (a), et pour l'isoforme 3, forme inactive de PA1b (c). b. Représentation en ruban de la structure RMN de l'isoforme 1, dans la même orientation que les figures a et c. Les surfaces hydrophobes sont représentées en marron, et les surfaces hydrophiles en bleu. Les surfaces vertes représentent un niveau d'hydrophobie neutre.

Ces résultats permettent de compléter ceux obtenus avec la création de la collection de mutants alanine. Il avait été montré que le caractère toxique de PA1b dépend du maintien du pôle hydrophobe et de la conservation de l'arginine 21 [DA SILVA '10]. Nos résultats montrent l'importance de la conservation du caractère hydrophile du pôle opposé à la boucle hydrophobe. De plus le remplacement de la leucine 19 par une phénylalanine dans l'isoforme 2, confirme que la conservation du caractère hydrophobe est plus importante que la séquence en acide aminé.

Les cyclotides sont une famille de knottines qui ont une stabilité protéique et structurale importante qui est accrue par la cyclisation de cette toxine [COLGRAVE '04]. La cyclisation de ces peptides s'effectue grâce à l'action d'une asparaginyl endopeptidase (AEP) qui catalyse la réaction de clivage et la réaction de transpeptidation. *N. benthamiana*, ne produit pas de manière endogène de protéines cycliques, mais lorsqu'il est utilisé comme système de production hétérologue pour produire la cyclotide kalata B1, il produit des formes linéaires mais également des formes cycliques de cette protéine. Le tabac a donc tout le bagage moléculaire pour la fabrication de protéine cyclique [SASKA '07, CONLAN '12]. Dans l'objectif d'augmenter la toxicité de PA1b, nous avons essayé de faire produire au tabac un PA1b cyclisé. Pour que la cyclisation puisse avoir lieu, la présence d'une glycine en position N-terminal, une asparagine en position C-terminal, ainsi qu'une glycine, une serine ou une alanine en position C-ter +1, et une lysine ou une isoleucine en position C-ter +2 est requise. L'expression hétérologue d'une séquence PA1b artificielle, insérée dans la cassette pMDC32-PA1-ADNc, dont la séquence présentait ces changements en acide aminé a été réalisée dans le tabac. L'analyse des extraits obtenus huit jours après agro-infiltration a montré que le changement de séquence n'empêche par la synthèse de PA1b. En revanche, les analyses réalisées par spectrométrie de masse ont montré que les PA1b produits par le tabac étaient de forme linéaire. De manière identique aux résultats précédents, l'acide aminé C-terminal (Asn) de ce PA1b a été clivé. Il est probable que l'absence de cet acide aminé, primordial pour la cyclisation, soit responsable de la non cyclisation de PA1b. La séquence protéique de PA1b étant très différente de celle des cyclotides, nous ne pouvons pas exclure que la structure même de PA1b soit un obstacle à sa cyclisation. De plus, plusieurs possibilités d'acides aminés en C-term +1 et +2 nécessaires à la cyclisation ont été proposées [CONLAN '12]. Nous n'avons testés qu'une seule de ces possibilités, et la cyclisation de PA1b reste envisageable par le choix de séquences artificielles différentes.

Les cyclotides sont une famille de protéines retrouvées principalement dans les Rubiacées, Cucurbitacées et Violacées, mais elle est également retrouvée chez l'espèce *Clitoria ternatea* (le pois bleu), une plante de la famille des légumineuses [POTH '11]. A l'exception de la cyclotide issue du pois bleu, les cyclotides sont codées par un ADNc présentant la même structure : un peptide signal adressant la protéine au réticulum endoplasmique, un propeptide N-terminal, une séquence répétée N-terminale (Ntr), la séquence codant la cyclotide, et un propeptide terminal nommé Ctr

(C-terminal region). L'ensemble des séquences Ntr-cyclotide-Ctr peut être répété plusieurs fois. Les deux séquences N-ter sont impliquées dans l'adressage du précurseur de la protéine dans les vacuoles où la maturation et la cyclisation ont lieu [CONLAN '11, POTH '11]. A la différence des autres cyclotides connues, celle de *Clitoria ternatea* est codée par un ADNc présentant une structure similaire au gène *PAI*. Dans cette séquence, la séquence codant PA1b est remplacée par la séquence codant la cyclotide, dans une structure de gène identique à *PAI* [POTH '11] (figure 50). Cette cyclotide présentant des propriétés identiques à celles produites dans les autres plantes, il est envisageable de produire des cyclotides à l'aide de notre cassette d'expression pMDC32-PA1-ADNc, par le système d'expression hétérologue dans le tabac. La séquence codant la cyclotide de *Clitoria ternatea* est insérée dans la cassette est exprimée dans le tabac.

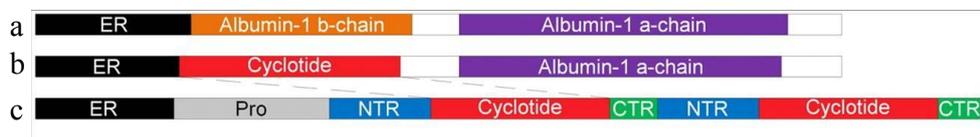


Figure 50 : Structure du gène PA1 de pois (a), du gène codant une cyclotide de *Clitoria ternatea* (b) et du gène habituellement codant des cyclotides (c).

L'analyse de l'extrait obtenu par HPLC et spectrométrie de masse n'a pas permis de montrer la production de cyclotide à l'aide de la cassette d'expression dans le tabac. Il est possible que l'insertion de la séquence codant la cyclotide dans la cassette d'expression n'ait pas permis l'expression de la protéine. Il est aussi possible qu'à chaque peptide PA1b (ou cyclotide), corresponde un peptide PA1a spécifique. Cette hypothèse est confortée par le fait qu'aucune protéine PA1b n'a été obtenue à partir de l'insertion dans la cassette d'expression de la séquence codant PA1b de *S. japonica*. De plus parmi les six isoformes de pois produit à l'aide de ce système, le taux de production le plus bas a été obtenu avec l'isoforme 3, celle présentant le plus de variation de séquence avec la séquence modèle. Une séquence spécifique PA1a serait alors nécessaire à la production de chaque PA1b. Ce système aurait une certaine flexibilité et un PA1a donné permettrait d'exprimer un PA1b, ou des isoformes de ce peptide présentant de petites différences, une différence trop importante entraînerait la diminution ou même l'absence de production de PA1b. L'une des façons de vérifier

cette hypothèse serait de faire des constructions en croisant les séquences PA1b et PA1a. Par exemple, peut-on augmenter la production de l'isoforme 3 en lui adjoignant son propre PA1a, et diminuer celle de l'isoforme 1 en la produisant avec la séquence PA1a de l'isoforme 3?

Conclusion générale et perspectives

Au-delà du cadre de la recherche fondamentale, les études réalisées par l'équipe « Entomotoxine » sur PA1b, ont pour objectif majeur l'utilisation de ce peptide dans la lutte contre les insectes. L'action toxique de PA1b s'exerce uniquement sur les insectes dont certains ont une incidence sanitaire mondiale, avec l'exemple du moustique *Aedes aegyptii* qui est le principal vecteur de la dengue et de la fièvre jaune, et économique avec l'exemple de *S. orizae* un important ravageur des denrées stockées.

La majorité des insecticides ciblent le système nerveux des insectes, ce qui n'est pas le cas de PA1b qui est le premier insecticide inhibiteur de V-ATPase. L'utilisation de substances avec des sites d'action différents permet de limiter l'apparition de résistances, la découverte constante de nouveaux insecticides est donc primordiale.

La nature de PA1b fait de ce peptide une molécule utilisable en agriculture biologique. Cette protéine est produite par les légumineuses, une famille de plante très cultivée dans le monde (pois, soja...), et est facilement extractible ce qui rend l'obtention de cette protéine relativement aisée.

C'est pour ces raisons que nous collaborons avec plusieurs sociétés privées. Parmi ces sociétés, l'une est spécialisée dans la transformation et le recyclage de produits végétaux, en particulier à partir de pois. Les travaux menés avec cette société ont démontré que des résidus de transformation du pois contiennent une activité insecticide due à PA1b très enrichie. La protection de silo contre le charançon du genre *Sitophilus* en mélangeant au blé des extraits de pois est actuellement testée au laboratoire et donne des résultats prometteurs, ce qui permettrait par exemple la protection de céréales et de farine, tout en conservant l'étiquette « biologique ».

Les autres sociétés sont spécialisées dans la protection contre les insectes, que ce soit la protection du bois contre les termites, l'utilisation

d'appâts empoisonnés, ciblant soit les blattes soit les fourmis, ou encore la protection de serres.

