



HAL
open science

Découverte et caractérisation de nouveaux ligands peptidiques pour l'étude de la neurobiologie de l'abeille domestique *Apis mellifera*, et pour la conception d'insecticides écologiques et sélectifs

Rosanna Mary

► **To cite this version:**

Rosanna Mary. Découverte et caractérisation de nouveaux ligands peptidiques pour l'étude de la neurobiologie de l'abeille domestique *Apis mellifera*, et pour la conception d'insecticides écologiques et sélectifs. Autre. Université Montpellier, 2020. Français. NNT: 2020MONTTS016 . tel-03154667

HAL Id: tel-03154667

<https://theses.hal.science/tel-03154667>

Submitted on 1 Mar 2021

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Ingénierie moléculaire

École doctorale Sciences Chimiques Balard

Unité de recherche IBMM – UMR5247

Découverte et caractérisation de nouveaux ligands peptidiques pour l'étude de la neurobiologie de l'abeille domestique *Apis mellifera*, et pour la conception d'insecticides écologiques et sélectifs

Présentée par Rosanna MARY

Le 29 Juillet 2020

Sous la direction de Sébastien DUTERTRE
et Pierre CHARNET

Devant le jury composé de :

Valérie ROLLAND, Professeure, Université de Montpellier

Emmanuel DEVAL, Directeur de Recherche, CNRS

Denis SERVENT, Directeur de Recherche, CEA

Hamid MOHA OU MAATI, Maître de Conférence, Université de Montpellier

Sébastien DUTERTRE, Chargé de Recherche, Université de Montpellier

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

*A mes (quatre) parents,
Et à mon frère !*

Je vous aime...

Remerciements

Les remerciements sont pour moi un « chapitre » essentiel et qui me tient à cœur car nombreuses sont les personnes qui auront contribuées de près comme de loin à me faire tenir bon durant ce (long) voyage qu'est la thèse...

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements au Professeure Valérie Rolland d'avoir acceptée de présider ce jury de thèse. Merci également aux docteurs Emmanuel Deval et Denis Servant d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Enfin, merci à Hamid Moha ou Maati d'avoir accepté d'être présent afin de participer à l'évaluation de mes travaux. Je tiens également à adresser ma gratitude pour leur patience et leur compréhension durant les mois qui auront précédés le rendu de mon manuscrit.

Je tiens évidemment à remercier mes chefs, mes deux encadrants durant ces trois années. Par logique, je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur Sébastien Dutertre... pour tout ! Si j'en suis aujourd'hui arrivé là, tu y es pour beaucoup... Tout d'abord, pour avoir accepté il y a maintenant 4 ans de me prendre comme stagiaire pour mon stage de master 2, sur un simple mail ! Moi qui arrivait de Nice et ne connaissait rien à cette nouvelle ville et au monde de l'électrophysiologie et de l'analyse des venins, tu as su me faire confiance pour mon plus grand bonheur. Ensuite pour m'avoir proposé d'être ta toute première doctorante et relever ce challenge qu'est la thèse à tes côtés. Enfin, merci pour ta « coolitude » au quotidien et dans chaque épreuve à haut stress, je crois que je n'aurais pas pu espérer meilleur chef que toi...

Je tiens également à remercier le Docteur Pierre Charnet, pour m'avoir encadrée et tant appris durant ces trois années de thèse. Ce chef avec qui j'aurai passé le plus de temps durant ces années mais que je n'aurai jamais réussi à tutoyer pour autant ! Merci pour votre implication, votre gentillesse et votre grandeur d'esprit. Je garderai toujours en tête votre rigueur scientifique ainsi que votre honnêteté !

J'en profite également pour remercier les membres de l'équipe et qui font de celle-ci ce qu'elle est aujourd'hui ! Ainsi, je remercie Jean-Baptiste, pour son soutien et son dynamisme, toujours de bonne humeur, tu auras su de nombreuses fois me redonner le sourire. Je te souhaite une très belle retraite, certainement au Vigan :) ! Merci à Matthieu, mon voisin de bureau (et de quartier !) pour ton côté si détente au labo et ton combat pour les abeilles sur le terrain. Je retiendrai un homme d'une grande bienveillance et généreux. Merci également à Thierry pour sa gentillesse rare, sa passion de la moto et son impressionnante collection de t-shirts de concert de rock (un pour chaque jour !). Merci aussi à Claudine, pour ses aller-retours rapides entre deux cours. J'ai rarement vu une femme avec tant de dynamisme et d'entrain tout en étant capable de « supporter » cette équipe d'hommes... Merci à vous pour ces échanges scientifiques mais aussi de rires !

Je tiens aussi à remercier le Docteur Michel Vignes et l'ensemble de son équipe pour avoir accueillis les membres de l'équipe Charnet (et tout le « bordel » allant avec) au sein de leur

laboratoire lors du déménagement que nous avons subi ! Merci à Nawfel pour sa patience... Toi qui partageait un grand bureau tranquille toute seule, tu auras su t'adapter à la nouvelle ambiance du bureau. Je te souhaite le meilleur pour ta thèse et la suite !

Durant ces trois années de thèse, et de façon peu habituelle, j'aurai travaillé au sein de trois laboratoires, m'ayant permis de rencontrer de nombreuses personnes scientifiquement et humainement incroyables.

Au CRBM, je tiens à remercier tout particulièrement mes 3 acolytes, Ghiss (le manchot), Denis et Simon ! Merci pour ces pauses déjeuners et cafés ainsi que les soirées qui m'auront permis de « sortir » de ce monde scientifique... Je n'oublierai pas nos moments partagés et nos longues discussions à refaire le monde. Merci également aux stagiaires qui auront participé aux divers projets de l'équipe, Mathilde, Brice et d'autres, mais particulièrement Lorène, je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse, et Anaïs pour être telle que tu es, si dynamique et souriante ! Merci également aux personnes que j'aurai connues dans les couloirs de ce laboratoire, Mickaël, Tony, Seb, Lucie, Perrine ... Enfin, un grand Merci à Léa ! Ma copine du labo, pour les repas de midi partagé, pour ton écoute et tes conseils ! Je te souhaite tout le bonheur du monde pour l'avenir !

A la faculté des sciences de l'université de Montpellier, j'aurai partagé le rythme du second étage du bâtiment 17. J'aimerais tout d'abord remercier la Professeure Christine Enjalbal, directrice de l'équipe F12 au sein de laquelle j'ai travaillé. Merci à la plateforme LMP et plus particulièrement à Guillaume, pour son aide et sa supervision lors des longues heures passées devant l'HPLC. Je tiens également à remercier Xavi, Xavier et TX, les trois permanents de l'étage qui auront chacun su me faire bien rire par leur façon d'être tout simplement. Enfin un grand merci évidemment à tous mes collègues doctorants (ou jeunes docteurs !) chimistes, François, Yves, Hélène, Mylène, Justine ... qui auront partagés ce même étage. Merci plus particulièrement à Julien, mon compatriote chimiste, et Elodie (la seule non-doctorante et de ce fait, la plus saine d'esprit !), merci pour ta gentillesse et ton implication, à gérer tous nos anniversaires et autres événements ! Enfin, un grand grand merci à mon ami Michel ! Merci pour ton soutien, merci pour tes mots, merci pour ton écoute et tes conseils, merci pour ta rigueur scientifique et ton côté je m'en foutiste en dehors, merci pour ces soirées, ces pauses cafés, ces longues discussions et j'en passe, merci d'avoir et d'être là ! Tu auras été l'un des piliers de ma thèse et aujourd'hui un véritable ami, alors Merci !

En arrivant à Montpellier en 2016, mes premiers pas auront commencé à l'IGF lors de mon stage de master 2 où j'ai pu rencontrer des personnes incroyables. Avant d'entamer cette (longue) liste des potes « biologistes », j'ai une pensée toute particulière pour Pierre (encore un Pierre de ma vie !). Mon Pierrot, tu m'auras tout d'abord encadré lors de ce stage où tu m'as fait débiter et tant appris sur le monde du patch. Par la suite et durant toutes ces années, tu auras été plus que présent pour moi, par ton soutien moral inébranlable, tant par nos longues discussions et échanges scientifiques, ton appui lors de la rédaction de ma thèse, mais

aussi par nos sorties, nos trajets dans le 06 par la suite et évidemment notre passion du swing que tu m'auras transmise. Merci pour tout !

Merci à tous les copains « bio » : Pierre Rambeau, Jodie, Pauline, Jennifer, Antoine, Miriam, Malik, Alex, les Matthias (chauve et petit), toutes et tous aujourd'hui docteur(e)s, mais aussi Angie, Julie et Babylou, et les autres pour toutes ces soirées, concerts, apéros, ce week-end à Barcelone... Merci d'être là depuis mes débuts dans cette merveilleuse ville et merci pour votre soutien ! Un merci tout particulier à Hugo... Parce que l'on s'est rencontré par l'intermédiaire des autres, mais qu'aujourd'hui on ne se lâche plus ! Merci pour toutes ces soirées, ces apéros, ces après-midis piscines, cette finale de coupe du monde, ce week-end chez tes parents à Marseille et j'en passe... Merci pour toutes les belles rencontres que tu m'as permis de faire par la suite. Je crois que l'amour de la Techno nous a rapproché mais que l'amour tout court nous aurais fait ne pas nous lâcher ! Merci mon pote ! J'ai évidemment une pensée pour notre ami Rémy, qui nous aura quitté en avril 2018 et dont le sourire restera à jamais gravé...

Une pensée également aux participants du concours Ma Thèse en 180secondes auquel j'aurai participé en avril 2017 : Antoine évidemment, le début d'une belle amitié, Geoffrey, les Camille, Chloé, Julien et les autres... aujourd'hui toutes et tous docteur(e)s ! Cela aura été pour moi une très belle aventure, plus que scientifique !

Merci à toutes celles et ceux qui se seront par la suite ajoutés à mon voyage (parce que je le voulais bien aussi !) et qui auront contribué de façon moins (voire pas du tout !) scientifique à ces années de thèse !

Une pensée aux Dirty et plus particulièrement au Colmet (encore, évidemment !) et le Lharmoul, mon badass de tatoueur ainsi que ses merveilleuses femmes Elsa et Lou (c'est moi la marraine du Doudou !), et les autres... Merci d'être tels que vous êtes, vous êtes beaux (oui même Nico !) ! Et merci pour ce nouvel an, et ce défilé de fusées dans le c**!!

Merci à (P'tit) Louis pour nos longues conversations à refaire le monde et les gens, à s'imaginer une société meilleure avec des façons de penser différentes et j'en passe, tout cela autour d'une tasse de thé de je ne sais plus quel pays... Merci d'être un des rares à me comprendre et de me soutenir dans la femme que je suis ! Merci pour ton ouverture d'esprit et ton absence de jugement sur tout... Les hommes tel que toi sont rares, ne change rien !

Merci à ma Marine ! Il y aurait tellement de choses à dire... Merci d'être là au quotidien, par ta présence, tes messages ou appels, par tes mots. Merci de me soutenir, m'épauler, d'être là tout simplement. Merci pour les sessions run, les soirées filles, les soirées tout court, les massages, les ti plats et j'en passe, mais surtout pour nos longues discussions (souvent autour d'une tisane de mamie !) ... Il aura fallu être à Montpellier pour se rencontrer et tu resteras ma meilleure rencontre ici, de loin ! Je ne sais pas trop ce que me réserve l'avenir mais je sais que tu en feras partie ! Je t'aime !

Enfin, je ne peux terminer mon voyage montpelliérain sans remercier mon incroyable colocataire, Stéphane ou Chou (comme nous nous appelons). Merci d'être là et partager ton quotidien avec moi. Merci de me supporter notamment ces derniers mois, de croire en moi

et me soutenir dans mes délires, à la fois durant ces années de thèse mais aussi dans tout ce que j'entreprends ! Merci d'être le premier témoin de mes malchances avec les hommes (haha), et mon cobaye pour mes recettes ;). Merci pour ta patience, ta gentillesse et ton respect ! Merci de te confier à moi, me faire confiance, et m'écouter quand j'en ai besoin. Je n'aurai pu espérer meilleur colocataire que toi, que je considère aujourd'hui comme mon grand frère, et mon départ sera difficile je le sais et tu vas me manquer terriblement ! Je t'aime tout simplement...

Merci à tous les autres : Pancho, Mika, Roger et Mathou pour nos soirées « cassage de panse » préparé maison ou par Boogui ;), Julien pour me faire swinguer et m'avoir tant encouragé (on part où en voyage ?), Louis G. pour nos soirées MarioKart, P'tit Antoine pour me faire rire à chaque fois que je te vois, Robert, mon ami et voisin, pour nos sessions sport et Yam's et pour me faire de super petits plats, Max et les artholics girls évidemment, merci de m'avoir donné ma chance et aujourd'hui faire partie du « gang », et enfin toutes celles et ceux que j'oublie. Vous aurez tous fait de ma vie montpelliéraine une belle histoire... qui ne va pas s'arrêter là !

Il y a aussi les ami(e)s qui sont là depuis bien plus longtemps !

Ma Fio, ma BFF, ma sœur de cœur... merci d'être là malgré la distance ! Merci pour les nombreux appels, ton écoute et tes encouragements si importants ! Cette année est tout aussi particulière avec l'arrivée prochaine de ton petit bébé, Talia ! J'ai déjà tellement hâte de la rencontrer et la serrer dans mes bras... Je vais être une tata d'enfer !! Je suis tellement fière de toi ma Fio, et du chemin que tu as parcouru... Je te souhaite le meilleur et je ne serai jamais très loin <3

Mes 3 autres meilleures amies : Laurie, Claire et Natacha ! Vous faites parties de ma vie depuis tant d'années aujourd'hui qu'on ne peut plus les compter ! Merci pour votre soutien indéniable, de croire en moi comme vous le faites, d'être si honnêtes et vraies. Merci pour tous ces week-end ou vacances, ces moments rien qu'à nous resteront à jamais gravé ! Nous nous sommes rencontrés enfants, 2020 est l'année de nos 30 ans. Ce genre d'amitié est rare, et je sais comme je suis chanceuse de vous avoir... Je vous aime comme des sœurs !

Merci aussi à mes amies (tout aussi proches !), Mélo, Valou et Cécilia... Merci à vous d'être là depuis tant d'années, pour votre soutien et vos nombreux messages et appels qui m'auront fait tenir bon, et d'avoir cru en moi depuis le début ! Je vous aime les filles ! Ma Cec', encore une nouvelle maman pour 2020, je suis plus qu'heureuse pour toi et tu vas faire une maman en or je le sais déjà !!

Merci aux copains du 06 : Benji évidemment, nous aurons partagé de nombreuses années ensembles et je suis fière aujourd'hui de notre belle amitié et t'avoir parmi mes meilleurs amis. Merci de ton soutien, tes appels et encouragements ! Merci à Jean-Mich, Esteban, Hamdi, Romain & Marine, Adou & Steph (les 4 futurs mariés !), Steph' et Elo' pour ce merveilleux week-end londonien, Loleï et Manoune, même de si loin, vous avez été là ! Un merci tout particulier à Cado parce que tu auras été celui qui m'aura le plus rendu visite sur Mtp, Chris' et son fils Ben, pour ces moments partagés ensemble à Montpellier, au FISE ou

autour d'une table, et Antho et Cec' pour avoir pris cette initiative (avec le Cado) de venir passer le nouvel an 2017 à la maison ! On se refait un week-end quand vous voulez :). Et puis sans oublier évidemment Romain, mon meilleur pote ! Tu m'auras manqué durant ces années, toi qui vagabondes partout tu n'auras pas trouvé le temps de venir me voir dans ma ville, mais j'ai hâte de rattraper le temps perdu ! My Bro <3

Enfin je voudrais terminer en remerciant ma famille ! Merci à mes parents, mes 4 parents ! J'ai fait le pari de faire de nombreuses et longues années d'études et, même si vous n'avez pas toujours (rarement) compris ce que je faisais et dans quoi je me lançais, vous avez été d'un soutien sans faille ! Merci pour vos mots, pour votre soutien, moral et financier, pour votre fierté que vous me rappelez sans cesse, pour votre amour tout simplement... Au-delà d'être des parents incroyables, vous êtes également des personnes exceptionnelles et intelligentes. Je suis aujourd'hui une femme épanouie et c'est en grande partie grâce à vous, alors Merci ! Merci d'avoir toujours été là, d'avoir cru en moi, et de m'avoir toujours soutenue dans mes choix ! La distance aura parfois été compliquée (surtout pour toi ma p'tite Mam') mais cela aura également eu du bon, et je ne regrette rien ! Merci pour tout, à vous quatre !