Une des voies les plus prometteuses d'utilisation de PA1b est la transgénèse végétale, qui est envisageable en raison de la nature peptidique de la toxine. Une collaboration avec l'équipe « Adaptation du riz - Transgénèse végétale » (CIRAD, Montpellier) a été entreprise avec pour objectif la protection du riz contre le charançon grâce à la présence de PA1b dans la graine. Les premières générations de plantes transgéniques ont présenté une résistance aux charançons, mais cette résistance a diminué au fil des générations de riz. Pour pouvoir être utilisées aux champs, ces plantes transgéniques doivent encore être améliorées. Deux facteurs semblent relativement simples à améliorer : le riz produit PA1b en quantité bien plus faible que le pois, donc l'utilisation d'un promoteur plus fort ou d'un PA1b à l'activité toxique accrue pourrait remédier à ce problème. Le second facteur est la localisation de la toxine qui n'est pas optimale. La concentration en PA1b dans des zones cibles des insectes (graines, racines...) peut être accrue en utilisant un promoteur spécifique. La réalisation de ces modifications pourrait permettre l'utilisation de PA1b pour la protection de plantes par transgénèse.

A l'heure actuelle l'utilisation de PA1b n'est envisageable que pour le traitement de petites parcelles ou les jardins des particuliers. Son utilisation à grande échelle, aussi bien en utilisation directe que par transgénèse, nécessite une augmentation conséquente de sa toxicité. Cette augmentation passe par l'optimisation de la séquence de PA1b. Les ressources bioinformatiques (séquençage de génome complet de *Medicago truncatula* ou les bases de données transcriptomique) nous ont permis de révéler une grande diversité de PA1b au sein des légumineuses, dont la toxicité est inconnue. La mise en place du système d'expression hétérologue par transformation transitoire de tabac, va nous permettre de produire les protéines correspondantes à ces séquences et ainsi déterminer leur toxicité propre, et potentiellement nous permettre d'identifier un PA1b à l'activité toxique accrue. La production d'isoformes synthétiques de PA1b nous avait permis dans un premier temps de réaliser une analyse structure fonction, ce qui nous avait permis d'identifier certains des acides aminés primordiaux pour la conservation de l'activité toxique de PA1b.

Nos résultats nous ont permis de montrer l'importance du caractère amphiphile de PA1b, pour le maintien de sa toxicité. Avec l'ensemble des données obtenues sur la relation structure / fonction, et la mise en place du système de production hétérologue, de nouveaux mutants synthétiques pourront être produits, avec pour finalité d'obtenir une molécule avec une activité insecticide accrue.

La recherche de PA1b optimum pourrait être simplifiée par la modélisation de l'interaction PA1b-récepteur. Nous avons présenté un modèle hypothétique du mécanisme d'action de PA1b mais au sein duquel il persiste des interrogations. La création d'une souche de levure double mutante pour les sous-unités c et e de la V-ATPase et complétée par les sous-unités correspondantes de *S. oryzae* pourrait nous permettre dans un premier temps de valider la participation de ces deux sous-unités dans la liaison à PA1b. Par la suite, en effectuant des mutations au sein de ces séquences, nous pourrions affiner nos connaissances sur l'interaction PA1b-récepteur. Par exemple nous pourrions savoir si la sérine en position 83 de la sous-unité c de la V-ATPase est responsable de la liaison à PA1b chez *S. oryzae* sensible. En remplaçant cet acide aminé par un acide aspartique ou un acide glutamique (acide aminé présent en position 83 des insectes sensible à PA1b) nous pourrions déterminer si les *S. oryzae WAA42* conservent leur sensibilité. De manière plus générale, tous les acides aminés des sous-unités e et c impliqués dans la liaison de PA1b pourraient être identifiés, ce qui permettrait une meilleure compréhension de cette interaction.

L'ensemble de ces connaissances nous permettraient de modéliser l'interaction PA1b-récepteur, et d'identifier le mécanisme de résistance présent chez certains insectes. Cette modélisation ouvrira la voie à de nouvelles possibilités, comme la modification de PA1b pour accroître son activité toxique envers les insectes, pour contourner la résistance des chrysomèles, ou même pour créer un PA1b actif contre les V-ATPases de vertébrés. La création d'un dérivé de PA1b ciblant les V-ATPases de vertébrés pourrait être utile pour générer de nouveaux inhibiteurs de V-ATPases utilisables dans le traitement de nombreuses maladies comme le cancer ou l'ostéoporose.

Bibliographie

- [**ALTIERI '05**] MA. Altieri, C. I. Nicholls and M. Fritz, Manage Insects on your farm. *Édition : the Sustainable Agriculture Network*, 2005, 128p.
- [**BALDI '13**] I. Baldi, S. Cordier, X. Coumoul, A. Elbaz, L. Gamet-Payraastre, P. Le Bailly, L. Multigner, R. Rahmani, J. Spinosi and G. Van Maele-Fabry, Pesticides, effets sur la santé. *Les éditions Inserm*, 2013, 1014p.
- [**BECK '13**] B. Beck, E. Brusselman, D. Nuyttens, M. Moens, F. Temmerman, S. Pollet, S. Van Weyenberg and P. Spanoghe. Improving the biocontrol potential of entomopathogenic nematodes against *Mamestra brassicae*: effect of spray application technique, adjuvants and an attractant. *Pest Management Science*, 2013, **70**, 1, pp. 103-112.
- [**BECKER-RITT '12**] A. B. Becker-Ritt and C. R. Carlini, Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides. *Peptide Science*, 2012, **98**, 4, pp. 367-384.
- [**BEYENBACH '06**] K. W. Beyenbach and H. Wiczorek, The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *Journal of Experimental Biology*, 2006, **209**, 4, pp. 577-589.
- [**BLANCO-MUÑOZ '10**] J. Blanco-Muñoz, M. M. Morales, M. Lacasaña, C. Aguilar-Garduño, S. Bassol and M. E. Cebrián, Exposure to organophosphate pesticides and male hormone profile in floriculturist of the state of Morelos, Mexico. *Human reproduction*, 2010, **25**, 7, pp. 1787-1795.
- [**BOCKELMANN '10**] S. Bockelmann, D. Menche, S. Rudolph, T. Bender, S. Grondl, P. von Zezschwitz, S. P. Muench, H. Wiczorek and M. Huss, Archazolid A binds to the equatorial region of the c-ring of the vacuolar H⁺-ATPase. *The Journal of biological chemistry*, 2010, **285**, 49, pp. 38304 -38314.
- [**BOIVIN '01**] G. Boivin, Parasitoïdes et lutte biologique: paradigme ou panacée? *Vertigo-la revue électronique en sciences de l'environnement*, 2001, **2**, 2, pp. 29-35.
- [**BOUCHENAK '13**] M. Bouchenak and M. Lamri-Senhadji, Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: a review. *Journal of medicinal food*, 2013, **16**, 3, pp. 185-198.
- [**BOWMAN '06**] BJ. Bowman, ME. McCall, R. Baertsch and EJ Bowman, A model for the proteolipid ring and bafilomycin/concanamycin-binding site in the vacuolar ATPase of *Neurospora crassa*. *The Journal of biological chemistry*, 2006, **281**, 42, pp. 31885-31893.
- [**BOWMAN '04**] EJ. Bowman, LA. Graham, TH. Stevens and BJ Bowman, The bafilomycin/concanamycin binding site in subunit c of the V-ATPases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 2004, **279**, 6, pp. 33131-33138.
- [**BOWMAN '03**] EJ. Bowman, K. R. Gustafson, BJ. Bowman and M. R. Boyd, Identification of a new chondropsin class of antitumor compound that selectively inhibits V-ATPases. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 45, pp. 44147-44152.
- [**BOWMAN '88**] EJ. Bowman, A. Siebers and K. Altendorf, Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1988, **85**, 21, pp. 7972-7976.
- [**BURTON '11**] M. J. Burton, IR. Mellor, IR. Duce, TG. Davies, LM. Field LM and MS. Williamson, Differential resistance of insect sodium channels with kdr mutations to deltamethrin, permethrin and DDT. *Insect biochemistry and molecular biology*, 2011, **41**, 9, pp. 723-732.