Je vous aime tant... !!!

Mon frère... Le Pierre le plus important de ma vie ! Celui que je n'appelle jamais par son prénom ;). Tu es et resteras à la fois le plus beau cadeau que nos parents m'auront donné mais aussi celui qui m'aura créé le plus de soucis dans ma vie (lol) ! Par tes innombrables accrochages avec la vie, tu nous auras fait vivre de sacrés moments (que je souhaite à peu de gens en passant !), mais tu m'auras aussi montré à quel point je pouvais être une femme forte et solide, droite et impliquée, généreuse et entière ! Merci d'être là, d'être encore là ! Ces années à Montpellier auront été difficiles par ton absence et créer quelques querelles, mais je crois que rien ne pourra un jour casser cette relation si particulière que nous avons tous les deux ! Je suis fière d'être celle qui t'auras accompagné dans de nombreuses étapes de la vie, et je serai toujours là pour toi, tu le sais ! Toi et moi nous partageons d'innombrables souvenirs mais l'un des plus beaux pour moi restera le concert d'IAM tous les deux à Montpellier, que je n'oublierais jamais !! Merci pour tous tes messages, tes appels (notamment ces derniers mois) et tes mots tout simplement qui m'auront fait comprendre à quel point tu es fier de moi, de celle que je suis, de mes choix et d'être mon petit frère... Maintenant à ton tour d'être fier de toi, et de l'homme que tu deviens.

Merci de me soutenir et d'être derrière moi quoi qu'il advienne...

Je t'aime plus que tout... à l'infini et au-delà !

A vous 5, je vous dédie cette thèse ! <3

Merci aussi à mes deux grands-mères et mon incroyable papy, ainsi qu'à toute ma (nombreuse) famille ! J'ai la chance d'avoir grandi entre le nord et le sud de la France, avec des familles ayant des façons de penser et à la culture différentes... Vous aurez contribué à

celle que je suis aujourd'hui ! Et puis... j'aurai prouvé que la seule blonde de la famille est celle qui a le plus gros cerveau (comme dirait Vaness') :-P !

Merci à mes cousines et petites cousines plus particulièrement, Léa, Vaness' et sa fille Emma, Lola et Lou... parce que vous aurez été les plus présentes et positives durant ces années, merci pour votre soutien et d'avoir tant cru en moi ! Je vous aime fort !!

La thèse est un vrai challenge personnel pour celle ou celui qui décide de s'y consacrer. Ces quatre années auront en effet été pour moi une belle épreuve, que je suis fière d'avoir achevée, et durant laquelle chacune et chacun d'entre vous aura permis de rendre meilleure...

Merci à toutes et tous !

LOVE SUR VOUS !

Table des Matières

Table des Matières	11
Table des Abréviations.....	15
Table des Figures.....	19
Table des Tableaux et Images.....	20
Productions Scientifiques.....	23
I. Introduction Générale.....	27
A. <u>Abeilles mellifères et Contexte</u>	30
Perte des colonies d'abeilles.....	31
B. <u>Insecticides</u>	34
Classe des néonicotinoïdes.....	39
Classe des phénylpyrazoles.....	41
Classe des pyréthrinoïdes.....	44
1. Rôle & Intérêts.....	46
2. Toxicité.....	47
Effets sublétaux des insecticides sur l'abeille : exemple de la cognition.....	50
Doses (sub)létales et mortalité des abeilles.....	51
Résistance aux insecticides.....	51
3. Recherche de nouvelles molécules.....	53
C. <u>Canaux Ioniques</u>	55
Potentiel de repos membranaire.....	55
Potentiel d'action.....	57
Canalopathies.....	60
Les canaux ioniques chez l'abeille.....	62
• Canaux ioniques activés par le voltage.....	62
i. Canaux Sodiques.....	62
Structure générale.....	63
Mammifères.....	64
Invertébrés.....	67
Différences entre insectes et mammifères.....	70
ii. Canaux Calciques.....	71
Structure générale.....	72
Mammifères.....	76
Invertébrés.....	78
iii. Canaux Potassiques.....	82
Sous-familles et structures.....	84
• Canaux dépendants d'un ligand.....	85
Famille des pLGIC.....	88
i. Récepteur GABA.....	90
Mammifères.....	91
Invertébrés.....	92
ii. Récepteur à l'Acétylcholine.....	96
Structure générale.....	97
Mammifères.....	100
Invertébrés.....	101
Protéines chaperonnes.....	104

• RIC-3.....	104
• NACHO et autres protéines chaperonnes.....	106
iii. Récepteur au Glutamate.....	107
Récepteurs ionotropiques.....	108
Récepteurs métabotropiques.....	110
D. <u>Venins animaux</u>	111
1. Généralités.....	111
2. Action des venins.....	112
i. Toxines animales.....	113
ii. Intérêt thérapeutique des toxines.....	114
iii. Toxines agissant sur des canaux ioniques.....	115
• Toxines non-peptidiques.....	116
• Toxines peptidiques.....	117
3. Venins d'araignées.....	120
• Exemples de toxines d'araignées spécifiques des invertébrés.....	121
• Araignées d'intérêt pour ce projet de thèse.....	122
II. Objectifs du projet de thèse.....	127
III. Matériels et méthodes.....	131
A. <u>Electrophysiologie manuelle</u>	131
1. La xénope <i>Xenopus laevis</i>	131
2. Les ovocytes de xénope.....	132
3. Extraction des ovocytes.....	133
4. Synthèse et purification des ARN.....	134
5. Injection des ovocytes.....	135
6. Le voltage imposé en double microélectrodes.....	137
7. Protocole de stimulation.....	138
A. Canaux dépendants du voltage.....	138
i. Conditions expérimentales et solutions.....	138
Canaux Calciques.....	138
Canaux Sodiques.....	139
ii. Protocoles.....	139
Ca-test.....	139
Ca-inac.....	140
B. Canaux dépendants d'un ligand.....	142
i. Conditions expérimentales et solutions.....	142
ii. Courbes dose-effet.....	143
B. <u>HiClamp</u>	145
1. Caractéristiques.....	147
2. Fonctionnement.....	147
3. Protocoles d'enregistrement.....	150
A. Récepteurs dépendants d'un ligand.....	152
4. Analyse des données.....	153
C. <u>Araignées et Venins</u>	154
1. Sélection des araignées.....	154
2. Extraction de venin.....	157
3. Extraction des ARNm.....	158
D. <u>HPLC</u>	158

E. <u>Analyses “omiques” des venins</u>	159
1. Préparation de la bibliothèque et séquençage Illumina.....	159
2. Assemblage de transcriptomes, annotation et quantification des transcrits.....	160
3. Analyse de séquence bioinformatiques.....	161
4. Protéomique.....	162
A. Spectrométrie de masse couplée par chromatographie liquide.....	162
B. Protéomique « shotgun ».....	163
C. Intégration bioinformatique des données protéo- et transcriptomiques.....	164
F. <u>Tests comportementaux chez l’abeille <i>Apis mellifera</i></u>	164
1. Préparation des abeilles.....	164
2. Injection des abeilles.....	165
3. Protocole de survie.....	166
IV. Résultats	169
Avant-Propos.....	169
<u>CHAPITRE 1 : Caractérisation des canaux ioniques par électrophysiologie manuelle et semi-automatisée</u>	170
A. <u>Caractérisation des canaux ioniques d’insectes</u>	170
1. Choix des canaux à analyser pour la suite du projet.....	170
2. Canaux ioniques dépendants du potentiel.....	170
i. Voltage dépendance du canal calcique Cav3 d’abeille.....	171
ii. Voltage dépendance du canal calcique Cav4 d’abeille.....	173
iii. Voltage dépendance des canaux calciques de mammifères.....	175
3. Canaux ioniques dépendants d’un ligand.....	178
i. Récepteurs GABA.....	179
B. <u>Mise au point d’un criblage à moyen débit sur le robot HiClamp</u>	182
1. Mise au point sur les canaux dépendants d’un ligand.....	182
i. Tests de dose-réponse au GABA.....	182
ii. Sensibilité des récepteurs GABA aux insecticides.....	184
Fipronil.....	185
Picrotoxine.....	186
2. Mise au point sur les canaux dépendants du potentiel.....	191
C. <u>Venins et choix des espèces venimeuses</u>	194
1. Choix des espèces d’araignées et extraction de venin.....	194
2. Séparation des venins.....	196
3. Extraction des ARNm.....	198
D. <u>Caractérisation fonctionnelle des venins</u>	199
1. Caractérisation in-vitro (HiClamp).....	199
i. Test des toxines CIA et analogues cycliques - Projet Collaboratif.....	199
ii. Test de la toxine U-Asilidin1-Mar1a - Projet Collaboratif.....	201
2. Caractérisation <i>in-vivo</i>	202
E. <u>Conclusion</u>	206
<u>CHAPITRE 2 : Analyses protéomique et transcriptomique du venin de <i>Lycosa tarantula</i></u>	209
Article : Proteotranscriptomic insights into the composition of <i>Lycosa tarantula</i> venom.....	210
V. Discussion / Perspectives	243
VI. Références Bibliographiques	254
<u>Résumé/Abstract</u>	282

Table des Abréviations

5-HT₃ : sérotonine
5-HT₃R : récepteur à la sérotonine
ACh : acétylcholine
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messagers
ATP : adénosine tri-phosphate
BaCl : chlorure de barium
BaOH : hydroxyde de barium
BAPTA : 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
Ca⁺ : ion calcium
Ca_v : canal calcium dépendant du potentiel
CaCl₂ : chlorure de calcium
CE : Commission Européenne
Cl⁻ : ion chlore
CS : conditioned stimulus (stimulus conditionné)
CsCl : chlorure de césium
CsOH : hydroxyde de césium
C-ter : région C-terminale
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique
CO₂ : dioxyde de carbone
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane
DJA : dose journalière admissible
DL50 : dose létale amenant 50% de mortalité chez les individus testés
DMSO : diméthylsulfoxyde
DRG : dorsal root ganglion (ganglion de la racine dorsale)
DSC : drosophila sodium channel
Eact. : potentiel moyen d'activation
EC₅₀ : concentration efficace moyenne (concentration permettant d'obtenir 50% de la réponse maximale)
EDTA : éthylène dinitrile tétraacétate
EFSA : European Food Safety Authority (Autorité européenne de sécurité des aliments)
Einac. : potentiel moyen d'inactivation
GABA : acide γ-aminobutyrique
GABAR : récepteur gabaergique
Glu : ion glutamate
GluR : récepteur au glutamate
Gly : ion glycine
GlyR : récepteur à la glycine
H₂O : eau
HEPES : acide 4-(2-Hydroxyéthyl)piperazine-1-éthanesulfonique
HPLC : high-pressure liquid chromatography (chromatographie liquide à haute performance)
HVA : high-voltage activated
I : courant
IC₅₀ : concentration d'inhibition moyenne
ICa : courant calcique
ICK : inhibitor cystine knot
IFEN : Institut Français de l'Environnement
INa : courant sodique
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IMI : imidaclopride
IRAC : Insecticide Resistance Action Committee
IV : courbe courant-voltage
K⁺ : ion potassium
KCl : chlorure de potassium
kDa : kilo Dalton
K_v : canal potassium dépendant du potentiel
L : litre
LC/MS : liquid chromatography coupled to mass spectrometry (chromatographie liquide couplée à spectrométrie de masse)
LGIC : ligand-gated ion channel (canal ionique dépendant d'un ligand)
LVA : low-voltage activated
MC : méthylcarbammates
MgCl₂ : chlorure de magnésium
mL : millilitre
mM : millimolaire
msec : milliseconde
MS/MS : spectrométrie de masse en tandem
mV : millivolt
Na⁺ : ion sodium
nAChR : récepteur nicotinique à l'acétylcholine
NaCl : chlorure de sodium
Na_v : canal sodium dépendant du potentiel
ng : nanogramme
NGS : next generation sequencing
NMDG : 1-Deoxy-1-(methylamino)-D-glucitol (N-méthyl-D-glucamine)
N-ter : région N-terminale
OP : organophosphates
PA : potentiel d'action
PCCA : polychlorocycloalcanes
PER : proboscis extension reflex (réflexe d'extension du proboscis)
PK : protéine kinase
PO : organophosphates
PPSE : potentiel post-synaptique excitateur
PTM : post-translational modification (modification post-traductionnelle)
PTX : picrotoxine
R : résistance
RDL : sous-unité "résistance à la dieldrine"
RE : réticulum endoplasmique
RP-HPLC : reverse phase high-pressure liquid chromatography (chromatographie liquide à haute performance en phase inverse)
SDS : sodium dodécyl sulfate
SEM : erreur standard de la moyenne
SNC : système nerveux central
SNP : système nerveux périphérique
STX : saxitoxine
TEAOH : hydroxyde de tétraméthylammonium
TEACl : chlorure de tétraméthylammonium
TEVC : two-electrode voltage-clamp (technique de double microélectrode en potentiel imposé)
TM : segment transmembranaire
TTX : tétrodotoxine
µg : microgramme

μM : micromolaire

US : unconditioned stimulus (stimulus non-conditionné)

V : volt

VGIC : voltage-gated ion channel (canal ionique dépendant du voltage)

ZAC : canaux activés par le zinc

Table des Figures

Introduction

Figure 1 : Classification systématique des abeilles mellifères.....	29
Figure 2 : Evolution du déclin du nombre des colonies d'abeilles aux Etats-Unis.....	33
Figure 3 : Pertes de colonies enregistrées durant l'hiver 2007-2008 dans divers pays du monde.....	34
Figure 4 : Répartition du marché mondial des produits phytosanitaires en 2008.....	36
Figure 5 : Répartition du marché mondial des produits insecticides en 2008.....	36
Figure 6 : Représentation des différents sites d'action des composés insecticides neuroactifs.....	38
Figure 7 : Structures primaires des principales molécules insecticides néonicotinoïdes.....	41
Figure 8 : Structure primaire de la molécule de fipronil.....	42
Figure 9 : Sites d'action des insecticides neurotoxiques néonicotinoïdes et phénylpyrazoles.....	43
Figure 10 : Structure primaire de la molécule de Pyréthrine.....	44
Figure 11 : Structure des différents composés insecticides pyréthrinoïdes (type I ou II).....	45
Figure 12 : Classification des modes d'action des différents groupes insecticides (IRAC).....	53
Figure 13 : Illustrations des différentes phases d'un potentiel d'action.....	60
Figure 14 : Dendrogramme représentant l'ensemble des canaux ioniques (<i>Apis mellifera</i>).....	61
Figure 15 : Structure du canal sodique dépendant du voltage.....	66
Figure 16 : Structure du canal calcique dépendant du voltage.....	74
Figure 17 : Enregistrements électrophysiologiques obtenus sur la sous-unité $\alpha 1 \pm \beta$ (4 gènes)	75
Figure 18 : Dendrogramme des gènes de canaux ioniques dépendants du voltage (<i>Apis mellifera</i>).....	78
Figure 19 : Représentation schématique de la structure du canal DSC1.....	81
Figure 20 : Dendrogramme représentant l'ensemble des sous-familles de canaux potassiques.....	83
Figure 21 : Représentation des différentes familles de récepteurs ionotropiques.....	87
Figure 22 : Diagramme schématique du récepteur GABA codée par le gène RDL (<i>D. melanogaster</i>)...93	
Figure 23 : Représentation du récepteur GABA chez l'insecte.....	95
Figure 24 : Représentation de structure des récepteurs nACh neuronaux.....	99
Figure 25 : Topologie transmembranaire de la protéine RIC-3.....	105
Figure 26 : Topologie de structure des sous-unités du récepteur ionotropique au glutamate.....	109
Figure 27 : Représentation de la structure 2D de la Tétrodothine.....	116
Figure 28 : Représentation de la séquence et de la structure 3D de la Protoxine-II.....	118
Figure 29 : Représentation 3D de la structure de la HwTx-XI.....	119
Figure 30 : Dendrogramme regroupant les effets des quatre venins d'araignées.....	123
Figure 31 : Diversité des venins d'araignées.....	125

Matériels & Méthodes

Figure 32 : Illustrations de la relation courant-voltage pour les canaux Ca_v et Na_v	141
Figure 33 : Schéma de la chambre d'enregistrement de l'ovocyte.....	142
Figure 34 : Représentation de l'application de composé par perfusion ou puff.....	143
Figure 35 : Exemple de courbes dose-effet obtenues par concentration croissante de GABA (<i>Varroa destructor</i>).....	145
Figure 36 : Récapitulatif des différentes étapes de sélection de l'ovocyte sur HiClamp®	149
Figure 37 : Mise en évidence de l'artefact sur le robot HiClamp®	151
Figure 38 : Courbes dose-réponses au GABA (<i>Apis mellifera</i>).....	153
Figure 39 : Exemples de chromatogrammes obtenus en sortie d'HPLC.....	159

Résultats expérimentaux

Figure 40 : Exemples de courants électrophysiologiques de canaux calciques d'abeille.....	171
Figure 41 : Courants Ba dépendants du voltage générés par le canal Ca_v3 d'abeille.....	173
Figure 42 : Courants Ba dépendants du voltage générés par le canal Ca_v4 d'abeille.....	174

Figure 43 : Courants Ba dépendants du voltage générés par les canaux $Ca_v2.1, 2.2$ et 2.3	176
Figure 44 : Alignement de séquences pour la sous-unité RDL (<i>Apis mellifera</i> , <i>Acyrtosiphon pisum</i> et <i>Varroa destructor</i>).....	179
Figure 45 : Caractérisation des courants électrophysiologiques des sous-unités RDL du récepteur au GABA (<i>A. mellifera</i> et <i>A. pisum</i>).....	180
Figure 46 : Relation dose-réponse GABA (technique manuelle).....	181
Figure 47 : Relation dose-réponse GABA (technique automatisée).....	184
Figure 48 : Relation dose-réponse au fipronil (sous-unités RDL).....	186
Figure 49 : Relation dose-réponse à la picrotoxine (sous-unités RDL).....	188
Figure 50 : Relation dose-réponse de composés insecticides.....	193
Figure 51 : Chromatogrammes obtenus en sortie d'HPLC.....	197
Figure 52 : Relation dose-réponse à la toxine CIA, et ses analogues cycliques.....	200
Figure 53 : Test de la toxine U-Asilidin1-Mar1a sur les canaux Ca_v d'insectes et mammifère).....	202
Figure 54 : Résultats obtenus en présence de la toxine U-Asilidin1-Mar1a.....	205

Table des tableaux

Introduction

Tableau 1 : Ensemble des DL50 (<i>Apis mellifera</i>)	48
Tableau 2 : Récapitulatif des toxines et neurotoxines agissant sur les canaux sodiques.....	67
Tableau 3 : Conservation du gène <i>para</i> du canal Na_v chez les insectes.....	70
Tableau 4 : Récapitulatif des cinétiques d'activation et d'inactivation (Ca_v – vertébrés)	78
Tableau 5 : Récapitulatif des cinétiques d'activation et d'inactivation (Ca_v – invertébrés)	82
Tableau 6 : Ensemble des données connues sur les sous-unités de récepteurs au GABA.....	94
Tableau 7 : Exemples d' EC_{50} et d' IC_{50} obtenues pour le GABA, fipronil et picrotoxine sur les sous-unités RDL de divers insectes.....	96
Tableau 8 : Ensemble des valeurs EC_{50} et IC_{50} obtenu pour les composés agonistes et antagonistes sur nAChR (<i>Apis mellifera</i>).....	103

Matériels & Méthodes

Tableau 9 : Ensemble des ARN testés par la technique de patch-clamp.....	136
Tableau 10 : Compositions des différentes solutions utilisées pour les tests d'électrophysiologie....	138
Tableau 11 : Ensemble des solutions stocks des molécules utilisées sur LGIC.....	144
Tableau 12 : Venins et/ou toxines testé(e)s sur le comportement et la survie des abeilles.....	166

Résultats expérimentaux

Tableau 13 : Paramètres courant-voltage pour l'activation et l'inactivation.....	178
Tableau 14 : Paramètres d'activation et d'inhibition pour les sous-unités RDL.....	190
Tableau 15 : Ensemble des concentrations en protéines obtenues par Nano-Drop.....	195
Tableau 16 : Ensemble des concentrations en ARN obtenues par Nano-Drop.....	198
Tableau 17 : Ensemble des paramètres obtenus par tests des toxines CIA et ses 3 analogues	201

Table des images

Matériels & Méthodes

Image 1 : Xénope <i>Xenopus laevis</i> femelle adulte.....	131
Image 2 : Ovocytes de xénope non-fécondés observés sous microscope.....	132
Image 3 : Robot HiClamp®.....	146

Image 4 : Robot HiClamp®	148
Image 5 : Exemple de page lors de la sélection des icônes pour la programmation (HiClamp).....	150
Image 6 : Exemple de page sur le HiClamp® pour analyse des données obtenues.....	154
Image 7 : Images araignées Thomisidae (« araignées-crabes »)	155
Image 8 : Images araignées Lycose (« araignées-loups »)	156
Image 9 : Exemple de maintien des araignées au laboratoire.....	156
Image 10 : Photo d'une extraction électrique de venin sur <i>Lycosa tarantula</i>	158
Image 11 : Positionnement des abeilles <i>Apis mellifera</i> au sein de la boîte.....	165

Résultats expérimentaux

Image 12 : Graphiques de mortalité et problèmes neuro-musculaires chez les abeilles suite à l'injection de venins.....	204
--	-----

Productions scientifiques

Publications

- Dominique Koua#, Rosanna Mary#, Anicet Ebou, Celia Barrachina, Khadija El Koulali, Guillaume Cazals, Pierre Charnet and Sebastien Dutertre*. **2020**. Proteotranscriptomic insights into the composition of *Lycosa tarantula* venom. #Joint first authors. Article soumis à *Toxins*.
- Ménard C, Folacci M, Brunello L, Charreton M, Collet C, Mary R, Rousset M, Thibaud J.-B., Vignes M, Charnet P, Cens T. **2018**. Multiple combinations of RDL subunits diversify the repertoire of GABA receptors in the honey bee parasite *Varroa destructor*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(49) 19012–19024. DOI : 10.1074/jbc.RA118.005365. IF = 4.106. (2 citations).
- Drukewitz SH, Fuhrmann N, Undheim E.A.B., Blanke A, Giribaldi J, Mary R, Laconde G, Dutertre S and Von Reumont BM. **2018**. A dipteran's novel sucker punch : Evolution of arthropod atypical venom with a neurotoxic component in robber flies (*Asilidae*, Diptera). *Toxins*, 10(1). pii : E29. IF = 3.273. (5 citations).

Communications orales

- *Finale Régionale Languedoc-Roussillon, Concours Ma Thèse en 180 secondes*, Institut de Botanique, Montpellier, France. **2017, Avril**. Découverte et caractérisation de nouveaux ligands peptidiques issus de venins d'araignées pour l'étude de la neurobiologie de l'abeille domestique *Apis mellifera*, et pour la conception d'insecticides écologiques et sélectifs.
- *24th Meeting on Toxinology (RT24) of the French Society of Toxinology (SFET)*, « Toxins : Immunity, Inflammation and Pain », Pasteur Institute, Paris, France. **2017, Dec 7-8**. Discovery, synthesis and characterization of PmuTx1 – a new spider toxin that blocks T-type calcium channels Cav3.2.
- *Patch-Club Montpellier 2017*, Clos de l'Aube rouge, Castelnaud-le-Lez, France. **2017, 30 juin**. Découverte de toxines pour l'étude de la neurobiologie de l'abeille *Apis mellifera* et la conception d'insecticides écologiques.
- *Journée DAPP*, Ecole de chimie, Montpellier, France. **2018, 9 mars**. Découverte et caractérisation de ligands peptidiques pour l'étude de la neurobiologie de l'abeille *Apis mellifera* et pour la conception d'insecticides sélectifs
- *Patch-Club Montpellier 2018*, Terminal1 restaurant, Montpellier, France. **2018, June 8**. Discovery and characterization of peptide ligands to investigate the neurobiology of the honeybee *Apis mellifera* and for the conception of selective insecticides.
- *19^{ème} colloque Biologie de l'Insecte (Bdl)*, Université Champollion, Albi, France. **2018, Jun 26-28**. Characterization of the ion channels of the honeybee *Apis mellifera* for the development of an automated screening platform.

Posters

- *Congrès Canaux Ioniques 2017*, Hôtel Le Lazaret, Sète, France. **2017, Sept 11-13**. Characterization of honeybee's ion channels for the development of an automated screening platform. Rosanna Mary, Sébastien Dutertre, Pierre Charnet.
- *Congrès JMJC 2017*, La Canopée, Montpellier, France. **Juin 2017**. Characterization of honeybee's ion channels for the development of an automated screening platform. Rosanna Mary, Sébastien Dutertre, Pierre Charnet. **[PRIX DE POSTER]**
- *24th Meeting on Toxinology (RT24) of the French Society of Toxinology (SFET)*, « Toxins : Immunity, Inflammation and Pain », Pasteur Institute, Paris, France. **2017, Dec 7-8**. Discovery, synthesis and characterization of PmuTx1 – a new spider toxin that blocks T-type calcium channels Cav3.2. Rosanna Mary, Julien Giribaldi, Pierre Lesport, Emmanuel Bourinet and Sébastien Dutertre.

- *Congrès Canaux Ioniques 2018*, Hôtel Le Lazaret, Sète, France. **2018, Sept 10-12**. Characterization of honeybee's ion channels for the development of an automated screening platform. Rosanna Mary, Pierre Charnet, Matthieu Rousset, Thierry Cens and Sébastien Dutertre.

I. Introduction

Les abeilles domestiques (*Apis mellifera*) représentent les principaux pollinisateurs de cultures et de flore sauvage à travers le monde, jouant un rôle écologique et économique significatif (Breeze et al., 2016; Gallai et al., 2009). Depuis toujours, ces insectes volants et bourdonnants sont source d'interrogations mais aussi de fascination de par leur mode de vie en colonie au sein d'une ruche (pouvant contenir quelques dizaines de milliers d'abeilles ayant des rôles distincts) mais également pour leur capacité de pollinisation (processus indispensable à la reproduction sexuée des plantes à fleurs). De nombreuses espèces d'insectes participent à la pollinisation, tels que les bourdons, les guêpes ou encore les papillons, mais environ 70% de la pollinisation globale mondiale sont de la responsabilité des abeilles. C'est d'ailleurs pour leurs nombreuses aptitudes mais également pour leur importance au sein de la biodiversité, que les abeilles domestiques représentent l'un des insectes les plus communément « exploité » et étudié, à la fois en agriculture comme en recherche. Les études actuelles développées au sein des laboratoires de recherches se rapportent à divers domaines, comme la neurobiologie (par l'étude des circuits de l'olfaction, la coordination ou encore la mémoire), la toxicologie, ou encore la chimie analytique (par l'étude de leur venin). Depuis plusieurs, des déclinés dans les populations d'abeilles domestiques et d'autres insectes pollinisateurs ont été rapportés à l'échelle mondiale (Bommarco et al., 2010; Cameron et al., 2011; Potts et al., 2010) atteignant des pourcentages de mortalité extrêmes dans certaines régions du monde. De nombreux facteurs environnementaux peuvent affecter la santé des abeilles et ainsi être potentiellement à l'origine de ces pertes. Les abeilles doivent en effet faire face à de nombreuses modifications climatiques et environnementales, à divers agents pathogènes, ainsi qu'à de multiples contaminations chimiques. Or, aucun de ces facteurs, pris isolément ou en combinaison, ne peut expliquer l'ampleur des pertes de colonies d'abeilles enregistrées au cours de ces deux dernières décennies (Potts et al., 2010; vanEngelsdorp et al., 2009). Depuis quelques années, la pulvérisation intensive d'insecticides a été pointée du doigt, tout d'abord par les apiculteurs puis les chercheurs, pour son rôle crucial dans cette mortalité des pollinisateurs, et plus particulièrement les abeilles.

Les insecticides neurotoxiques actuels, appartenant aux familles des néonicotinoïdes, des pyréthrianoïdes et des phénylpyrazoles, sont couramment utilisés pour le traitement des cultures (Jeschke et al., 2011) afin d'éliminer les insectes dits ravageurs. L'action de ces

composés insecticides est la plupart du temps non-sélective, affectant, en plus des ravageurs, les insectes auxiliaires de cultures, notamment les abeilles qui par leurs activités de butinage entrent aisément en contact avec ces produits (Aajoud et al., 2008; Belzunces et al., 2012). En dehors des effets létaux dûs à une exposition aiguë à ces insecticides, des expositions chroniques à des doses plus faibles appelées sublétales, peuvent alors entraîner une accumulation de produits toxiques au sein de la ruche, mais également des effets comportementaux sur les individus pouvant avoir des conséquences néfastes, voire fatales, sur la survie de la colonie (Aliouane et al., 2009; Belzunces et al., 2012). Ce déclin des colonies d'abeilles, et de ce fait de la pollinisation à travers le monde, montre alors des retombées écologiques et économiques importantes. Les pressions des apiculteurs, des populations et également des chercheurs ont abouti à l'interdiction de nombreux composés insecticides, tels que le Gaucho interdit en 1999, ou plus dernièrement, de deux composés néonicotinoïdes au 1^{er} septembre 2018.

L'objectif de cette thèse s'inscrit dans ce contexte et vise tout d'abord à mieux comprendre les effets des composés insecticides chez l'abeille, par une analyse de leurs cibles au niveau moléculaire. Ces données sont alors utilisées afin de concevoir de nouvelles méthodes d'évaluation de la toxicité de ces composés, et éventuellement fournir de nouvelles pistes pour la conception de molécules plus spécifiques ayant une sélectivité accrue pour les insectes ravageurs tout en préservant au maximum les autres insectes auxiliaires de cultures, tels que les abeilles.