- [CARSON '12] R. Carson, Printemps silencieux. Édition Wildproject, 2012, 496 p.
- [CASIDA '12] J. E. Casida and K. A. Durkin, Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chemico-Biological Interactions*, 2012, **203**, 1, pp. 221-225.
- [CASIDA '13] J. E. Casida and K. A. Durkin, Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual review of entomology*, 2013, **58**, pp. 99-117.
- [CASIDA '04] J. E. Casida and G. B. Quistad, Why insecticides are more toxic to insects than people: the unique toxicology of insects. *Journal of Pesticide Science*, 2004, **29**, 2, pp. 81-86.
- [CHANG '03] J. H. Chang, JY. Choi, BR. Jin, JY. Roh, JA. Olszewski, SJ. Seo, DR. O'Reilly and JH. Je, An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. *Journal of invertebrate pathology*, 2003, **84**, 1, pp. 30-37.
- [CHEN '11] Q. Chen, J. He, W. Phoolcharoen and H. S. Mason, Geminiviral vectors based on bean yellow dwarf virus for production of vaccine antigens and monoclonal antibodies in plants. *Human vaccines*, 2011, **7**, 3, pp. 331-338.
- [CHICHE '04] L. Chiche, A. Heitz, JC. Gelly, J. Gracy, PT. Chau, PT. Ha, JF. Hernandez, and D. Le-Nguyen, Squash inhibitors: from structural motifs to macrocyclic knottins. *Current Protein and Peptide Science*, 2004, **5**, 5, pp. 341-349.
- [CHOUABE '11] C. Chouabe, V. Eyraud, P. Da Silva, I. Rahioui, C. Royer, C. Soulage, R. Bonvallet, M. Huss and F. Gressent, New Mode of Action for a Knottin Protein Bioinsecticide Pea Albumin 1 Subunit b (PA1b) is the first peptidic inhibitor of V-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, **286**, 42, pp. 36291-36296.
- [CLEMENT '85] J. G. Clement, Hormonal consequences of organophosphate poisoning. *Fundamental and Applied Toxicology*, 1985, **5**, 6, pp. 61-77.
- [COHEN '97] GM. Cohen, Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical journal*, 1997, **326**, pp. 1-16.
- [COLGRAVE '04] M. L. Colgrave and D. J. Craik, Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot. *Biochemistry*, 2004, **43**, 20, pp. 5965-5975.
- [CONLAN '12] B. F. Conlan, ML. Colgrave, A. D. Gillon, R. Guarino, D.J. Craik and M. A. Anderson, Insights into processing and cyclization events associated with biosynthesis of the cyclic peptide kalata B1. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, **287**, 33, pp. 28037-28046.
- [CONLAN '11] B. F. Conlan, A. D. Gillon, B. L. Barbeta and M. A. Anderson, Subcellular targeting and biosynthesis of cyclotides in plant cells. *American Journal of Botany*, 2011, **98**, 12, pp. 2018-2026.
- [COOMBS '77] C. Coombs, C. Billings and J. Porter, The effect of yellow split-peas (*Pisum sativum* L.) and other pulses on the productivity of certain strains of *Sitophilus oryzae* L. (Col. Curculionidae) and the ability of other strains to breed thereon. *Journal of Stored Products Research*, 1977, **13**, 2, pp. 53-58.
- [CRAIK '06] D. J. Craik, M. Čemažar, C. K. Wang and N. L. Daly, The cyclotide family of circular miniproteins: nature's combinatorial peptide template. *Peptide Science*, 2006, **84**, 3, pp. 250-266.
- [CRAVEDI '07] J.-P. Cravedi, D. Zalko, J.-F. Savouret, A. Menuet, and B. Jégou, Le concept de perturbation endocrinienne et la santé humaine. *Medecine/Sciences*, 2007, **23**, pp. 198-204.

- [CURTIS '03] M. D. Curtis and U. Grossniklaus, A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology*, 2003, **133**, 2, pp. 462-469.
- [D'Aoust '09] M. A. D'Aoust, P. O. Lavoie, J. Belles-Isles, N. Bechtold, M. Martel and L.-P. Vézina, Transient expression of antibodies in plants using syringe agroinfiltration. *Recombinant Proteins From Plants*, 2009, **483**, pp. 41-50.
- [DA SILVA '10] P. Da Silva, I. Rahioui, C. Laugier, L. Jouvensal, H. Meudal, C. Chouabe, AF. Delmas and F. Gressent, Molecular requirements for the insecticidal activity of the plant peptide pea albumin 1 subunit b (PA1b). *Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**, 43, pp. 32689-32694.
- [DA SILVA '09] P. Da Silva, A. Strzepa, L. Jouvensal, I. Rahioui, F. Gressent, and AF. Delmas, A folded and functional synthetic PA1b: An interlocked entomotoxic miniprotein. *Biopolymères* 2009, **92**, 5, pp. 436-444.
- [DAHL '12] W. J. Dahl, L. M. Foster and R. T. Tyler, Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). *British Journal of Nutrition*, 2012, **108**, S1, pp. S3-S10.
- [DALY '11] N. L. Daly and D. J. Craik, Bioactive cystine knot proteins. *Current opinion in chemical biology*, 2011, **15**, 3, pp. 362-368.
- [DAVID '05] J.-P. David, C. Strode, J. Vontas, D. Nikou, A. Vaughan, PM. Pignatelli, C. Louis, J. Hemingway and H. Ranson, The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 2005, **102**, 11, pp. 4080-4084.
- [DE PINTO '10] V. De Pinto, A. Messina, D. J. Lane and A. Lawen, Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane. *Febs Letters*, 2010, **584**, 9, pp. 1793-1799.
- [DEDET '13] J.-P. Dedet, Épidémiologie des leishmanioses autochtones en France métropolitaine et d'outre-mer. *La Presse Médicale*, 2013, **42**, 11, pp. 1469-1481.
- [DELOBEL '93] B. Delobel and A. Grenier, Effect of non-cereal food on cereal weevils and tamarind pod weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 1993, **29**, 1, pp. 7-14.
- [DELOBEL '98] B. Delobel, A. Grenier, J. Gueguen, E. Ferrasson and M. Mbailao, Utilisation d'un polypeptide dérivé d'une albumine PA1b de légumineuse comme insecticide. *French patent*, 1998, 98 05877.
- [DERBYSHIRE '76] E. Derbyshire, D. Wright and D. Boulter, Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, 1976, **15**, 1, pp. 3-24.
- [DU '13] Y. Du, Y. Nomura, G. Satar, Z. Hu, R. Nauen, SY. He, BS. Zhorov and Dong K, Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, **110**, 29, pp. 11785-11790.
- [DUN '08] X.-P. Dun, F.-F. Li, J.-H. Wang and Z.-W. Chen, The effect of pea albumin 1F on glucose metabolism in mice. *Peptides*, 2008, **29**, 6, pp. 891-897.
- [DUN '07] X. P. Dun, JH. Wang, L. Chen, J. Lu, FF. Li, YY. Zhao, E. Cederlund, G. Bryzgalova, S. Efendic, H. Jörnvall, ZW. Chen and T. Bergman, Activity of the plant peptide aglycin in mammalian systems. *Febs Journal*, 2007, **274**, 3, pp. 751-759.
- [DUTTON '01] J. L. Dutton and D. J. Craik, alpha Conotoxins nicotinic acetylcholine receptor antagonists as pharmacological tools and potential drug leads. *Current medicinal chemistry*, 2001, **8**, 4, pp. 327-344.

- [EALING '94] P. M. Ealing, K. R. Hancock and D. W. White, Expression of the pea albumin 1 gene in transgenic white clover and tobacco. *Transgenic research*, 1994, **3**, 6, pp. 344-354.
- [EYRAUD '13] V. Eyraud, L. Karaki, I. Rahioui, C. Sivignon, P. Da Silva, Y. Rahbé, C. Royer and F. Gressent, Expression and biological activity of the cystine knot bioinsecticide PA1b (Pea Albumin 1 subunit b). *Plos One*, 2013, **8**, 12, e81619.
- [FINBOW '94] M. E. Finbow, S.F. Goodwin, L. Meagher, N.J. Lane, J. Keen, J.B. Findlay and K. Kaiser, Evidence that the 16 kDa proteolipid (subunit c) of the vacuolar H(+)-ATPase and ductin from gap junctions are the same polypeptide in *Drosophila* and *Manduca*: molecular cloning of the Vha16k gene from *Drosophila*. *Journal of Cell Science*, 1994, **107**, 7, pp. 1817-1824.
- [FRANZ '06] A. W. Franz, I. Sanchez-Vargas, Z.N. Adelman, C.D. Blair, B.J. Beaty, A.A. James and K.E. Olson, Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2006, **103**, 11, pp. 4198-4203.
- [FRATTINI '00] A. Frattini, P.J. Orchard, C. Sobacchi, S. Giliani, M. Abinun, J.P. Mattsson, D.J. Keeling, A.K. Andersson, P. Wallbrandt, L. Zecca, L.D. Notarangelo, P. Vezzoni and A. Villa, Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nature Genetics*, 2000, **25**, 3, pp. 343-346.
- [FRY '95] D. M. Fry, Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 1995, **103**, 7, pp. 165-171.
- [FU '10] G. Fu, R.S. Lees, D. Nimmo, D. Aw, L. Jin, P. Gray, T.U. Berendonk, H. White-Cooper, S. Scaife, H. Kim Phuc, O. Marinotti, N. Jasinskiene, A.A. James and L. Alphey, Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2010, **107**, 10, pp. 4550-4554.
- [FUKUTO '90] T. R. Fukuto, Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 1990, **87**, pp. 245-254.
- [GAGLIARDI '98] S. Gagliardi, G. Nadler, E. Consolandi, C. Parini, M. Morvan, M.N. Legave, P. Belfiore, A. Zocchetti, G.D. Clarke, I. James, P. Nambi, M. Gowen and C. Farina, 5-(5, 6-Dichloro-2-indolyl)-2-methoxy-2, 4-pentadienamides: novel and selective inhibitors of the vacuolar H⁺-ATPase of osteoclasts with bone antiresorptive activity. *Journal of medicinal chemistry*, 1998, **41**, 10, pp. 1568-1573.
- [GATEHOUSE '85] J. Gatehouse, J. Gilroy, M. Hoque and R. Croy, Purification, properties and amino acid sequence of a low-Mr abundant seed protein from pea (*Pisum sativum* L.). *The Biochemical Journal*, 1985, **225**, pp. 239-247.
- [GRAHAM '03] L. A. Graham, A. R. Flannery and T. H. Stevens, Structure and assembly of the yeast V-ATPase. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2003, **35**, 4, pp. 301-312.
- [GRENIER '97] A.-M. Grenier, M. Mbaiguinam and B. Delobel, Genetical analysis of the ability of the rice weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae) to breed on split peas. *Heredity*, 1997, **79**, 1, pp. 15-23.
- [GRESSENT '07] F. Gressent, G. Duport, I. Rahioui, Y. Pauchet, P. Bolland, O. Specty and Y. Rahbe, Biological activity and binding site characteristics of the PA1b entomotoxin on insects from different orders. *Journal of Insect Science*, 2007, **7**, pp. 1-10.
- [GRESSENT '03] F. Gressent, I. Rahioui and Y. Rahbe, Characterization of a high-affinity binding site for the pea albumin 1b entomotoxin in the weevil *Sitophilus*. *European Journal of Biochemistry*, 2003, **270**, 11, pp. 2429-2425.