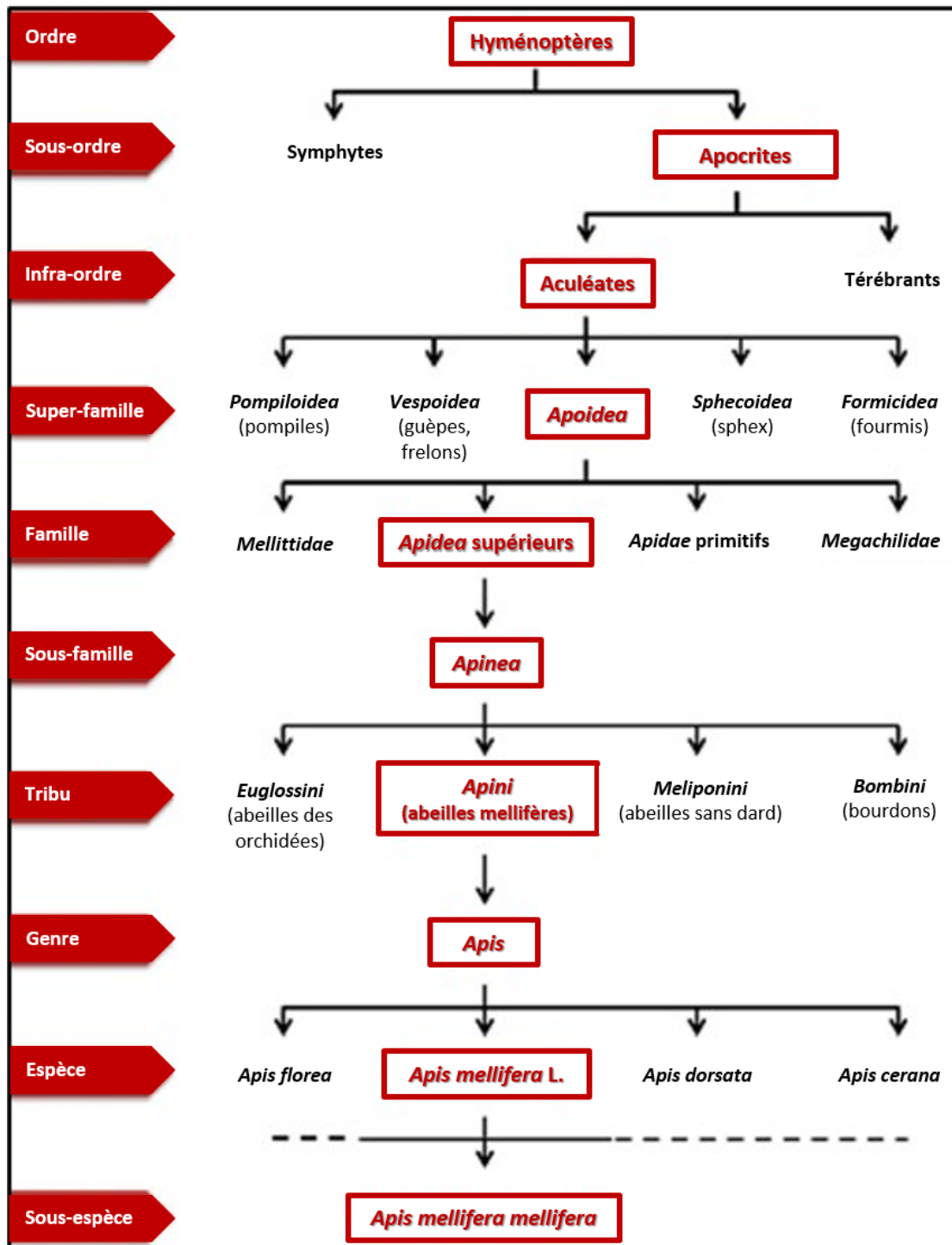


Figure 1 : Classification systématique des abeilles mellifères.

Les abeilles sont des Arthropodes appartenant à la classe des insectes. Elles font partie de l'ordre des Hyménoptères caractérisé par la présence de deux paires d'ailes membraneuses transparentes, de tailles inégales et réunies par une série de crochets. Parmi les Apocrites, hyménoptères dont l'abdomen est séparé du thorax par un étranglement, certains individus femelles possèdent un aiguillon caractérisant le sous-ordre des Aculéates. Les Aculéates regroupent les super-familles des *Apoidea* (abeilles), des *Formicidae* (fourmis) et des *Vespoidea* (guêpes et frelons). Les *Apoidea* ont une cuticule poilue, sont caractérisés par un appareil pour la récolte de pollen, d'une langue développée et d'une alimentation à base de nectar et de pollen. Les abeilles vivant en groupe et possédant une forme de socialité sont des *Apoidea* supérieurs dont fait partie la sous-famille des *Apinae* regroupant l'ensemble des abeilles à corbeilles. Parmi les *Apinae*, la tribu des *Apini* comprend un unique genre, *Apis*, représenté par les abeilles dites mellifères, réparties en neuf espèces distinctes dont l'abeille européenne *Apis mellifera* Linnaeus (évolué en plus d'une vingtaine de sous-espèces interfécondes).

Modifiée à partir de (Le Conte, 2002).

A. Abeille mellifère et contexte

Les abeilles mellifères (du genre *Apis*) sont des insectes volants de la famille des Hyménoptères, réparties en neuf espèces distinctes dont l'abeille européenne *Apis mellifera* (Figure 1). La biologie de cet insecte, ses adaptations anatomiques, son cycle de vie, ainsi que sa spécialisation au sein de la colonie ont été l'objet de nombreux travaux et ouvrages ; « Vie et mœurs des abeilles » en 1969 (Frisch and Dalcq, 2011), « The biology of the honeybee » (Winston, 1991), « L'étonnante abeille » (Tautz, 2009). De par sa capacité à collecter des quantités importantes de ressources alimentaires en peu de temps, l'abeille a été choisie et domestiquée par l'Homme afin de s'adapter à produire de hauts rendements en miel. Cette domestication a notamment permis une dispersion mondiale de l'espèce mellifère, aujourd'hui retrouvée sur l'ensemble des continents, dans des climats très variés (Le Conte and Navajas, 2008). A travers leur activité de butinage, les abeilles représentent les principaux pollinisateurs de la plupart des plantes sauvages et agricoles. En effet, plus de 305 000 espèces de plantes sont pollinisées par les insectes ou autres petits animaux, représentant plus de 85% de l'ensemble des plantes à fleurs (Ollerton et al., 2012). Cela reflète entre autres les rôles écologique et économique majeurs que jouent les pollinisateurs dans le maintien de la biodiversité, sauvage et agricole. A l'échelle humaine, les cultures agricoles représentent une nécessité et un besoin pour l'Homme, et ce depuis toujours, notamment pour son alimentation, mais également pour la production de ressources utiles. En 2014, la superficie des terres agricoles est évaluée à 4,9 milliards d'hectares, soit environ 38% des terres mondiales, et la production agricole est estimée à une valeur de 3 100 milliards de dollars, soit environ 4% du PIB mondial. Ces taux de rendements agricoles sont ainsi en grande partie connexes aux insectes pollinisateurs (bourdons, papillons, guêpes...) puisqu'environ 70% des cultures agricoles destinées à la consommation humaine dépendent directement de leur activité (Gill et al., 2012; Klein et al., 2007). Cette valeur de pollinisation a été estimée à 153 milliards d'euros par an, ce qui représente environ 5% de la valeur de la production agricole mondiale (Gallai et al., 2009). Or, d'ici 2050, la population mondiale devrait atteindre environ 9 milliards d'habitants, ce qui incitera probablement la communauté agricole, en plus d'une meilleure gestion des stocks et d'une diminution du gaspillage, à accroître cette production

agricole afin de nourrir 2,3 milliards de personnes supplémentaires sur Terre (Gatehouse et al., 2011), engendrant une augmentation de plus de 50% de la demande pour l'alimentation humaine et animale. Une des solutions permettant d'optimiser les rendements est l'utilisation de produits phytosanitaires, afin de protéger les cultures, divisés en trois grandes catégories : les herbicides, les fongicides, et les insecticides. Cette dernière classe permet de lutter à la fois contre les dégâts directs des insectes mais également contre les phytopathogènes qu'ils véhiculent. A l'échelle mondiale, les parasites (par leur action directe et indirecte en véhiculant les maladies et virus) détruisent une importante quantité de nourriture pouvant nourrir jusqu'à 1 milliard de personnes supplémentaires (Birch and Anzman-Frasca, 2011). Les insectes nuisibles en particulier, détruisent environ 15% de la production annuelle mondiale et endommagent 20% additionnels des céréales vivrières stockées (Windley et al., 2012). Par conséquent, la destruction de ces insectes procure un avantage économique important (Goulson et al., 2015). Cependant, seule une petite minorité d'arthropodes est classée parmi les organismes dits nuisibles, alors que beaucoup sont bénéfiques en tant que prédateurs ou pollinisateurs. Les insecticides actuels retrouvés sur le marché ne montrent en effet aucune sélectivité d'action et nuisent ainsi à l'ensemble des insectes. Les différentes techniques d'emploi des insecticides (voir chapitre b. Insecticides), induisent une toxicité locale, souvent accrue, sur les insectes environnants, notamment par contact et ingestion. Mais ces insecticides contaminent également les plantes (sauvages non-traitées), les milieux aériens et aquatiques (eaux de surface, cours d'eau, nappes phréatiques et bassins côtiers). Cette contamination "délocalisée" touche alors les insectes de tous types, souvent étrangers aux dommages causés sur les cultures. Chez les insectes pollinisateurs et notamment les abeilles, cela se répercute sur les différentes voies de signalisation (mémoire, olfaction, orientation), ayant des conséquences dramatiques à moyen et long termes sur les ruches et les colonies d'abeilles.

Pertes de colonies d'abeilles

Dès la fin des années 1990, de nombreuses données faisant état d'importants déclin des populations d'abeilles ont été rapportées, et le devenir des insectes pollinisateurs préoccupe aujourd'hui fortement la communauté scientifique (Allen-Wardell et al., 1998; Potts et al., 2010). Parmi les insectes nécessaires à la pollinisation, l'abeille européenne *Apis mellifera* semble particulièrement touchée. Alors que le nombre global de colonies d'abeilles

domestiques a fortement augmenté au cours des cinq dernières décennies, ce nombre est variable en fonction de la zone géographique considérée (vanEngelsdorp and Meixner, 2010). Les observations des colonies d'abeilles s'effectuant principalement à la sortie de l'hiver, les principales pertes de colonies observées en Europe et aux Etats-Unis correspondent majoritairement aux colonies n'ayant pas survécues aux conditions hivernales. De plus, ces pertes sont fortement variables en fonction de la région étudiée ainsi que du rucher analysé (Giray et al., 2010; vanEngelsdorp et al., 2008). En effet, alors que la plupart des pertes hivernales d'abeilles sont normales, certains apiculteurs ont enregistré des pertes allant jusqu'à 80 à 100% au cours de l'hiver 2006-2007 (Oldroyd, 2007) aux Etats-Unis (Figure 2). Une partie des pertes de colonies d'abeilles présente divers symptômes particuliers regroupés sous le terme « Colony Collapse Disorder » (CCD), ou syndrome d'effondrement des colonies, en français. Ce syndrome se caractérise par une perte importante et rapide des abeilles adultes d'une colonie, ne laissant que la reine et quelques jeunes adultes au sein de la ruche, ainsi que de grandes quantités de réserves alimentaires (Ellis et al., 2010; vanEngelsdorp et al., 2009). Les apiculteurs européens ont également observé des phénomènes similaires, avec un déclin supérieur à 50% en moyenne (30 à 90%) en Europe, et plus particulièrement en France. Ce phénomène extrême est devenu une tendance récurrente au cours des années suivantes, indiquant que de nouveaux facteurs étaient certainement en jeu.

De nombreuses études ont avancées plusieurs causes sous-jacentes possibles pouvant expliquer cette mortalité des abeilles : les changements de paysages et de climat (Le Conte and Navajas, 2008), les agents pathogènes tels que les champignons, les protozoaires ou encore le *Varroa destructor* (acarien ectoparasite majeur de l'abeille au sein des ruches), les bactéries et virus, mais aussi les prédateurs tels que le frelon à pattes jaunes *Vespa velutina* (Gargominy, 2010; Monceau et al., 2013; Rortais et al., 2010). La perte d'habitat, avec jusqu'à 97% de prairies riches en fleurs converties en terres agricoles dans les pays développés au cours du 20^{ième} siècle, contribue également de manière évidente au déclin à long terme des abeilles (Goulson et al., 2015). Enfin, des interactions délétères synergiques entre les divers agents pathogènes compliquent probablement le problème, comme le prouve l'infestation par le varroa au sein des ruches, facilitant ainsi la contamination par le virus de l'aile déformée (DWV) chez l'abeille (Martin et al., 2012). La contribution d'autres facteurs tels que les régimes monotones (dus aux pratiques agricoles modernes) et la pollution (moins étudiée) peuvent également contribuer directement et/ou potentialiser certains des effets néfastes de ces

facteurs de stress identifiés (Potts et al., 2010). La recherche d'un agent causal principal responsable des pertes de colonies d'abeilles a alors été un objectif mené par de nombreux chercheurs, et il est aujourd'hui clair que les causes de ces déclin d'abeilles résulteraient d'interactions entre multiples paramètres (Neumann and Carreck, 2010; Potts et al., 2010; vanEngelsdorp et al., 2009). Parmi ceux-ci, il semblerait que les insecticides et agents pathogènes aient la plus grande influence sur ces pertes de colonies d'abeilles (Neumann and Carreck, 2010). Les perturbations environnementales majeures telles que la perte de biodiversité contribuent par conséquent au déclin des abeilles amenant à un impact économique important.

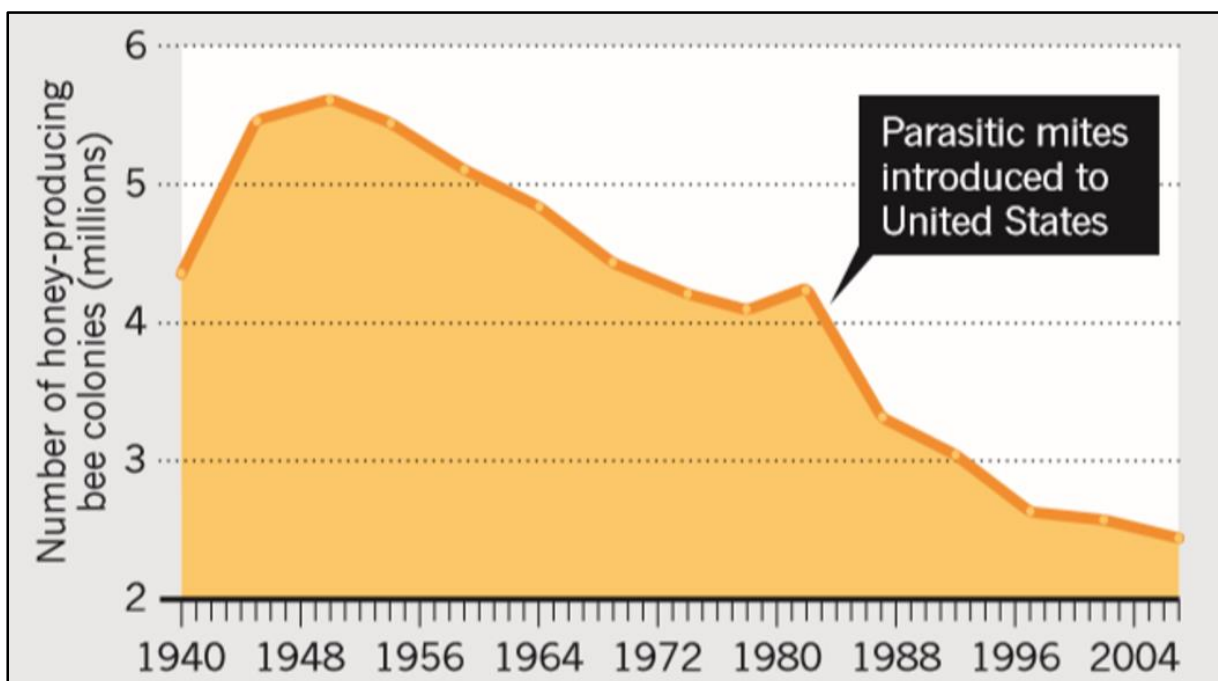


Figure 2 : Représentation de l'évolution du déclin du nombre des colonies d'abeilles aux Etats-Unis, en millions, sur une période allant de 1945 à 2005. Au cours de la seconde moitié du XXème siècle, le nombre des colonies d'abeilles a été quasiment divisé par deux aux Etats-Unis. D'après (Levy, 2011).

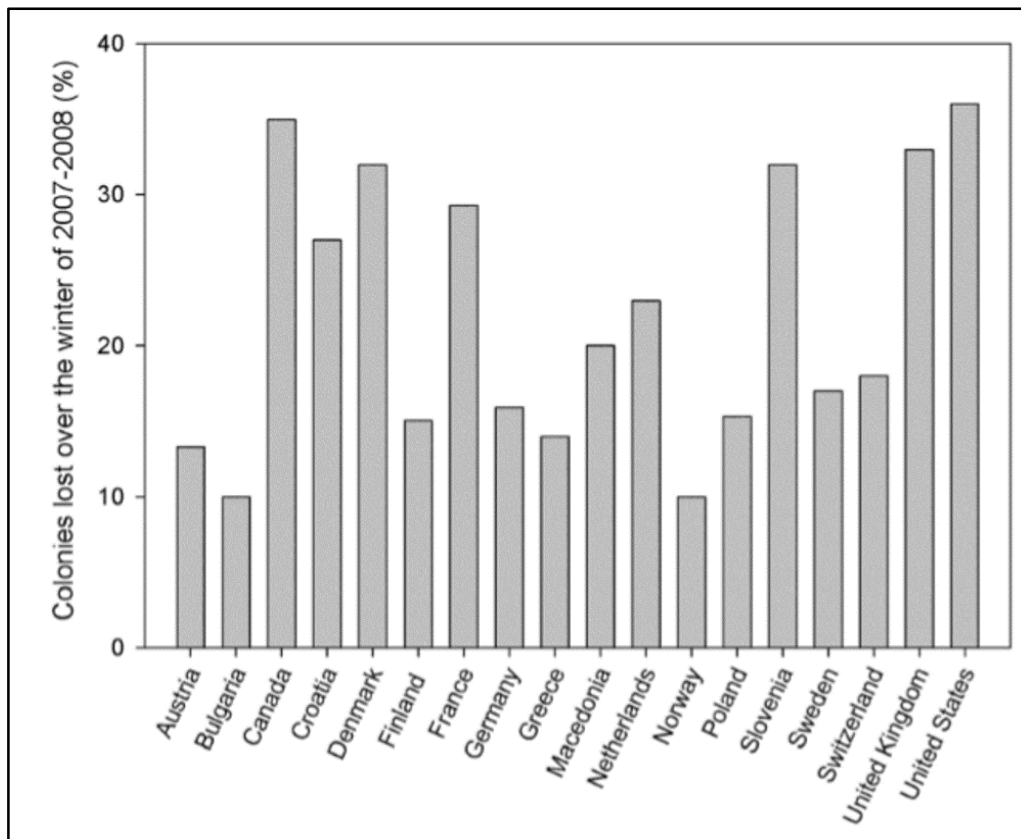


Figure 3 : Pertes de colonies enregistrées durant l'hiver 2007-2008 dans divers pays du monde. Les pertes de colonies observées à la fin de l'hiver 2007-2008 fluctuent entre 10 % de pertes en Norvège et 36 % de pertes aux Etats-Unis. Les pertes hivernales sont donc d'ampleur très variables en fonction du pays considéré. D'après (vanEngelsdorp and Meixner, 2010).

B. Insecticides

On trouve actuellement dans le dictionnaire Larousse, la définition d'insecticide comme étant « un produit utilisé dans la lutte contre les insectes, ou d'autres invertébrés (acariens, myriapodes), nuisibles à l'homme, aux cultures, aux denrées alimentaires ». Les insecticides neurotoxiques représentent en effet les principaux moyens de protection des cultures, de la population ainsi que du bétail, en luttant contre les insectes nuisibles et ravageurs responsables d'attaques pathogènes et de transmission de maladies et virus (Casida and Durkin, 2013). Ces composés insecticides agissent pour la plupart comme poison au niveau du système nerveux, et ce depuis l'apparition, dans les années 1940, du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et des divers polychlorocycloalcanes (PCCA), premiers composés chimiques entrant dans la composition des insecticides. Par la suite, et au fil des

années, de nombreux autres composés ont vus le jour : les organophosphates (PO) dans les années 1950, les méthylcarbamates (MC) durant les années 1960, suivis des pyréthriinoïdes dans les années 1970, et enfin les néonicotinoïdes au cours des années 1980 (Casida and Quistad, 1998). Diverses raisons peuvent expliquer le fait que ces neurotoxiques représentent les principaux insecticides de synthèse utilisés (Casida and Quistad, 2004). Tout d'abord, ceux-ci sont capables d'agir de façon rapide sur de nombreux sites sensibles et critiques pour la physiologie neuronale, détruisant ainsi le ravageur avant que celui-ci n'ait eu le temps de faire des dégâts. Ces composés pour la plupart de nature lipophile sont également capables de traverser la gaine protégeant le nerf de l'insecte, rendant ainsi ceux-ci particulièrement toxiques. Les insecticides appartenant aux familles des organochlorés, des organophosphorés ou des carbamates furent l'objet d'intérêt dès le milieu du XX^{ème} siècle par le développement de la chimie de synthèse. Ceux-ci ont par la suite fortement modifié les pratiques agricoles et permis la lutte contre les insectes ravageurs et vecteurs de maladies, améliorant ainsi l'état en santé humaine, en étant employé de façon extrême (Casida and Quistad, 1998). Dès les années 1970 en revanche, certains composés tels que les organochlorés notamment, ont été interdits dans de nombreux pays de par les risques toxicologiques et les contaminations environnementales engendrés. De nouveaux composés ont été alors développés, appartenant à trois grandes familles d'insecticides : les néonicotinoïdes, les pyréthriinoïdes, et les phénylpyrazoles (Casida and Quistad, 1998).

D'un point de vue économique, le marché mondial des produits phytosanitaires, et notamment les insecticides, représente à ce jour environ 40,5 milliards de dollars. La France représente le premier consommateur européen de ces produits phytosanitaires, avec une consommation de près de 79 000 tonnes en 2008, et occupe la 4^e place au niveau mondial. Les herbicides représentent environ 47% du marché mondial des produits phytosanitaires, contre 26% pour les fongicides et enfin 24% pour les insecticides (Figure 4).

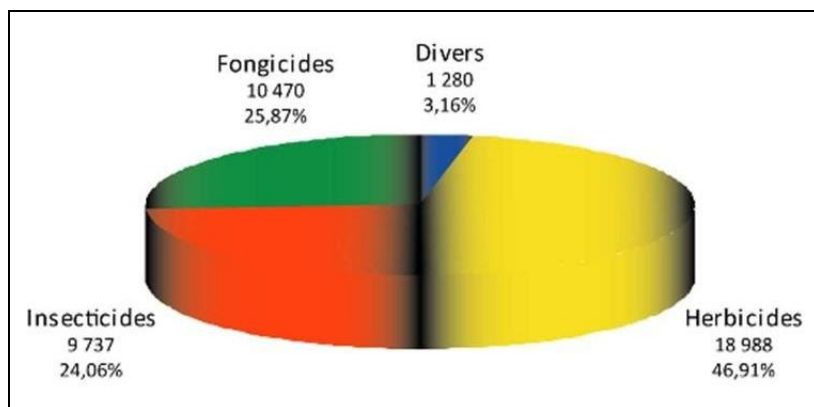


Figure 4 : Répartition du marché mondial des produits phytosanitaires en 2008. D'après (Jeschke et al., 2011).

Le marché des insecticides représente à lui seul environ 10,5 milliards de dollars au niveau mondial. Celui-ci étant dominé par les néonicotinoïdes à hauteur de 24% de part de marché, suivi par les pyréthriinoïdes (15%), les organophosphorés (environ 13%) et enfin les carbamates (environ 11%) (Figure 5) (Jeschke et al., 2011).

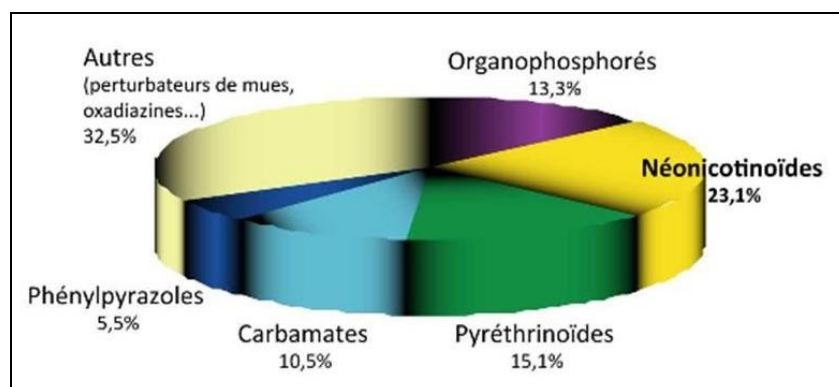


Figure 5 : Répartition du marché mondial des produits insecticides en 2008. Les composés néonicotinoïdes, ciblant les récepteurs nicotiniques de l'ACh, représentent la plus grosse part de marché à travers le monde, avec plus de 23% d'utilisation. D'après (Jeschke et al., 2011).

Bien que celle-ci soit probablement d'origine multifactorielle, cette mortalité des insectes pollinisateurs est en grande partie due aux changements dans l'utilisation des terres agricoles, provoquant des pertes d'habitats et de ressources alimentaires mais également, par la pulvérisation intensive d'insecticides, amenant une toxicité locale immédiate ou délocalisée

et retardée importante. Des centaines d'études ont depuis montré que ces insecticides possédaient un effet neurotoxique peu spécifique sur l'insecte, affectant également des espèces non-ciblées (Casida, 2009). Chez les insectes, ces molécules touchent spécifiquement (par rapport aux mammifères) les canaux ioniques et récepteurs ionotropiques. La toxicité de ces nouvelles familles de composés insecticides est alors plus accrue car basée sur une spécificité de site d'action d'organismes ciblés. Ainsi, la plupart des insecticides couramment utilisés sont des neurotoxiques agissant sur le système nerveux d'organismes cibles, et sont ainsi classés en diverses familles agissant sur différents récepteurs spécifiques. La famille des phénylpyrazoles (fipronil) s'attaque aux récepteurs GABA, les pyréthriinoïdes (perméthrine) agissent sur les canaux dépendants du voltage, calciques et sodiques, et enfin les néonicotinoïdes (poncho) agissent comme des agonistes des récepteurs nicotiniques cholinergiques (Figure 6).

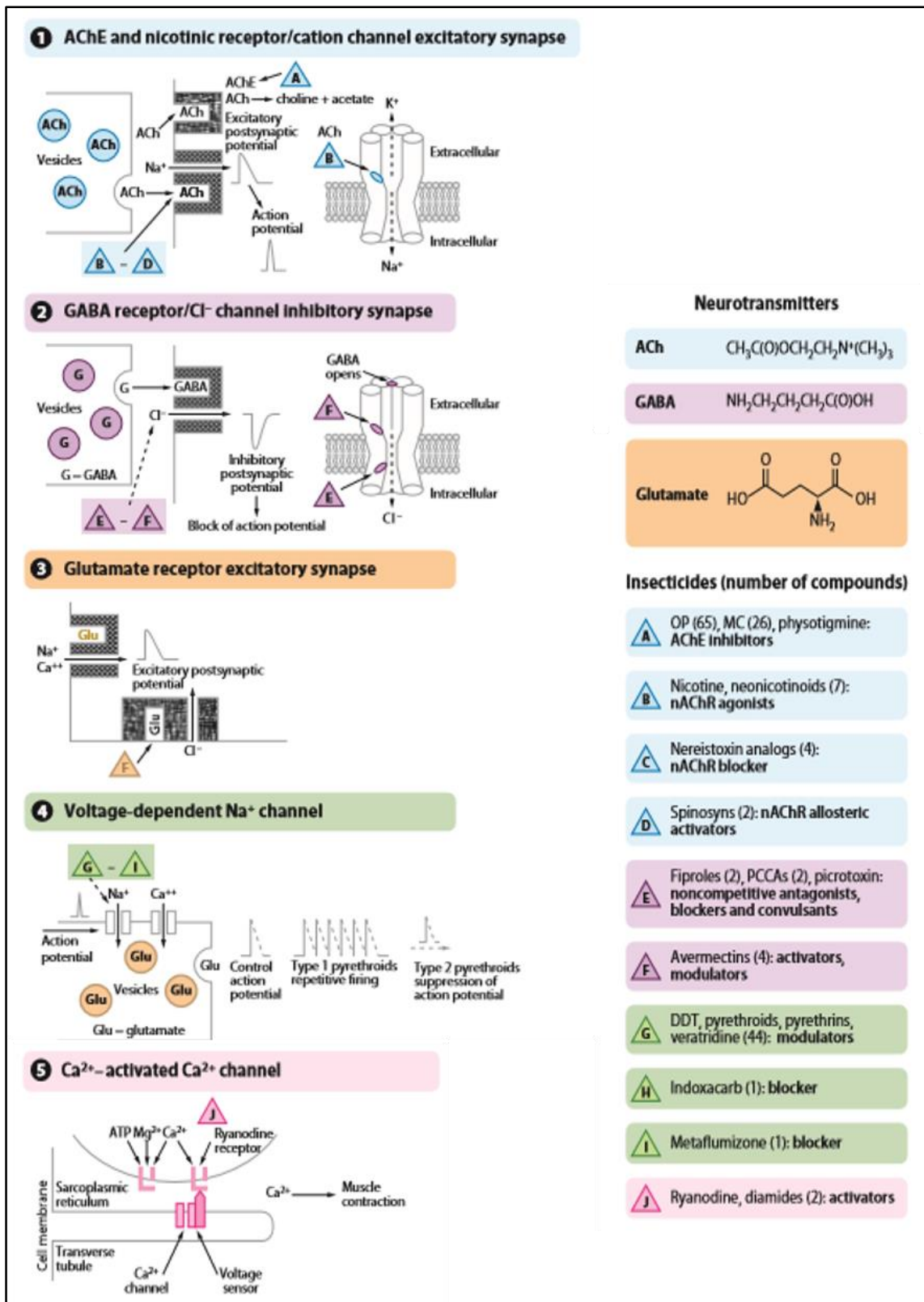


Figure 6 : Représentation des différents sites d'action des composés insecticides neuroactifs, au niveau de l'influx nerveux et la transmission neuromusculaire. Les terminaisons présynaptiques (1-3) et la cellule postsynaptique (1-3) ou la cellule musculaire (5) sont représentées. Pour les composés insecticides, sont donnés entre parenthèse le nombre de composés agissant sur chaque site (A – K).

Abréviations : ACh, acétylcholine ; DDT, dichlorodiphényltrichloroéthane ; MC, méthylcarbamate ; nAChR, récepteur nicotinique de l'acétylcholine ; OP, organophosphate ; PCCA, polychlorocycloalcane.

Tirée de (Casida and Durkin, 2013).

De nombreuses études ont depuis démontré la forte toxicité des pyréthriinoïdes et des néonicotinoïdes notamment, deux des composés insecticides les plus largement utilisés dans la conception des insecticides, à l'égard des abeilles domestiques (Gill et al., 2012; Henry et al., 2012).