- [GURTU '97] V. Gurtu, S. R. Kain and G. Zhang, Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Analytical biochemistry*, 1997, **251**, 1, pp. 98-102.
- [HANADA '04] K. Hanada and H. Hirano, Interaction of a 43-kDa receptor-like protein with a 4-kDa hormone-like peptide in soybean. *Biochemistry*, 2004, **43**, 38, pp. 12105-12112.
- [HANCOCK '94] K. R. Hancock, P. M. Ealing and D. W. White, Identification of sulphur-rich proteins which resist rumen degradation and are hydrolysed rapidly by intestinal proteases. *British Journal of Nutrition*, 1994, **72**, 06, pp. 855-863.
- [HEMINGWAY '04] J. Hemingway, N. J. Hawkes, L. McCarroll and H. Ranson, The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 2004, **34**, 7, pp. 653-665.
- [HIGGINS '86] T. Higgins, P.M. Chandler, P.J. Randall, D. Spencer, L.R. Beach, R.J. Blagrove, A.A. Kortt and A.S. Inglis, Gene structure, protein structure, and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 1986, **261**, 24, pp. 11124-11130.
- [HINTON '09] A. Hinton, S. Bond and M. Forgac, V-ATPase functions in normal and disease processes, *European Journal of Physiology*, 2009, **457**, 3, pp. 589-598.
- [HOLLOWAY '85] G.J. Holloway and R. H. Smith, Inheritance of the ability of *Sitophilus oryzae* (L.)(Coleoptera: Curculionidae) to feed and breed on yellow split-pea (*Pisum sativum*). *Bulletin of entomological research*, 1985, **75**, 03, pp. 367-376.
- [HONG '06] J. Hong, Y. Nakano, A. Yokomakura, K. Ishihara, S. Kim, Y.S. Kang and K., Ohuchi, Nitric oxide production by the vacuolar-type (H⁺)-ATPase inhibitors bafilomycin A1 and concanamycin A and its possible role in apoptosis in RAW 264.7 cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2006, **319**, 2, pp. 672-681.
- [HU '07] Z. Hu, X. Dun, M. Zhang, H. Zhu, L. Xie, Z. Wu, Z. Chen and T. Xu, PA1b, a plant peptide, induces intracellular [Ca²⁺] increase via Ca²⁺ influx through the L-type Ca²⁺ channel and triggers secretion in pancreatic β cells. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2007, **50**, 3, pp. 285-291.
- [HUSS '05] M. Huss, F. Sasse, B. Kunze, R.Jansen, H. Steinmetz, G. Ingenhorst, A. Zeeck and H. Wiczorek, Archazolid and apicularen: novel specific V-ATPase inhibitors. *BMC biochemistry*, 2005, **6**, 1, pp. 13-23.
- [HUSS '07] M. Huss and H. Wiczorek, Influence of ATP and ADP on dissociation of the V-ATPase into its V1 and VO complexes. *Febs Letters*, 2007, **581**, 29, pp. 5566-5572.
- [HUSS '09] M. Huss and H. Wiczorek, Inhibitors of V-ATPases: old and new players. *Journal of Experimental Biology*, 2009, **212**, 3, pp. 341-346.
- [IMBAHALE '12] S. S. Imbahale, A. Githeko, W. R. Mukabana and W. Takken, Integrated mosquito larval source management reduces larval numbers in two highland villages in western Kenya. *BMC public health*, 2012, **12**, 1, pp. 362-369.
- [IMFELD '12] G. Imfeld and S. Vuilleumier, Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: a critical review. *European Journal of Soil Biology*, 2012, **49**, pp. 22-30.
- [JAMES '09] C. James, Brief 41: Global status of commercialized biotech/GM crops: 2009 (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Application, Ithaca, New-York. Brief, 2009).

- [JANSEN '12] E. J. Jansen, NH. van Bakel, NF. Olde Loohuis, TG. Hafmans, T. Arentsen, AJ. Coenen, WJ. Scheenen and GJ. Martens, Identification of domains within the V-ATPase accessory subunit Ac45 involved in V-ATPase transport and Ca²⁺-dependent exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, **287**, 33, pp. 27537-27546.
- [JOUVENSALE '03] L. Jouvensal, L. Quillien, E. Ferrasson, Y. Rahbé, J. Guéguen and F. Vovelle, PA1b, an insecticidal protein extracted from pea seeds (*Pisum sativum*): 1H-2-D NMR study and molecular modeling. *Biochemistry*, 2003, **42**, 41, pp. 11915-11923.
- [KARAKI '14] L. Karaki, P. Da Silva, F. Rizk, V. Eyraud, F. Gressent, C. Sivignon, I. Rahioui, M. Cerutti, Y. Rahbé and C. Royer, Expression, purification and biological activity of a cystine knot bioinsecticide PA1b in baculovirus system. soumis.
- [KARAKI '14] L. Karaki, P. Da Silva, F. Rizk, C. Chouabe, N. Chantret, V. Eyraud, F. Gressent, C. Sivignon, I. Rahioui, C. Brocheir-Armanet, Y. Rahbé and C. Royer, Genome-wide identification, characterization, phylogenetic analysis and biological activities of the small multigenic insecticidal Albumin 1 (b) family in *Medicago truncatula*. soumis.
- [KARET '99] F. E. Karet, KE. Finberg, RD. Nelson, A. Nayir, H. Mocan et al., Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nature Genetics*, 1999, **21**, 1, pp. 84-90.
- [KIRST '10] H. A. Kirst, The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural products research. *The Journal of antibiotics*, 2010, **63**, 3, pp. 101-111.
- [KITAGAWA '08] N. Kitagawa, H. Mazon, A. J. Heck and S. Wilkens, Stoichiometry of the peripheral stalk subunits E and G of yeast V1-ATPase determined by mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, **283**, 6, pp. 3329-3337.
- [KITRON '89] U. Kitron and A. Spielman, Suppression of transmission of malaria through source reduction: antianopheline measures applied in Israel, the United States, and Italy. *Reviews of infectious diseases*, 1989, **11**, 3, pp. 391-406.
- [KNIGHT '12] A. J. Knight and C. A. Behm, Minireview: The role of the vacuolar ATPase in nematodes. *Experimental Parasitology*, 2012, **132**, 1, pp. 47-55.
- [KONCZ '86] C. Koncz and J. Schell, The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics MGG*, 1986, **204**, 3, pp. 383.
- [KOUREAS '12] M. Koureas, A. Tsakalof, A. Tsatsakis and C. Hadjichristodoulou, Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. *Toxicology letters*, 2012, **210**, 2, pp. 155-168.
- [LE GALL '05] M. Le Gall, L. Quillien, J. Guéguen, H. Rogniaux and B. Sève, Identification of dietary and endogenous ileal protein losses in pigs by immunoblotting and mass spectrometry. *The Journal of nutrition*, 2005, **135**, 5, pp. 1215-1222.
- [LE NGUYEN '90] D. Le Nguyen, A. Heitz, L. Chiche, B. Castro, RA. Boigegrain, A. Favel and MA. Coletti-Previero, Molecular recognition between serine proteases and new bioactive microproteins with a knotted structure. *Biochimie*, 1990, **72**, 6, pp. 431-435.
- [LI '07] X. Li, M. A. Schuler and MR. Berenbaum, Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology.*, 2007, **52**, pp. 231-253.