La classe des néonicotinoïdes

Parmi les diverses classes d'insecticides trouvées sur le marché actuellement, les néonicotinoïdes représentent la classe de composés insecticides la plus "populaire" et la plus largement utilisée à travers le monde (Jeschke et al., 2011). Ces molécules synthétiques dérivées de la nicotine, substance naturelle produite par certaines plantes telles que la plante de tabac (*Nicotiana tabacum*), sont en effet parmi les insecticides les plus efficaces dans le contrôle des insectes nuisibles sur de nombreuses cultures agricoles (maïs, colza, betterave...) (Elbert et al., 2008). Agonistes partiels se fixant sur le même site que la molécule d'ACh, ces composés induisent une hyperstimulation du système nerveux central de l'insecte, activant spécifiquement les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChR) situés au niveau des neurones post-synaptiques (Figure 9) (Jeschke et al., 2011). Cette classe d'insecticides comprend des molécules mises sur le marché depuis les années 1980 (Figure 7) et utilisées à ce jour dans plus de 120 pays à travers le monde, dont approximativement 60% d'emploi s'effectue par traitement de la graine et du sol (Bonmatin et al., 2015; Jeschke et al., 2011). Parmi celles-ci, l'imidaclopride fut la première molécule néonicotinoïde synthétisée et est rapidement devenue l'un des composés insecticides les plus employés à travers le monde (Decourtye and Devillers, 2010) dans de nombreuses formulations, dont la plus connue est le Gaucho® (Bayer - CropScience). Des études ont montré que l'imidaclopride agissait sur de nombreux sous-types de récepteurs nicotiques à l'ACh, dont la sous-unité α (voir chapitre C.2.ii.) jouerait un rôle important dans la sensibilité à ce composé (Buckingham et al., 1997; Matsuda et al., 2001; Raymond-Delpech et al., 2005).

L'une des caractéristiques clefs de cette classe de molécules néonicotinoïdes réside dans ses propriétés systémiques, agissant de façon globale et à plusieurs niveaux, rendant ainsi ces molécules particulièrement toxiques. En effet, les néonicotinoïdes sont des molécules de petites tailles et sont de plus particulièrement solubles dans l'eau (Bonmatin et al., 2015). Après absorption, ces molécules sont alors présentes sur l'ensemble des parties de la plante

traitée, et montre une longue persistance dans l'environnement, avec une demi-vie au niveau des sols de plus de 1000 jours (Bonmatin et al., 2015). Ces diverses propriétés expliquent ainsi la toxicité accrue de cette classe de composés, rendant celle-ci particulièrement néfaste pour l'ensemble des insectes, ciblés ou non. En revanche, comparativement aux autres classes d'insecticides, les néonicotinoïdes présentent une toxicité faible pour les vertébrés (Raymond-Delpech et al., 2005): la dose journalière admissible (DJA) par exemple, retrouvée sur le site Agritox (<http://www.agritox.anses.fr/php/donnees-essentielles.php>), est estimé à environ 0,06 mg/kg/jour chez le mammifère pour le composé néonicotinoïde imidaclopride (Agritox, mise à jour 10/2019), tandis que la dose létale 50 (DL50) par voie orale chez l'abeille *Apis mellifera* est estimée à 3,7 ng/abeille (Tableau 1).

En 2013, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a publié une déclaration indiquant que cinq composés néonicotinoïdes spécifiques (imidaclopride, thiaméthoxame, acétamipride, thiaclopride et clothianidine) présentaient un risque aigu pour les abeilles domestiques. Sur cette base, la Commission Européenne (CE) a proposé ainsi l'interdiction stricte de la mise sur le marché de formulations contenant trois de ces composés (clothianidine, imidaclopride et thiaméthoxame). Ce moratoire a depuis expiré en décembre 2015. Mais le 17 mars 2016, les députés de l'Assemblée nationale française ont décidé d'interdire totalement l'utilisation de certains composés néonicotinoïdes à compter de septembre 2018 (The European Commission, 2013). En conséquence, toutes les utilisations extérieures des trois substances, clothianidine, imidaclopride et thiaméthoxame, sont interdites et seule l'utilisation dans les serres permanentes reste à ce jour possible. Enfin, compte tenu de ces restrictions, les demandeurs du renouvellement de l'approbation de la clothianidine et du thiaméthoxame ont retiré leur demande, et l'approbation de ces substances a expiré les 31 janvier 2019 et 30 avril 2019, respectivement.

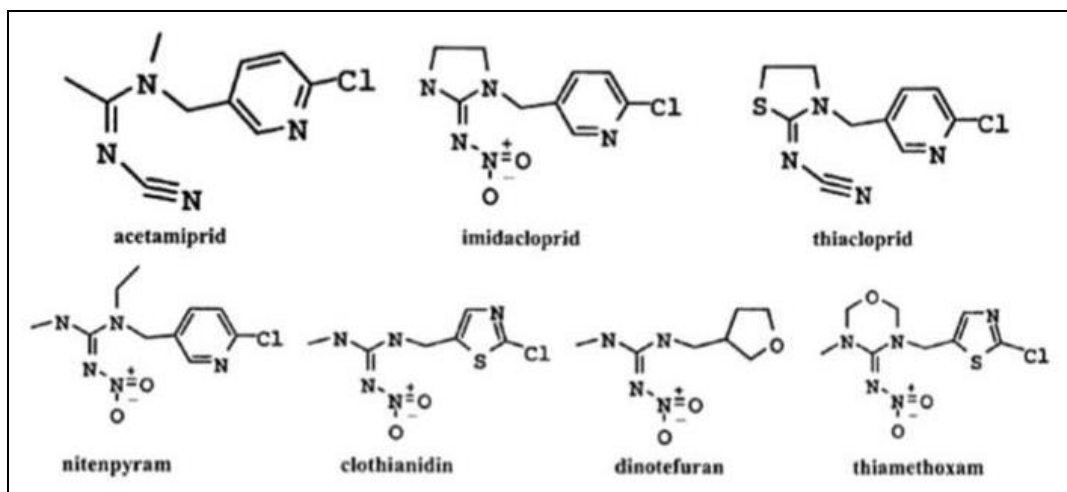


Figure 7 : Ensemble des structures primaires des principales molécules insecticides néonicotinoïdes.
D'après (Iwasa et al., 2004).

La classe des phénylpyrazoles

Cette classe d'insecticides est composée de molécules se liant de manière spécifique aux récepteurs neuronaux à l'acide γ -amino-butérique (GABA, voir chapitre C.2.i.), et induisent une hyperexcitation du système nerveux central (Figure 9) (Cole and Rodgers, 1993; Collins and Callcott, 1998). Contrairement aux insecticides néonicotinoïdes, les phénylpyrazoles sont des composés antagonistes non-compétitifs, bouchant le pore. En revanche, ces deux types de molécules induisent toutes deux une dépolarisation de la cellule provoquant, *in fine*, une hyperactivité neuronale devenant délétère. Parmi ces composés phénylpyrazoles, le fipronil a été mis sur le marché au début des années 1990 en Europe, et représente la molécule la plus utilisée à ce jour (Figure 8). Historiquement, celle-ci a été la première molécule phénylpyrazole décrite, en 1992 (Colliot et al., 1992), mais ce sera dix ans plus tard que son action spécifique au niveau des récepteurs GABA neuronaux d'insectes a été décrite (Raymond and Sattelle, 2002). Ce composé insecticide agirait également sur les récepteurs homomériques de type Glu/Cl⁻ (Raymond and Sattelle, 2002), et montrerait une toxicité légèrement plus accrue pour les récepteurs au GABA d'insectes que pour les mammifères, avec des IC₅₀ à 240 nM et 1,6 μ M, pour la sous-unité RDL du récepteur au GABA d'insectes et pour le récepteur GABA_A de DRG de rat, respectivement (Ikeda et al., 2001). De plus, la DJA mesurée pour ce composé chez le rat est de 0,0002 mg/kg/jour (rapport AFSSE, 2005), tandis que la DL₅₀ chez l'abeille est déduite à 4,17 ng par voie orale (Tableau 1).

En 2004, cette molécule a toutefois fait l'objet de restriction pour son utilisation dans la protection des cultures en France. En 2013, l'Union Européenne vote l'interdiction de l'utilisation de cette molécule sur certaines cultures (tournesol et maïs) après un rapport de l'EFSA présentant le fipronil comme un facteur de risque aigu pour la santé des abeilles lorsque celui-ci est utilisé en traitement de semence (European Food Safety Authority, 2013). De plus, ce composé insecticide montre une forte efficacité sur un large spectre d'arthropodes, ainsi que sur les individus montrant une résistance à diverses classes d'insecticides antérieures (carbamates ou organophosphorés) (Gunasekara et al., 2007).

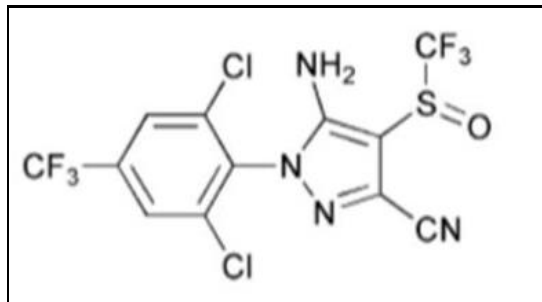


Figure 8 : Structure primaire de la molécule de fipronil.
D'après (Nauen and Bretschneider, 2002).

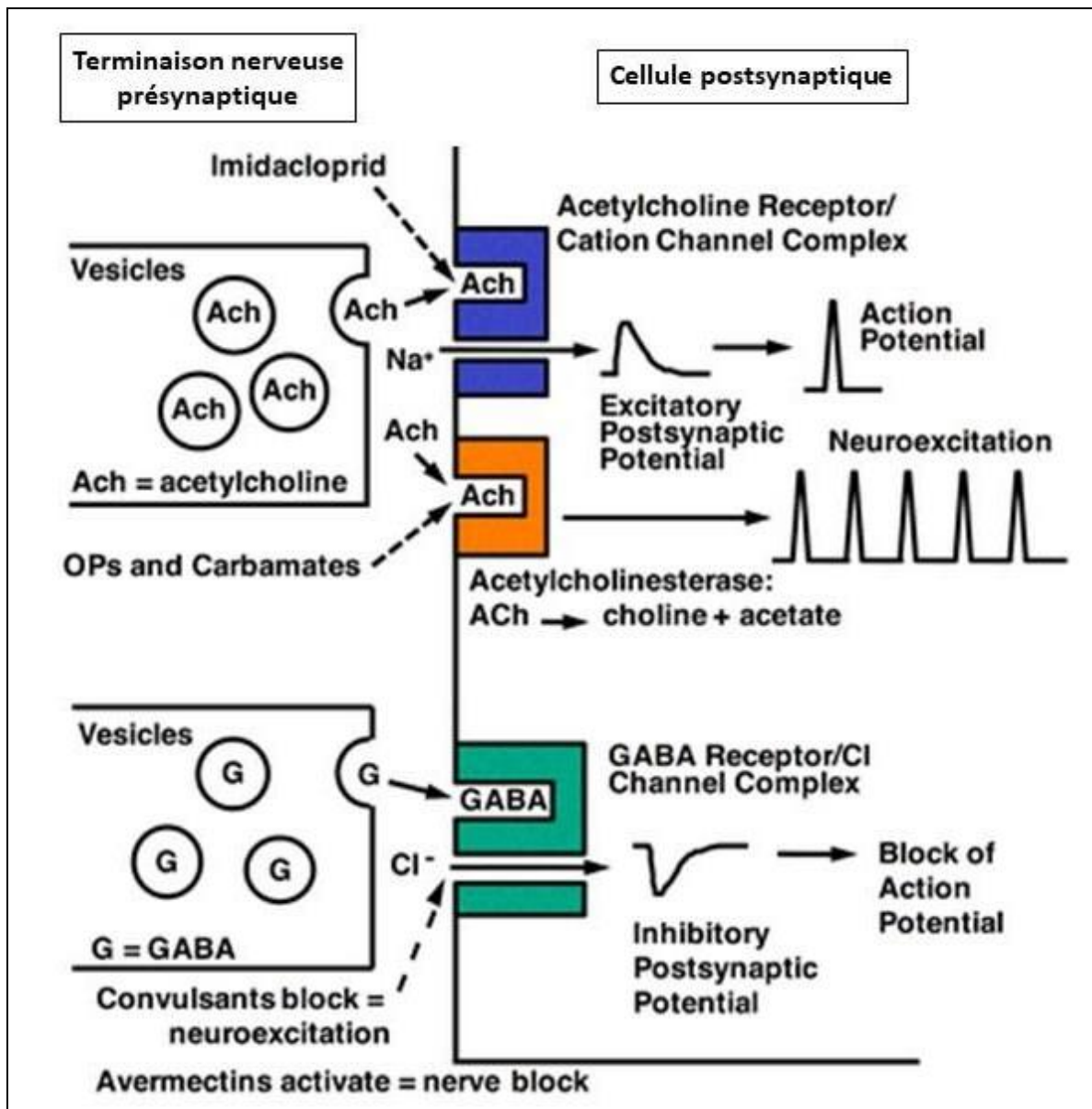


Figure 9 : Sites d'action des insecticides neurotoxiques néonicotinoïdes et phénylpyrazoles localisés au niveau post-synaptiques. En conditions normales, le neurotransmetteur acétylcholine (ACh) se lie à son récepteur nicotinique (nAChR) pour une durée très brève de l'ordre de quelques millisecondes. Le changement de conformation du récepteur permet alors l'ouverture du canal et l'influx d'ions Na^+ extracellulaires résultant en une stimulation nerveuse courte et contrôlée. Les néonicotinoïdes sont des molécules agonistes qui se fixent au nAChR durant des périodes beaucoup plus longues, généralement plusieurs minutes, entraînant ainsi une hyperstimulation nerveuse. L'acide γ -amino-butérique (GABA), principal neurotransmetteur inhibiteur, se fixe sur son récepteur et permet l'ouverture du canal transmembranaire pentamérique et le passage des ions Cl^- , en conditions normales. L'influx d'ions Cl^- a pour fonction de limiter et contrebalancer l'activité électrique dans les neurones post-synaptiques. La liaison d'une molécule antagoniste phénylpyrazole sur le récepteur GABA inhibe l'entrée d'ions Cl^- et donc l'apparition du potentiel postsynaptique inhibiteur. Les phénylpyrazoles entraînent donc indirectement une hyperexcitation du système nerveux central en empêchant l'effet inhibiteur du neurotransmetteur GABA.

Adapté d'après (Bloomquist, 2009).

La classe des pyréthrinoïdes

Les pyréthrinoïdes sont des composés organochlorés regroupant diverses molécules actives employées notamment pour leurs propriétés insecticides en agissant sur les canaux ioniques dépendants du voltage de type calcique, mais aussi sodique (voir chapitre C.1.i. et ii., respectivement) (Casida and Durkin, 2013; Clark and Symington, 2007; Raymond-Delpech et al., 2005). Les pyréthrines (Figure 10), extraits à partir des fleurs de chrysanthème, constituent le groupe majoritaire des pyréthrinoïdes.

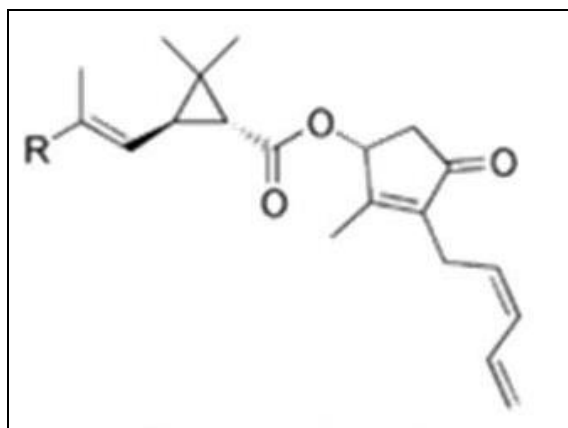


Figure 10 : Structure primaire de la molécule de Pyréthrine.

Par la suite, les alléthrine, apparus en 1949, sont des pyréthrinoïdes de synthèse créés afin d'accroître l'activité et la persistance de cette classe d'insecticides. De nombreux composés pyréthrinoïdes sont aujourd'hui retrouvés sur le marché, parmi lesquels la perméthrine, la deltaméthrine ou encore la cyperméthrine. Cette classe d'insecticides pyréthrinoïdes peut être divisée en deux groupes en fonction de l'absence (Type I) ou la présence (Type II) d'un groupement nitrile (composé d'un atome de carbone et d'un atome d'azote) au niveau du carbone alpha de la molécule (Figure 11) (Laufer et al., 1985; Raymond-Delpech et al., 2005). De plus, des recherches montrent que les pyréthrinoïdes de type I (tels que la perméthrine) agissent sur les canaux sodiques dépendants du voltage en configuration activée/ouverte, tandis que ceux de type II ont une action sur les canaux sodiques inactivés (Brown and Narahashi, 1992).

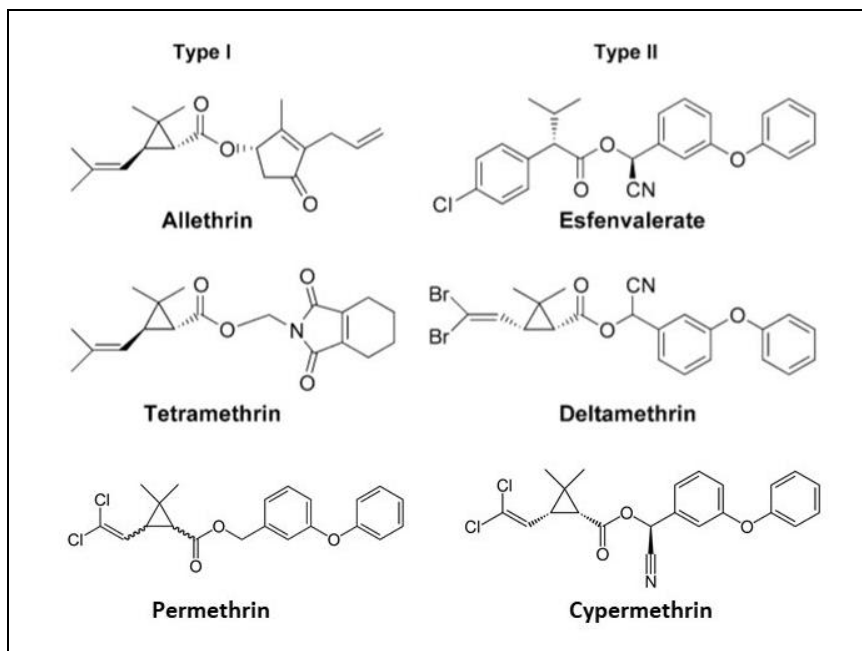


Figure 11 : Structure des différents composés insecticides pyréthrinoïdes, de type I ou de type II. La classe des pyréthrinoïdes de type II présente un groupement nitrile, non-retrouvé chez les composés de type I. Adapté d'après (Raymond-Delpech et al., 2005).

Les pyréthrinoïdes sont des insecticides dits de « 3^e génération ». Ceux-ci agissent par contact et sont dotés d'une forte toxicité neurobiologique en interférant avec la propagation des signaux nerveux. Ces composés provoquent une hyperexcitabilité nerveuse en empêchant les canaux sodiques de se refermer, créant ainsi un choc neurotoxique. Par maintien de ces canaux sodiques ouverts, les pyréthrinoïdes déclenchent alors une dépolarisation prolongée de la membrane, engendrant ainsi divers symptômes tels que des tremblements ou des mouvements involontaires (Laufer et al., 1985; Raymond-Delpech et al., 2005). Diverses études se rapportant à cette classe de composés insecticides pyréthrinoïdes rapportent que même des doses sublétales auraient une incidence sur les fonctions essentielles de l'abeille domestique, telles que la recherche de nourriture ou l'orientation lors des déplacements en vol (retour à la ruche), en interférant avec le traitement sensoriel, l'apprentissage et la mémoire (Bryden et al., 2013). La DL50 mesurée chez les abeilles pour le composé pyréthrinoïde deltaméthrine est d'environ 49 à 79 ng/abeille, par voie orale (Tableau 1), confirmant les hypothèses avancées quant à la toxicité de ces composés. De plus, ceux-ci

s'avèrent si puissants qu'il est aujourd'hui possible de les utiliser à de faibles doses au niveau des zones traitées (environ 10 à 40 g de matière active par hectare). Enfin, comparativement aux autres classes d'insecticides, les pyréthrinoïdes montrent une forte toxicité chez les mammifères, avec une DJA enregistrée à 0,01 mg/kg/jour (<http://www.agritox.anses.fr/php/donnees-essentielles.php>), rendant ces composés particulièrement néfastes pour l'ensemble des espèces.

1. Rôles et Intérêts

Les insecticides (composés d'un principe actif synthétique ou naturel) actuellement présents sur le marché, présentent tous la même finalité : engendrer la disparition des insectes ravageurs, en agissant pour la plupart sur la neurobiologie de ces invertébrés. Ces composés interviennent ainsi spécifiquement sur les canaux ioniques et récepteurs membranaires des insectes, mais de façon non-sélective. De plus, ceux-ci présentent divers modes d'emploi au niveau des cultures, dans le but de toucher un large éventail d'insectes ravageurs. On trouve ainsi communément de nombreux insecticides utilisés par épandage (ou pulvérisation) servant à répandre ces produits directement sur la zone cultivée. Grâce à l'avancée des techniques et machines agricoles, cette technique permet aujourd'hui de pulvériser un grand nombre d'hectares de cultures agricoles de façon rapide et aisée. Se disséminant ainsi dans les sols ainsi que par voie aérienne, l'ensemble des insectes environnants, ravageurs ou non, est alors affecté. Les traitements peuvent également être pratiqués par enrobage des semences, où les graines destinées aux semis sont ainsi préparées avant d'être cultivées. La molécule active se répand alors au sein de la plante, au cours de la germination de la graine, au niveau des feuilles et des racines, en utilisant directement le système vasculaire de celle-ci. Cette technique a notamment pour but de réduire les risques d'exposition des organismes non-cibles en comparaison avec les applications par pulvérisation (Charvet et al., 2004). Les avantages proposés par l'utilisation des insecticides au niveau agricole sont nombreux, dans le but de protéger les productions contre de multiples agressions pouvant abréger le bon développement des plantes. De plus, certains agriculteurs arrivent à multiplier par deux leur production agricole par utilisation de ces produits. Dès lors, les insecticides permettent, entre autre, de maintenir des taux de rendements agricoles conséquents, et favorisent les récoltes

régulières (de qualité et en quantité suffisantes). Dès lors, les avantages liés aux insecticides ne se limitent pas à l'agriculture, et nombreux sont utilisés notamment en usage domestique contre les insectes environnants (moustiques, frelons, fourmis...). Ceux-ci sont également employés à des fins sanitaires en prévention des épidémies de virus et parasites (virus de la dengue véhiculé par le moustique *Aedes aegypti* par exemple).

2. Toxicité

De par leurs objectifs ainsi que leur mode d'action, les insecticides (d'origine naturelle ou microbienne) montrent un impact écologique considérable affectant de façon importante la biodiversité. Des premiers tests réalisés en laboratoire cherchent à évaluer la toxicité aiguë de composés insecticides envers les abeilles ouvrières par différents modes d'administration, notamment par voie orale ou topique. Ceux-ci permettent entre autres de définir les doses létales 50 (DL50) correspondant à la quantité de produit entraînant 50% de mortalité des individus après 24 heures, suite à une unique administration (Tableau 1). Les valeurs de DL50 pour les composés imidaclopride et fipronil sont relativement faibles (notamment comparés au thiaclopride), permettant de considérer ces composés comme fortement toxiques envers les insectes, et notamment les abeilles (Decourtye and Devillers, 2010). En revanche, de par les fluctuations de valeurs enregistrées pour certains composés, la détermination exacte de celles-ci pourrait ainsi être biaisée par divers facteurs non considérés dans les tests de toxicité, tels que les sous-espèces, les colonies, ou encore l'âge des abeilles étudiées (Decourtye and Devillers, 2010).

	DL50, voie orale (ng/abeille)	DL50, voie topique (ng/abeille)	Source
Fipronil	4,2	5,9	(European Food Safety Authority, 2013)
Imidaclopride	3,7	81	bayer-agri
Thiaclopride	17320	/	(Kievits and Bruneau, 2009)
Deltaméthrine	49 à 79	1,5 à 51	sagepesticides

Tableau 1 : Ensemble des DL50 obtenues par voie orale ou voie topique chez l'abeille *Apis mellifera*, pour trois familles de composés insecticides : le fipronil (famille des phénylpyrazoles), l'imidaclopride et le thiaclopride (néonicotinoïdes) et la deltaméthrine (pyréthrianoïde).

Si ces premiers tests effectués en laboratoire indiquent une toxicité aiguë des composés insecticides pour l'abeille, d'autres tests de terrain (plus réaliste) ont également été mis au point (European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2010). Ces études permettent notamment un suivi, sur une période plus longue, de différents paramètres tels que la mortalité au sein des colonies ou encore les comportements des abeilles butineuses (vol, retour à la ruche, butinage). Par ailleurs, leur rémanence prononcée dans l'environnement fait de ces composés insecticides des facteurs de contamination importants de l'air (25 à 75% des insecticides se retrouvent dans l'atmosphère lors de l'épandage ou la pulvérisation), contribuant directement ou indirectement à la disparition des insectes volants, à la régression des populations d'animaux insectivores, mais aussi à l'apparition de phénomènes de résistance limitant leur efficacité à long terme. Des études effectuées sur le terrain auprès de cultures subissant ces traitements insecticides (European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2010) ont montré que la toxicité de ces composés sur les insectes volants, les abeilles domestiques en particulier, était en relation avec la distance à laquelle ces insectes se trouvaient lors de l'épandage. De plus, ces insecticides touchent également les prédateurs naturels de l'espèce ciblée, perturbant ainsi fortement les réseaux trophiques, y compris les agrosystèmes, dans les rizières notamment (Cohen et al., 1994). Les insecticides peuvent donc dégrader de nombreux écosystèmes, et paradoxalement favoriser aussi la diffusion d'insectes parasites devenus résistants (Joshi et

al., 1992). Enfin, selon l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), les composés insecticides seraient également retrouvés dans les eaux de pluie, à hauteur de plus de 60%, et la concentration de ceux-ci dans les brouillards serait ainsi 140 fois supérieure à la concentration maximale admissible. Des études de l'Institut Français de l'Environnement (IFEN) montrent également que des résidus insecticides seraient retrouvés dans 96% des eaux dites superficielles (ruisseau, fleuve, rivière, lac ...), et 61% au niveau des eaux souterraines (infiltration de l'eau de pluie dans les sols). Contrairement aux insecticides utilisés par pulvérisation ayant une action à court terme sur les plantes, les molécules dites systémiques, tels que les néonicotinoïdes, sont persistantes. Détectés à de faibles concentrations dans le pollen et le nectar des plantes traitées, ces composés sont susceptibles de toucher les abeilles par des intoxications à la fois aiguës, chroniques et sublétales, qu'uniquement par intoxications aiguës (Halm et al., 2006).

Enfin, ces insecticides ne sont pas sans conséquence sur la santé humaine. Il a en effet été montré dans de nombreuses recherches que ces composés insecticides possédaient un impact non négligeable sur l'Homme : malformations (Eriksson, 1997), maladie de Parkinson (Betarbet et al., 2000; Sherer et al., 2003), naissances prématurées (Klebanoff et al., 2001), ou encore dysfonctionnements neuropsychologiques (Kamel and Hoppin, 2004). Des études épidémiologiques ont notamment permis de déterminer un lien entre l'exposition à certains composés insecticides chimiques (contenant de l'arsenic) et le développement de cancers incluant des cancers pancréatiques, des ovaires, ou encore de la prostate (Eriksson, 1997), tandis que les autres sont seulement suspectés de cancérogénicité (Alavanja et al., 2004). Plusieurs études scientifiques menées en condition de laboratoire ou de terrain ont ainsi montré que l'utilisation des produits insecticides était liée à de nombreux problèmes majeurs : (i) le manque de spécificité phylétique entraînant des impacts sur la santé humaine et sur l'environnement, et (ii) un manque de diversité des mécanismes d'action de ces composés conduisant ainsi à une résistance aux insecticides (Windley et al., 2012).

Chez les abeilles, ces composés insecticides montrent également divers effets néfastes sur de nombreux processus physiologiques essentiels, tels que le développement larvaire, le système immunitaire, l'activité de butinage, ou encore la cognition.

Effets sublétaux des insecticides sur les abeilles : exemple de la cognition

Le terme de cognition regroupe l'ensemble des processus neuronaux impliqués dans la mémoire, la perception, le traitement et l'interprétation de l'information, l'acquisition ainsi que la résolution des problèmes. Chez les insectes sociaux, comme l'abeille domestique, la cognition s'avère ainsi indispensable et joue un rôle fondamental pour la cohésion sociale de la colonie. Celle-ci peut en revanche être perturbée par interaction directe avec des molécules chimiques capables de reconnaître les récepteurs neuronaux, les canaux ioniques ou les voies de signalisation cellulaire, ou encore par modification du métabolisme neuronal impliqué dans ce phénomène (Belzunces et al., 2012). Chez les insectes, au niveau des aires du cerveau associées aux processus visuels et olfactifs, à l'apprentissage et à la mémoire, sont exprimés les récepteurs nicotiques à l'ACh (cibles des néonicotinoïdes) et les récepteurs au GABA (cibles des phénylpyrazoles) (Gauthier, 2010).

En conditions expérimentales, les abeilles peuvent être amenées à différencier divers stimuli tactiles ou olfactifs. Le test du réflexe d'extension du proboscis (proboscis extension reflex, PER) permet d'évaluer l'apprentissage et la mémoire chez les insectes sociaux notamment. Les abeilles sont alors amenées à recevoir un stimulus de conditionnement (CS, conditioned stimulus en anglais) au niveau des antennes, immédiatement suivi d'une stimulation appétissante (souvent du sucrose) comme récompense (US, unconditioned stimulus en anglais) afin de provoquer la réponse réflexe d'extension du proboscis (Amaya-Márquez et al., 2019; Frost et al., 2012). Suite à cette phase de conditionnement CS-US, et si l'apprentissage associatif n'est pas entravé, l'application du CS lors de la phase de test engendre alors l'apparition du PER, même en absence de sucrose. Ce test de capacité à enregistrer et retrouver l'association CS-US chez les insectes, après un certain intervalle de temps, permet d'évaluer l'impact de composés insecticides sur les capacités d'apprentissage et d'intégration d'abeille domestique. Pour le composé phénylpyrazole fipronil, il a notamment été montré qu'une exposition tactile aiguë non-mortelle chez les abeilles (1 ng/abeille) réduisait significativement la capacité des abeilles à induire le PER après présentation du CS (El Hassani et al., 2005). L'application d'une dose plus faible (0,5 ng/abeille) engendre également des perturbations significatives sur l'apprentissage et la mémoire chez ces insectes (Bernadou et al., 2009; El Hassani et al., 2005). En revanche, si le composé insecticide est administré par voie orale, la réponse est alors plus ambiguë : certaines études montrent une absence d'effet de cet insecticide (El Hassani et al., 2005), tandis que d'autres, présentant des expositions

prolongées (>10 jours), mettent en évidence une perturbation de la spécificité de la réponse olfactive (Aliouane et al., 2009). Concernant le composé imidaclopride (famille des néonicotinoïdes), des effets sublétaux peuvent également apparaître chez les abeilles suite à une exposition chronique à une nourriture contaminée par cet insecticide (12 à 96 µg/kg). La mémoire étant ainsi significativement altérée (Decourtye et al., 2003).