- [LINDBLADE '00] K. A. Lindblade, E. D. Walker, A. W. Onapa, J. Katungu and M. L. Wilson, Land use change alters malaria transmission parameters by modifying temperature in a highland area of Uganda. *Tropical Medicine & International Health*, 2000, **5**, 4, pp. 263-274.
- [LINK '01] M. Link and D. Harrison, To live or die-a cells choice. *Essays in Biochemistry*, 2001, **37**, pp. 109-120.
- [LOUIS '04] S. Louis, Diversité structurale et d'activité biologique des Albumines entomotoxiques de type 1b des graines de Légumineuses. Thèse INSA de Lyon, 2004.
- [LOUIS '07] S. Louis, B. Delobel, F. Gressent, G. Duport, O. Diol, I. Rahioui, H. Charles and Rahbé Y. Broad screening of the legume family for variability in seed insecticidal activities and for the occurrence of the A1b-like knottin peptide entomotoxins. *Phytochemistry*, 2007, **68**, 4, pp. 521-537.
- [LU '07] M. Lu, D. Ammar, H. Ives, F. Albrecht and S. L. Gluck, Physical interaction between aldolase and vacuolar H⁺-ATPase is essential for the assembly and activity of the proton pump. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**, 34, pp. 24495-24503.
- [LU '98] X. Lu, H. Yu, S.-H. Liu, F. M. Brodsky and B. M. Peterlin, Interactions between HIV1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4. *Immunity*, 1998, **8**, 5, pp. 647-656.
- [MA '12] L. Ma, E. Lukasik, F. Gawehns and F. L. Takken, The use of agroinfiltration for transient expression of plant resistance and fungal effector proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Methods in Molecular Biology*, 2012, pp. 61-74.
- [MANAHAN '02] S. E. Manahan, *Toxicological chemistry and biochemistry*. 3rd édition. Lewis, London. CRC Press, 2002.
- [MARTAU '98] T. Martau and F. Romer, Degeneration of moulting glands in male crickets. *Journal of insect physiology*, 1998, **44**, 10, pp. 981-889.
- [MATSUDA '09] K. Matsuda, S. Kanaoka, M. Akamatsu and D. B. Sattelle, Diverse actions and target-site selectivity of neonicotinoids: structural insights. *Molecular pharmacology*, 2009, **76**, 1, pp. 1-10.
- [MCGRAW '13a] E. A. McGraw and S. L. O'Neill, Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature Reviews Microbiology*, 2013a, **11**, 3, pp. 181-193.
- [MENESES-ACOSTA '01] A. Meneses-Acosta, R. Z. Mendonça, H. Merchant, L. Covarrubias and O. T. Ramirez, Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 2001, **72**, 4, pp. 441-457.
- [MERZENDORFER '99] H. Merzendorfer, M. Huss, R. Schmid, W. R. Harvey and H. Wieczorek, A novel insect V-ATPase subunit M9. 7 is glycosylated extensively. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**, 24, pp. 17372-17378.
- [MERZENDORFER '00] H. Merzendorfer, S. Reineke, XF. Zhao, B. Jacobmeier, WR. Harvey and H. Wieczorek, The multigene family of the tobacco hornworm V-ATPase: novel subunits a, C, D, H, and putative isoforms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1467**, 2, pp. 369-379.
- [MOORE S J '10] SJ. Moore, C. Lun Leung and JR. Cochran, Knottins: disulfide-bonded therapeutic and diagnostic peptides. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2010, **9**, 1 pp 3-11.
- [MORETTO '98] A. Moretto and M. Lotti, Poisoning by organophosphorus insecticides and sensory neuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1998, **64**, 4, pp. 463-468.

- [MORTON '98] R. Morton, A. Ellery and T. Higgins, Downstream elements from the pea albumin 1 gene confer sulfur responsiveness on a reporter gene. *Molecular and General Genetics MGG*, 1998, **259**, 3, pp. 309-316.
- [MUENCH '14] S. Muench, S. Rawson, V. Eyraud, A. Delmas, P. Da Silva, C. Phillips J. Trinick, M. Harrison, F. Gressent and M. Huss, Characterisation of PA1b binding to the vacuolar ATPase reveals the basis for its insecticidal action and the location of subunit e.. soumis.
- [MUENCH '09] S. P. Muench, M. Huss, CF. Song, C. Phillips, H. Wieczorek, J. Trinick and MA. Harrison, Cryo-electron microscopy of the vacuolar ATPase motor reveals its mechanical and regulatory complexity. *Journal of molecular biology*, 2009, **386**, 4, pp. 989-999.
- [MUENCH '11] S. P. Muench, J. Trinick and M. A. Harrison, Structural divergence of the rotary ATPases. *Quarterly reviews of biophysics*, 2011, **44**, 03, pp. 311-356.
- [MUROI '94] M. Muroi, N. Shiragami and A. Takatsuki, Destruxin B, a Specific and Readily Reversible Inhibitor of Vacuolar-Type H Translocating ATPase. *Biochemical and biophysical research communications*, 1994, **205**, 2, pp. 1358-1365.
- [NAKASHIMA '03] S. Nakashima, Y. Hiraku, S. Tada-Oikawa, T. Hishita, EC. Gabazza, S. Tamaki, I. Imoto, Y. Adachi and S. Kawanishi, Vacuolar H⁺-ATPase inhibitor induces apoptosis via lysosomal dysfunction in the human gastric cancer cell line MKN-1. *Journal of biochemistry*, 2003, **134**, 3, pp. 359-364.
- [NAUEN '06] R. Nauen, Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor. *Pest management science*, 2006, **62**, 8, pp. 690-692.
- [NELSON '89] N. Nelson, Structure, molecular genetics, and evolution of vacuolar H⁺-ATPases. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 1989, **21**, 5, pp. 553-571.
- [NELSON '99] N. Nelson and W. R. Harvey, Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiological reviews*, 1999, **79**, 2, pp. 361-385.
- [NICHOLSON '07] G. M. Nicholson, Fighting the global pest problem: Preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon*, 2007, **49**, 4, pp. 413-422.
- [NIELSEN-LEROUX '12] C. Nielsen-LeRoux, S. Gaudriault, N. Ramarao, D. Lereclus and A. Givaudan, How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus Photorhabdus* occupy their hosts. *Current opinion in microbiology*, 2012, **15**, 3, pp. 220-231.
- [OKORIE '10] A. Okorie and O. Abiodun, Laboratory evaluation of the biocontrol potential of *Aphyosemion gularis* against Anopheles larvae. *Journal of Vector Borne Diseases*, 2010, **47**, 3, pp. 181-184.
- [ORTELLI '03] F. Ortelli, L. Rossiter, J. Vontas, H. Ranson and J. Hemingway, Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal*, 2003, **373**, pp. 957-963.
- [OSTERESCH '12] C. Osteresch, T. Bender, S. Grond, P. von Zezschwitz, B. Kunze, R. Jansen, M. Huss and H. Wieczorek, The binding site of the V-ATPase inhibitor apicularen is in the vicinity of those for bafilomycin and archazolid. *The Journal of biological chemistry*, 2012, **287**, 38, pp. 31866-31876.
- [PALLAGHY '94] PK. Pallaghy, KJ. Nielsen, DJ. Craik and RS. Norton, A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple stranded β sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Science*, 1994, **3**, 10, pp. 1833-1839.

- [**PAUCHET '10**] Y. Pauchet, P. Wilkinson, R. Chauhan and R.H. French-Constant, Diversity of beetle genes encoding novel plant cell wall degrading enzymes. *Plos One*, 2010, **5**, 12, pp. e15635.
- [**PERZOV '01**] N. Perzov, V. Padler-Karavani, H. Nelson and N. Nelson, Features of V-ATPases that distinguish them from F-ATPases. *Febs Letters*, 2001, **504**, 3, pp. 223-228.
- [**PETIT '06**] J. Petit, Etude Structure/Fonction d'une Albumine Entomotoxique de Type A1b du Pois Chez le riz: Application à la Protection Contre le Ravageur Sitophilus Oryzae. Ph. D. Thèse, Université de Montpellier II, Montpellier, France, 2006.
- [**POPHAM '97**] H.J. Popham, Y. Li and L.K. Miller, Genetic Improvement of *Helicoverpa zea* Nuclear Polyhedrosis Virus as a Biopesticide. *Biological Control*, 1997, **10**, 2, pp. 83-91.
- [**POTH '11**] A.G. Poth, M.L. Colgrave, R.E. Lyons, N.L. Daly and D.J. Craik, Discovery of an unusual biosynthetic origin for circular proteins in legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, **108**, 25, pp. 10127-10132.
- [**PRIKHOD'KO '98**] G.G. Prikhod'ko, H. Popham, T. Felcetto, D. Ostlind, V. Warren M. Smith, V. Garsky, J. Warmke, C. Cohen, L.K. Miller, Effects of simultaneous expression of two sodium channel toxin genes on the properties of baculoviruses as biopesticides. *Biological Control*, 1998, **12**, 1, pp. 66-78.
- [**PRIKHOD'KO '96**] G.G. Prikhod'ko, Properties of three baculovirus-expressing genes that encode insect-selective toxins: μ -Aga-IV, As II, and Sh I. *Biological Control*, 1996, **7**, 2, pp. 236.
- [**RAHIOUI '07**] I. Rahioui, C. Laugier, S. Balmand, P. Da Silva, Y. Rahbe and F. Gressent, Toxicity, binding and internalization of the pea-A1b entomotoxin in Sf9 cells. *Biochimie*, 2007, **89**, 12, pp. 1539-1543.
- [**RAHIOUI '14**] I. Rahioui, V. Eyraud, L. Karaki, F. Sasse, M. Carre-Pierrat, M. Qin A, Zheng, C. Sivignon, C. Royer, P. Da Silva and F. Gressent, The effect of the biopesticide PA1b (Pea Albumin 1b) is strictly limited to the insects. 2014. soumis.
- [**RAYMOND-DELPECH '05**] V. Raymond-Delpech, K. Matsuda, B. M. Sattelle, J. J. Rauh and B. Sattelle, Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invertebrate Neuroscience*, 2005, **5**, 3-4, pp. 119-133.
- [**RICHARDSON '02**] H. Richardson and S. Kumar, Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death. *Journal of Immunological Methods*, 2002, **265**, 1, pp. 21-38.
- [**ROCHELEAU '93**] T. A. Rocheleau, J. C. Steichen and A. E. Chalmers, A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Letters to nature*, 1993, **346**, 449-451.
- [**ROSENGREN '02**] K.J. Rosengren, D. Wilson, N.L. Daly, P.F. Alewood and D.J. Craik, Solution structures of the cis- and trans-Pro30 isomers of a novel 38-residue toxin from the venom of *Hadronyche infensa* sp. that contains a cystine-knot motif within its four disulfide bonds. *Biochemistry*, 2002, **41**, 10, pp. 3294-3301.
- [**SALVESEN '97**] G.S. Salvesen and V.M. Dixit, Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 1997, **91**, 4, pp. 443-446.
- [**SANDAHL '04**] J.F. Sandahl, D.H. Baldwin, J.J. Jenkins and N.L. Scholz, Odor-evoked field potentials as indicators of sublethal neurotoxicity in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to copper, chlorpyrifos, or esfenvalerate. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2004, **61**, 3, pp. 404-413.
- [**SASKA '07**] I. Saska, A.D. Gillon, N. Hatsugai, R.G. Dietzgen, I. Hara-Nishimura, M.A. Anderson and D.J. Craik, An asparaginyl endopeptidase mediates in vivo protein

- backbone cyclization . *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**, 40, pp. 29721-29728.
- [SAUTIN '05] YY. Sautin, M. Lu, A. Gaugler, L. Zhang and SL. Gluck, Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated effects of glucose on vacuolar H⁺-ATPase assembly, translocation, and acidification of intracellular compartments in renal epithelial cells. *Molecular and cellular biology*, 2005, **25**, 2, pp. 575-589.
- [SCHROEDER '84] HE. Schroeder, Major albumins of *Pisum* cotyledons. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1984, **35**, 2, pp. 191-198.
- [SENNOUNE '04] S. R. Sennoune, K. Bakunts, GM. Martínez, JL Chua-Tuan, Y. Kebir, MN. Attaya, R. and R. Martínez-Zaguilán, Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2004, **286**, 6, pp. 1443-1452.
- [SHANG '05] C. Shang, H. Sassa and H. Hirano, The role of glycosylation in the function of a 48-kDa glycoprotein from carrot. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005, **328**, 1, pp. 144-149.
- [SHANG '04] C. Shang, T. Shibahara, K. Hanada, Y. Iwafune and H. Hirano, Mass spectrometric analysis of posttranslational modifications of a carrot extracellular glycoprotein. *Biochemistry*, 2004, **43**, 20, pp. 6281-6292.
- [SODERLUND '91] DM. Soderlund and JR. Bloomquist. Molecular mechanisms of insecticide resistance, *Pesticide resistance in arthropods*. Edition Springer, 1991, pp. 58-96.
- [SPENCER '88] D. Spencer, T. Higgins, M. Freer, H. Dove and J. Coombe, Monitoring the fate of dietary proteins in rumen fluid using gel electrophoresis. *British Journal of Nutrition*, 1988, **60**, 02, pp. 241-247.
- [STEWART '12] AG. Stewart and D. Stock, Priming a molecular motor for disassembly. *Structure*, 2012, **20**, 11, pp. 1799-1800.
- [SUN '02] X. Sun, X. Chen, Z. Zhang, H. Wang, FJ. Bianchi, H. Peng, JM. Vlak and Z. Hu, Bollworm responses to release of genetically modified *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedroviruses in cotton. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2002, **81**, 2, pp. 63-69.
- [TEFERA '11] T. Tefera, F. Kanampiu, H. De Groote, J. Hellin, S. Mugo, S. Kimenju, Y. Beyene, PM. Boddupalli, B. Shiferaw and M. Banziger The metal silo: An effective grain storage technology for reducing post-harvest insect and pathogen losses in maize while improving smallholder farmers' food security in developing countries. *Crop Protection*, 2011, **30**, 3, pp. 240-245.
- [TOEI '10] M. Toei, R. Saum and M. Forgac, Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochemistry*, 2010, **49**, 23, pp. 4715-4723.
- [TOYOMURA '03] T. Toyomura, Y. Murata, A. Yamamoto, T. Oka, GH. Sun-Wada, Y. Wada and M. Futai, From Lysosomes to the Plasma Membrane Localization of Vacuolar type H⁺ ATPase with the $\alpha 3$ isoform during osteoclast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 24, pp. 22023-22030.
- [VAIS '00] H. Vais, MS. Williamson, SJ. Goodson, AL. Devonshire, JW. Warmke, PN. Usherwood and CJ. Cohen, Activation of *Drosophila* Sodium Channels Promotes Modification by Deltamethrin Reductions in Affinity Caused by Knock-down Resistance Mutations. *The Journal of general physiology*, 2000, **115**, 3, pp. 305-318.
- [VAN SCOY '13] AR. Van Scoy, M. Yue, X. Deng and RS. Tjeerdema, Environmental Fate and Toxicology of Methomyl. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. 2013, **222**, pp. 93-109.

- [VAUGHAN '97] A. Vaughan, N. Hawkes and J. Hemingway, Co-amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Biochemical Journal*, 1997, **325**,2, pp. 359-365.
- [VAYSSIÈRE '43] M. Vayssière, Le charançon du riz et les légumes secs. *Comptes-Rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, 1943, **29**, pp. 449-453.
- [VETSCH '00] M. Vetsch, I. Janzik and A. Schaller, Characterization of prosystemin expressed in the baculovirus/insect cell system reveals biological activity of the systemin precursor. *Planta*, 2000, **211**, 1, pp. 91-97.
- [VOINNET '03] O. Voinnet, S. Rivas, P. Mestre and D. Baulcombe, An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal*, 2003, **33**, 5, pp. 949-956.
- [VON SCHWARZENBERG '13] K. von Schwarzenberg, RM. Wiedmann, P. Oak, S. Schulz, H. Zischka, G. Wanner, T. Efferth, D. Trauner and AM. Vollmar, Mode of cell death induction by pharmacological vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**, 2, pp. 1385-1396.
- [WANG Y '05] Y. Wang, T. Inoue and M. Forgac, Subunit a of the yeast V-ATPase participates in binding of bafilomycin. *The Journal of biological chemistry*, 2005, **280**, 49, pp. 40481-40488.
- [WATANABE '94] Y. Watanabe, SF. Barbashov, S. Komatsu, AM. Hemmings, M. Miyagi, S. Tsunasawa and H. Hirano, A Peptide that Stimulates Phosphorylation of the Plant Insulin-Binding Protein. *European Journal of Biochemistry*, 1994, **224**, 1, pp. 167-172.
- [WIECZOREK '09] H. Wieczorek, K. W. Beyenbach, M. Huss and O. Vitavska, Vacuolar-type proton pumps in insect epithelia. *Journal of Experimental Biology*, 2009, **212**, 11, pp. 1611-1619.
- [WIECZOREK '99] H. Wieczorek, D. Brown, S. Grinstein, J. Ehrenfeld and WR. Harvey, Animal plasma membrane energization by proton-motive V-ATPases. *Bioessays*, 1999, **21**, 8, pp. 637-648.
- [WIECZOREK '03] H. Wieczorek, H. Huss, H. Merzendorfer, S. Reineke, O. Vitavska and W. Zeiske, The insect plasma membrane H⁺ V-ATPase: intra-, inter-, and supramolecular aspects. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2003, **35**, 4, pp. 359-366.
- [WILKENS '05] S. Wilkens, Rotary molecular motors. *Advances in protein chemistry*, 2005, **71**, pp. 345-382.
- [WILKENS '99] S. Wilkens, E. Vasilyeva and M. Forgac, Structure of the vacuolar ATPase by electron microscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**, 45, pp. 31804-31801.
- [WITZGALL '10] P. Witzgall, P. Kirsch and A. Cork, Sex pheromones and their impact on pest management. *Journal of chemical ecology*, 2010, **36**, 1, pp. 80-100.
- [WOLF '99] BB. Wolf, M. Schuler, F. Echeverri and DR. Green, Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**, 43, pp. 30651-30656.
- [WYDRO '06] M. Wydro, E. Kozubek and P. Lehmann, Optimization of transient Agrobacterium-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochimica Polonica*, 2006, **53**, 2, pp. 289-298.
- [XIE XS '04] Xie XS, D. Padron, X. Liao, J. Wang, MG. Roth and JK. De Brabander, Salicylhalamide A inhibits the V0 sector of the V-ATPase through a mechanism

- distinct from bafilomycin A1. *The Journal of biological chemistry*, 2004, **279**, 19, pp. 19755-19763.
- [**YAMAZAKI '03**] T. Yamazaki, M. Takaoka, E. Katoh, K. Hanada, M. Sakita, K. Sakata, Y. Nishiuchi and H. Hirano, A possible physiological function and the tertiary structure of a 4kDa peptide in legumes. *European Journal of Biochemistry*, 2003, **270**, 6, pp. 1269-1276.
- [**ZHANG '13**] Y. Zhang, M. Fernandez-Aparicio, EK. Wafula, M. Das, Y. Jiao, NJ. Wickett, LA. Honaas, PE. Ralph, MF. Wojciechowski, MO. Timko, JI. Yoder, JH. Westwood and CW. Depamphilis, Evolution of a horizontally acquired legume gene, albumin 1, in the parasitic plant *Phelipanche aegyptiaca* and related species. *BMC evolutionary biology*, 2013, **13**, 1, pp. 48-61.

Annexes

Liste des amorces utilisées dans ce travail, nom des gènes ou ADNc amplifiés, et conditions de PCR

Nom du gène/ADNc amplifié	Matrice ADN	Couple d'amorces	Séquence	Tm en °C	Taille de l'amplification attendue (pb)
Acc45 (<i>S. oryzae</i>)	ADNc de <i>S. oryzae</i>	Ac45 F1 Ac45 R1	5' GTCAATCCGAATTTGTCCCTGTG 3' 5' AAGGAAGGCTTTCACACTACAGTGG 3'	57	1406
V-AT Pase, V0, sous-unité c'' (<i>S. oryzae</i>)	ADNc de <i>S. oryzae</i>	V-ATPase c'' Sito F1 V-ATPase c'' Sito R1	5'CCTTCGIGTTATGTGTACGGTTC 3' 5'GTCAAGAGGCAATATGCAAAGC 3'	56	827
VDAC (<i>Sitophilus oryzae</i>)	ADNc de <i>S. oryzae</i>	VDAC F1 VDAC R1	5'GCGTTTTCGATTTTGTGCTG 3' 5'CCAGTCCCTTTGCCCTTTTG 3'	58	1231
PA1 BamHI/SacI (CAEOO467)	pGMEM-T PA1 Corinne Royer (BF2I, INRA/INSA de Lyon)	PA1F SacI PA1R BamHI	5'ATGAGCTCTTAAGCAGTGAAACACTC 3' 5' ATTGGATCCATGGCTTCCGTT 3'	57	410
PA1b BamHI/SacI (CAEOO467)	pGMEM-T PA1 Corinne Royer (BF2I, INRA/INSA de Lyon)	PA1bF Sac I PA1bR BamHI	5'ATGAGCTCTTATCCAGATGGATTTCTGC 3' 5' AAGGATCCATGGCAAGCTGCAATGGG 3'	57	133
Ps-PA1b BamHI/SacI (CAEOO467)	pCR2.1 PA1 BamHI/SacI	PA1bF Sac I PA1R BamHI	5'ATGAGCTCTTATCCAGATGGATTTCTGC 3' 5'ATTGGATCCATGGCTTCCGTT 3'	60	209
Ps-PA1b-pp1 BamHI/SacI (CAEOO467)	pCR2.1 PA1 BamHI/SacI	PA1bF+pp1 SacI PA1R BamHI	5'CTGAGCTCTTAATTCCCCTTCAAGAAAACCTCC 3' 5'ATTGGATCCATGGCTTCCGTT 3'	60	227
Ps-PA1b-pp1-PA1a BamHI/SacI (CAEOO467)	pCR2.1 PA1 BamHI/SacI	PA1aF SacI PA1R BamHI	5'CTGAGCTCTTAGTCTTTTGGGGTAATCTTAG 3' 5'ATTGGATCCATGGCTTCCGTT 3'	60	389

Annexes

Gène PA1 BamHI/SacI (CAB82859)	ADNc de <i>P. sativum</i>	PA1Sac1F2 : PA1BamH1R2 :	5' ATGAGCTCTTAaGCAGtggaacactc 3' 5' ATTGGATCCATGGCTTCCGTT 3'	55	493
PCR mutation SnaB1 n°1 dans PA1 (CAEOO467)	pCR2.1 PA1 BamHI/SacI	K7 SnaB1 n°2 PA1R BamHI (n°3)	5' GCAGCTTGCTGCTCCTACGTATTT 3' 5' ATTGGATCCATGGCTTCCGTT 3'	50	81
PCR mutation SnaB1 n°2 dans PA1 (CAEOO467)	pCR2.1 PA1 BamHI/SacI	K7 SnaB1 n°1 PA1F Sac1 (n°4)	5' AAATACGTAGGAGCAGCAAGCTGC 3' 5'ATGAGCTCTTAAGCAGTGGAAACACTC 3'	50	347
PCR mutation SnaB1 n°3 dans PA1 (CAEOO467)	PCR mutation SnaB1 n°1 dans PA1 + PCR mutation SnaB1 n°2 dans PA1	PA1F Sac1 (n°4) PA1R BamHI (n°3)	5'ATGAGCTCTTAAGCAGTGGAAACACTC 3' 5' ATTGGATCCATGGCTTCCGTT 3'	50	422
PCR mutation Acc651 n°1 dans PA1 (CAEOO467)	pCR2.1 PA1 SnaB1	K7 Acc651 n°2 PA1R BamHI (n°3)	5' GTTCATCGGTACCCTTCAAGAA 3' 5' ATTGGATCCATGGCTTCCGTT 3'	50	234
PCR mutation Acc651 n°2 dans PA1 (CAEOO467)	pCR2.1 PA1 SnaB1	K7 Acc651 n°1 PA1F Sac1 (n°4)	5' TTCTTGAAGGGTACCGATGAAC 3' 5'ATGAGCTCTTAAGCAGTGGAAACACTC 3'	50	209
PCR mutation Acc651 n°3 dans PA1 (CAEOO467)	PCR mutation Acc651 n°1 dans PA1 + PCR mutation Acc651 n°2 dans PA1	K7 Acc651 n°2 PA1R BamHI (n°3)	5' GTTCATCGGTACCCTTCAAGAA 3' 5' ATTGGATCCATGGCTTCCGTT 3'	50	234
PA1b K7 SnaB1/Acc651 (iso2) (CAE00465)	pCR2.1 PA1 K7	PA1b K7 2F PA1b K7 2R	5'TCGGTACCCCTCAAGAAAACCTCCAGATGGATTT CTGCAGTAACCAATAACT 3' 5'AtACGTAGGAGCAGCAAGCTGCAATGGGGTTTGT TCTCCATTTGAGATGCCACCATGTGGCACTTCAGC TT 3'	50	145
PA1b K7 SnaB1/Acc651 (iso3) (CAE00466)	pCR2.1 PA1 K7	PA1b K7 2F PA1b K7 3R	5'TCGGTACCCCTCAAGAAAACCTCCAGATGGATTT TGCAGTAACCTATAA 3' 5'AtACGTAGGAGCAGCAAGCTGCAATGGGGTTTGT TCTCCATTTGAGATGCCACCATGTGGCACTTCAGC TT 3'	50	145
PA1b K7 SnaB1/Acc651 (iso5) (CAE00468)	pCR2.1 PA1 K7	PA1b K7 5F PA1b K7 5R	5'TCggTaccCCTCAAGAAAACCTCCATATGGATTTCT GCAGTTACCAATAACTAGACCAGCA 3' 5'AtACGTAGGAGCAATAAGCTGCAATGGGGTTTGT TCTCCATTTGATATCCCACCATGTGGCTCTCCACTT T 3'	50	145

Annexes

PA1b K7 SnB1/Acc651 (iso6) (CAE00465)	pCR2.1 PA1 K7	PA1b K7 2F PA1 K7 6R	5'TCGGTACCCCTCAAGAAAACCTCCAGATGGATTT CTGCAGTAACCAACA ACTA 3' 5'ATACGTAGGAGCAGCAAGCTGCAATGGGGTTTG TTCTCCATTTGAGATGCCACCATGTGGCACTTCAG CTT 3'	50	145
PA1b K7 SnB1/Acc651 (iso7) (CAB82859/AAA33639)	pCR2.1 PA1 K7	PA1b K7 7F PA1b K7 7R	5'ATCGGTACCCCTCAAGAAAACCTCCAGATGGATG TCTGCAGTAACCAACA ACTAG 3' 5'AATACGTAGGAGCAGCAAGCTGCAATGGGGTTT GTTCTCCATTTGAGATGCCACCATGTGGCTCTTCA GCCTGTC 3'	50	145
PA1b cyclique K7 (CAEOO467)	pCR2.1 PA1 K7	PA1b CRK3 K7 F PA1b CRK3 K7 R	5' CCTGACAAAATACGTAGGAGCAGGAAG 3' 5' TCATCGGTACCCTTCAAGAGAGCGTTAG 3'	50	145
PA1b sophora	pCR2.1 PA1 K7	PA1b sophora K7 F PA1b sophora K7R	5'ATCGGTACCCTTCAAGAAAACCTCCAGTTGGATA TATACAGAAACCCCAACTAGTACAATGGGGATA CAGC 3' 5'AATACGTAGGAGCAGCAGATTGTTCCGGGTGCTT GTTCCGATTTGAGATGCCACCATGCCGCTCTACC GAC 3'	50	145
Cyclotide (<i>Clitoria ter- natea</i>) (JF501210.1)	pCR2.1 PA1 K7	Cyclotide K7 F Cyclotide K7 R	5'ATCGGTACCCTTCAAGAAAACATTTTTTCATGCAA ATTGGCCATGAACATGAACAATCTGGCACATAAC ATGTCCCCAGGGTAC 3' 5'AAATACGTAGGAGCAGGACTTCCTACATGCGGA GAAACTTGTACCCTGGGGACATGTTATGTGCCAGA TTGTTTCATGTTC 3'	50	123
V-ATPase sous-unité c (<i>Sitophilus orizae</i>)	pCR2.1 V-ATPase sous-unité c de <i>Sitophilus orizae</i> (souche WAA42 et IsoR3) Frédéric Gressent (BF2I, INRA/INSA de Lyon)	V-ATPase -c-sito F1 V-ATPase -c-sito R1	5'AACATGGGGGTGGGAATTGT3' 5'TCAGTGCTGTGTTGTGCACCT3'	55	577
V-ATPase sous-unité c (VMA3) (<i>Saccharo- myces cerevisiae</i>)	pRS415 -VMA3 Marcus Hus (Osnabruek, Alle- magne)	VMA3-Xho1 F1 VMA3-BamH1 R1	5'TTCTCGAGTTAACAGACAACATCTTGAGTAGCCC 3' 5'GGGGATCCATGACTGAATTGTGTCCTGTCTACGC 3'	55	480
V-ATPase sous-unité e (<i>Sitophilus orizae</i>)	pCR2.1 V-ATPase sous-unité e de <i>Sitophilus orizae</i> (souche WAA42) Frédéric Gressent (BF2I, IN- RA/INSA de Lyon)	V-ATPase-e-sito-Xho1 F1 V-ATPase-e-sito-BamH1 R1	5' CTCGAGTTAGTTCAGTGGATTACCCCATGC 3' 5' GGATCCATGGGTGCAGCAGCTTTGCCTTTAT 3'	55	252

Article premier auteur publié : Expression and biological activity of the cystine knot bioinsecticide PA1b (Pea Albumin 1 subunit b [EYRAUD '13]).

Vanessa Eyraud, Lamis Karaki, Isabelle Rahioui, Catherine Sivignon, Pedro Da Silva, Yvan Rahbé, Corinne Royer, Frédéric Gressent*.

ABSTRACT

The PA1b (Pea Albumin 1, subunit b) peptide is an entomotoxin extract from Legume seeds with lethal activity on several insect pests, such as mosquitoes, some aphids and cereal weevils. This 37 amino-acid cysteine-rich peptide has been, until now, obtained by biochemical purification or chemical synthesis. In this paper, we present our results for the transient production of the peptide in *Nicotiana benthamiana* by agro-infiltration, with a yield of about 35 µg / g of fresh leaves and maximum production 8 days after infiltration. PA1b is part of the *PAI* gene which, after post-translational modifications, encodes two peptides (PA1b and PA1a). We show that transforming tobacco with the PA1b cDNA alone does not result in production of the toxin and, in fact, the entire cDNA is necessary, raising the question of the role of PA1a. We constructed a PA1-cassette, allowing for the quick “cut/paste” of different PA1b mutants within a conserved *PAI* cDNA. This cassette enabled us to produce the six isoforms of PA1b which exist in pea seeds. Biological tests revealed that all the isoforms display similar activity, with the exception of one which is inactive. The lack of activity in this isoform led us to conclude that the amphiphilic nature of the peptide is necessary for activity. The possible applications of this expression system for other cysteine-rich biomolecules are discussed.

Keywords: PA1b, bioinsecticide, heterologous expression, tobacco, cystine knot

INTRODUCTION

Chemical pesticides are increasingly used around the world but they are also increasingly stigmatized because of their persistence and their toxicity to non-target organisms. Crop protection against two very important pests, namely cereal weevils and aphids, is currently carried out almost exclusively by chemical treatments. A few alternative methods do exist to combat these insects, but they

are either much less effective or prohibitively expensive, compared with chemical control.

Finding new plant-derived molecules, which have less impact on the environment, is a major challenge in order to develop biopesticides for sustainable and healthy agriculture. The PA1b (Pea Albumin 1, subunit b) peptide is an entomotoxin extract from pea seeds and, more generally, from Legume seeds [1]. PA1b is one of the few orally active peptide toxins currently known. It displays outstanding insecticidal activity against certain insects, such as grain weevils (genus *Sitophilus*) and

FOLIO ADMINISTRATIF
THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE
LYON

NOM : Eyraud Prénoms : Vanessa Pauline	DATE de SOUTENANCE : 26 février 2014
TITRE : Etude d'un insecticide naturel nommé PA1b : mécanisme d'action et expression hétérologue	
NATURE : Doctorat Ecole doctorale : Evolution, Ecosystème, Microbiologie, Modélisation Spécialité : Micro-organismes, interactions, infections	Numéro d'ordre :
Code B.I.U. – Lyon : T 50/210/19 / et bis	CLASSE :
RESUME : Dans un contexte où l'utilisation de substance chimique en agriculture est de plus en plus décriée, il est nécessaire de trouver de nouveaux moyens de protections des cultures, tout en maintenant une agriculture économiquement performante. Ainsi, un peptide extrait de graines de pois nommée PA1b (Pea Albumin 1 sous-unité b), présentant une forte activité insecticide a été découvert au laboratoire. PA1b provoque chez l'insecte modèle du laboratoire, le charançon des céréales <i>Sitophilus</i> sp., 100% de mortalité. L'action de PA1b passe par la liaison à un récepteur présent chez les charançons sensibles, et cette liaison est absente chez les charançons résistants ; ce récepteur est une pompe à protons nommée V-ATPase pour Vacuolar ATPase. Elle est composée de 14 sous-unités organisées en deux complexes protéiques nommé V1 (intracellulaire) et V0 (membranaire). PA1b agissant à l'extérieur des cellules seul le complexe V0 composés des sous - unités a, c, d et e pouvait être le récepteur de notre toxine. Mon premier objectif de thèse a été de comprendre le mode d'action de PA1b, en identifiant d'abord la ou les sous-unités réceptrices de PA1b, puis en recherchant par quel mécanisme la liaison de PA1b induit la mort de l'insecte. Nous avons cloné chez le charançon tous les gènes du complexe Vo, puis j'ai complémenté des levures déficientes pour ces gènes. Ce travail, mais également celui réalisé en collaboration avec d'autres équipes, nous a permis de proposer un modèle de perception de PA1b qui implique les sous-unités c et e de la V-ATPase, et permet également de proposer des hypothèses pour les différentes résistances au peptide Par des méthodes d'immunohistologie et de biochimie, j'ai ensuite montré de manière concordante que la liaison de PA1b à la V-ATPase déclenche un phénomène d'apoptose qui conduit à la mort cellulaire, puis à la mort de l'insecte. Le second objectif de ma thèse était la mise en place d'un système de production hétérologue de PA1b. Grâce à l'expression hétérologue par infiltration de feuille de tabac (<i>Nicotiana benthamiana</i>) nous avons mis en place une technique de production efficace de la protéine PA1b. Après avoir déterminé les parties du gène codant PA1b nécessaires à la production de la protéine fonctionnelle, le système de production a ensuite été simplifié par la construction d'une cassette d'expression. Ainsi six isoformes de PA1b présents chez le pois, dont l'activité individuelle restait inconnue, ont été produits et testés, permettant de montrer que le caractère amphiphile de PA1b était primordial pour son activité. Par cette technique nous avons mis en place un système de production rapide et efficace permettant de tester la toxicité de nombreux isoformes de PA1b. Ce travail sera une aide précieuse pour le projet, dont l'un des objectifs majeurs est l'optimisation de PA1b, c'est-à-dire de déterminer la séquence peptidique la plus toxique	
MOTS CLES : PA1b, knottine, bio-insecticide, interaction plante-insecte, agro-infiltration, complémentation fonctionnelle.	
Laboratoire(s) de recherches : Biologie Fonctionnelle Insectes et Interactions	
Directeur de thèse : Frédéric GRESSENT	
Président du jury : Composition du jury : M. HERZOG, C. NIELSEN- LEROUX, S. BAUDINO, G. CONDEMIN, J.L. POESSEL, C. SALLAUD, F. GRESSENT	

Vanessa Eyraud
Thèse en biologie / 2014
Institut national des sciences appliquées de Lyon