Doses (sub)létales et mortalité des abeilles

La distinction existant entre les doses létales et sublétales sur la mortalité des abeilles est particulièrement fine : une dose sublétale est relative à une durée et n'entraîne pas de mortalité chez les individus testés. La mesure de cette mortalité en présence de doses létales s'effectue à 24 ou 48 heures, et rarement au-delà. Or, des doses de composés dites sublétales à 48 heures peuvent alors devenir létales à 72 heures, 96 heures, voire plus, par exemple. Des études ont montré qu'une exposition de plus de 10 jours à des concentrations de fipronil comprises entre 2,2 µg/L et 9 µg/L de sucrose augmente la mortalité des abeilles par rapport aux individus non exposés, et ce de façon significative (Decourtye et al., 2005). Une autre étude encore rapporte une mortalité de 100% des abeilles, en seulement 7 jours, suite à une exposition chronique au fipronil, à une dose de 0,1 ng/abeille (Aliouane et al., 2009), dose décrite comme sublétale suivant les critères toxicologiques habituels (absence de mortalité à 24 heures). Il est également intéressant de noter que des doses insecticides considérées comme sublétales peuvent engendrer une mortalité des abeilles par effet synergique avec plusieurs autres composés (Colin and Belzunces, 1992). Ce potentiel impact négatif dû aux faibles doses de composés insecticides en combinaison avec d'autres molécules, ou par exposition prolongée, doit ainsi être pris en compte lors des divers tests dans la recherche de nouvelles molécules insecticides.

Ces données mettent en évidence les nombreux facteurs desquels dépend le degré de sensibilité des abeilles aux insecticides, parmi lesquels la dose testée (Schneider et al., 2012), la voie d'administration (Aliouane et al., 2009), ou encore le nombre de molécules considérées (Colin and Belzunces, 1992).

Résistance aux insecticides

Selon l'IRAC (pour Insecticide Resistance Action Committee, en anglais), qui permet de classer les composés insecticides en fonction du mode d'action des substances actives (Figure 12), la

résistance aux insecticides peut être définie comme « une modification héréditaire dans la sensibilité d'une population d'organismes nuisibles, se traduisant par l'échec répété d'un produit pour atteindre le niveau escompté de contrôle, lorsque le produit est utilisé conformément aux recommandations requises pour cette espèce nuisible ».

Au niveau du système nerveux des insectes, la grande majorité des produits phytosanitaires, et en particulier les insecticides, agissent sur l'une des cinq cibles principales : les canaux sodiques dépendants du voltage, les récepteurs au glutamate, les récepteurs de l'acide γ -amino-butyrique (GABAR), les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR) et des acétylcholinestérases (Casida, 2009). Ainsi, l'utilisation répétée de ces produits a entraîné le développement d'une résistance à un certain nombre de familles de composés insecticides (Brogdon and McAllister, 1998; Feyereisen, 1995). La résistance progresse lorsque la variation génétique survenant naturellement permet à une faible proportion de la population de résister et de survivre aux effets de ce composé insecticide. Dans la plupart des cas, il s'agit de mutations ponctuelles localisées au niveau du/des site(s) de fixation des molécules insecticides. Parmi les principaux facteurs ayant une influence sur le développement de la résistance peuvent être cités la fréquence d'application, la dose ou encore la pérennité de l'effet. Ces phénomènes de résistance peuvent ainsi survenir de diverses manières parmi lesquelles, la diminution de la sensibilité de la cible ou de la biodisponibilité du composé insecticide (Brogdon and McAllister, 1998; Feyereisen, 1995). De façon dramatique, cette résistance s'est développée chez presque toutes les espèces d'insectes (Georghiou, 1994). De plus, des études démontrent la probabilité que l'augmentation du nombre d'insectes résistants aux traitements insecticides influe de manière critique sur la pénétration de ces composés dans l'environnement (Krogstad, 1996). Ces problèmes mettent ainsi en évidence le besoin d'identifier de nouveaux composés insecticides sélectifs, de valider de nouvelles cibles, et/ou de développer de nouvelles méthodes de lutte efficace contre les insectes ravageurs. Afin de diminuer, voire enrayer, ces phénomènes de multi-résistance, il apparaît en effet nécessaire de découvrir de nouveaux composés insecticides capables à la fois de différencier les sites de liaison conservés entre insectes et mammifères, de cibler les structures retrouvées uniquement chez les insectes ou encore de proposer une spécificité d'action envers les insectes cibles.

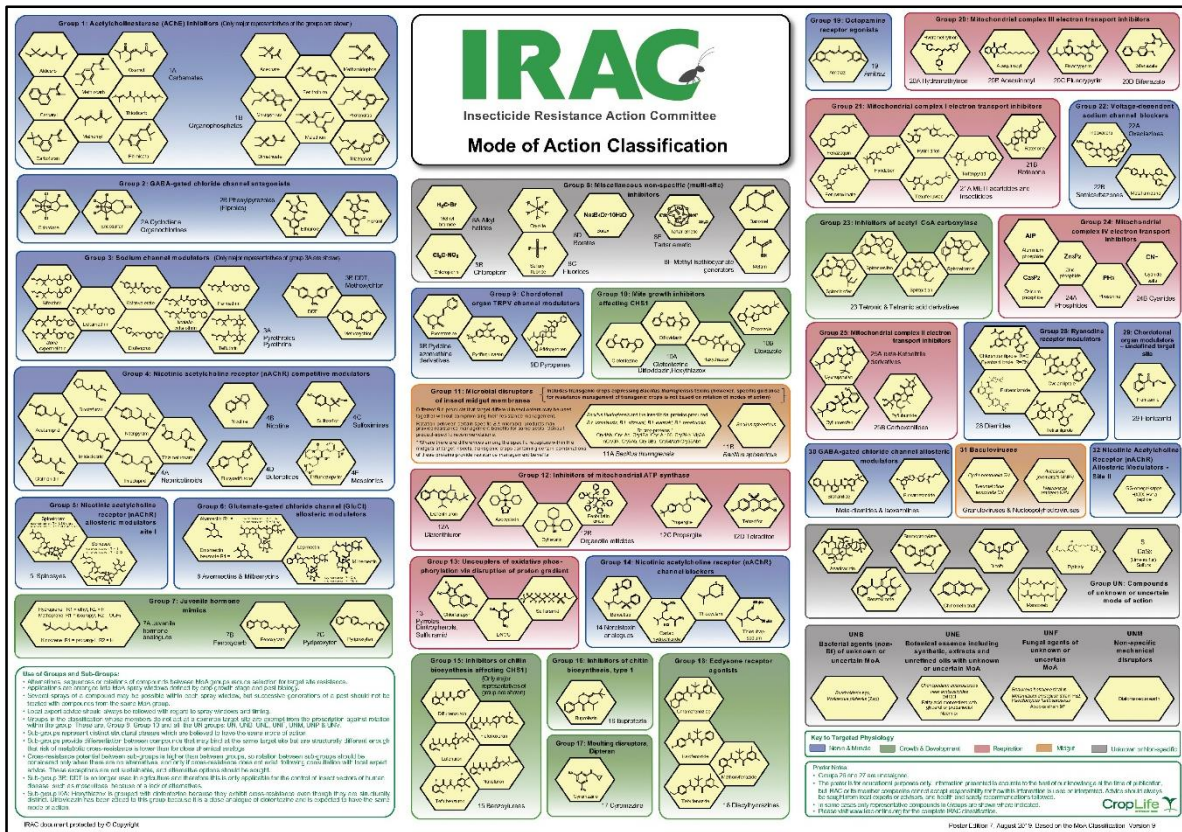


Figure 12 : Classification des modes d'action des différents groupes de composés insecticides connus sur la base des fonctions physiologiques touchées.

Document IRAC.

3. Recherche de nouvelles molécules

Afin de comprendre la faible sélectivité des composés insecticides chimiques actuellement sur le marché, de nombreuses études cherchent à mettre en évidence les effets de ces composés sur diverses cibles potentielles chez différentes espèces, insectes ou mammifères. Les canaux ioniques constituant les principales cibles des insecticides neurotoxiques, l'analyse électrophysiologique de leur activité ainsi que de leur modulation est donc un outil essentiel dans cette recherche. De manière surprenante, les différents sous-types de canaux ioniques impliqués dans la sensibilité des abeilles à la plupart des insecticides étaient encore inconnus il y a quelques années (Kadala et al., 2014). En effet, ni les gènes des différentes sous-unités constituant ces canaux (hétéromères associants des sous-unités constitutives et régulatrices), ni leur combinaison exacte dans différents tissus et à différents stades

(embryon, larve, adulte), ni même leurs propriétés biophysiques *in-vitro*, n'avaient alors été étudiés. La pharmacologie de chacun de ces gènes n'était alors pas documentée alors que les enregistrements sur neurones ou cellules musculaires avaient déjà fourni quelques informations sur les courants résultants *in-vivo*.

Depuis plusieurs années, la recherche de nouvelles molécules, qui soient plus sélectives des insectes ravageurs s'est développée (Nauen and Bretschneider, 2002). Les bioinsecticides, ou insecticides biologiques, comprennent plusieurs types de méthode de lutte contre les ravageurs et maladies, faisant appel à des relations de prédation, de parasitisme ou d'action chimique. Ceux-ci représentent une alternative aux insecticides chimiques classiques mise en avant depuis plusieurs années, notamment de par leur activité plus efficace, mais également plus respectueuse de l'environnement et la santé humaine (Nauen and Bretschneider, 2002). Ces insecticides d'origine naturelle pourraient ainsi permettre d'augmenter l'efficacité des projets de lutte antiparasitaire actuels (Soesanto, 2012). En 2006, les bioinsecticides représentent environ 2,5% du marché mondial des insecticides (Thakore, 2006) mais les produits de synthèse restent majoritaires, avec la part de marché la plus élevée. Les sources potentielles de nouvelles molécules bioinsecticides sont pourtant nombreuses : microbes (viraux, bactériens), nématodes, produits dérivés des plantes, ou phéromones d'insectes. Les toxines peptidiques, composés naturels dérivés d'insectes prédateurs et parasites, suscitent une attention particulière pour le développement de nouveaux composés bioinsecticides. Les venins d'araignées par exemple, contiennent une large gamme de peptides et neurotoxiques puissante, rendant ceux-ci particulièrement intéressants. Ces peptides peuvent être aisément isolés par purification et séparation (par HPLC), identifiés (par spectrométrie de masse), puis caractérisés par des techniques d'électrophysiologie. De cette manière, il est alors possible de caractériser les effets de ces toxines peptidiques en testant directement leur activité sur les canaux ioniques de différentes espèces d'insectes par simple injection de leurs ARNm au sein de cellules hôtes (expression hétérologue). Cela permet notamment de mettre en évidence la sélectivité de certaines toxines pour certains types de canaux ou récepteurs, et mettre en exergue leur potentialité pour la conception de nouveaux insecticides plus sélectifs.

c. Canaux Ioniques

Pour qu'un organisme puisse réagir aux changements de son environnement (soleil, température, humidité, floraison, prédateurs...), celui-ci doit pouvoir percevoir ces perturbations, de manière rapide de préférence, afin d'y apporter une réponse adéquate (ventilation, butinage, fuite...). Cette transmission immédiate des informations sensorielles et musculaires est assurée par un "câblage" neuronal de l'organisme permettant un transport des informations sous forme de signaux électriques (dépolarisation des membranes cellulaires) avec une vitesse de propagation de quelques mètres par seconde. La genèse et la propagation du signal électrique sont permises grâce aux cellules dites excitables, telles que les neurones ou les cellules musculaires ou sensorielles. Dès le début du XIX^{ème} siècle, les premiers travaux électrophysiologiques permettent de déterminer le rôle des différents ions dans l'excitabilité neuronale et musculaire (Hodgkin and Huxley, 1952; Hodgkin and Katz, 1949).

Le potentiel de repos membranaire

La perméabilité des différents ions et leur concentration de part et d'autre de la membrane détermine le potentiel de repos de la cellule, dont dépend son excitabilité. Le milieu extracellulaire est ainsi essentiellement riche en ions Na^+ , Ca^{2+} et Cl^- , tandis qu'au niveau intracellulaire seront plutôt trouvés des ions K^+ ainsi que des anions (acides aminés et protéines). Cette répartition des charges entre les deux milieux permet notamment une électro-neutralité des solutions, assurant un pH adapté, au sein de la cellule. Au niveau des membranes, les divers types de canaux ioniques retrouvés sont classifiés en fonction du mécanisme d'activation, et sont répartis en plusieurs familles : les canaux activés par le voltage, par des ligands, par des stimuli mécaniques, par des stimuli thermiques. La classe des canaux ioniques activés par le voltage se différencie ainsi de celle des canaux activés par un ligand (neurotransmetteur ou second messenger) (Harmar et al., 2009), appelés alors récepteurs membranaires ionotropiques (s'opposant aux récepteurs métabotropes ne possédant pas de canal ionique). Brièvement, la classe des canaux transmembranaires sensibles au voltage est présente au niveau de nombreux types cellulaires (neuronaux et musculaires principalement) et est activée par des modifications de différence de potentiel électrique à proximité du canal. Ceux-ci permettent entre autre la genèse et la progression

des signaux électriques (Harmar et al., 2009), et sont divisés en sous-groupes, fonction de leur sélectivité pour un type d'ion : les canaux sodiques (Na_V), calciques (Ca_V) et potassiques (K_V). Sont également retrouvés les canaux HCN (*Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotide modulated Cation Non-selective Channel*, en anglais), activés lors d'une hyperpolarisation de la membrane. La famille des canaux ioniques activés par un ligand comprend divers canaux situés au niveau synaptique, et sont habituellement sélectifs pour un ou plusieurs ions (Harmar et al., 2009). Ces canaux sont ainsi répartis en trois sous-groupes, fonction de leur affinité pour un ligand donné : les récepteurs-canaux à boucle cystéine dits « cys-loop » (GABA, Glycine, Sérotonine...), les récepteurs au glutamate (AMPA, Kainate, NMDA...) et enfin les récepteurs sensibles à l'ATP (P2X). D'autres acteurs membranaires participent également à cette répartition des charges ioniques en créant des gradients de concentrations de part et d'autre de la membrane. La pompe sodium-potassium ($\text{Na}^+\text{-K}^+$) par exemple, permet de réguler les concentrations intracellulaires de ces deux ions dans un rapport précis (trois Na^+ pour deux K^+), par un transport dit « actif » car consommant de l'énergie (ATP) (Xie et al., 2013). Dans la majorité des neurones, un transport de Cl^- de type « passif » (ne nécessitant pas d'énergie) via le gradient électrochimique est également retrouvé (Hodgkin and Huxley, 1952; Hodgkin and Katz, 1949; Kandel and Squire, 2000). Ce gradient (ou driving force) correspond à la « somme » des gradients de concentration et électrique. La perméabilité de la membrane au repos est essentiellement régie par la perméabilité aux ions K^+ , mais l'implication d'autres canaux (cationiques « de fuite » non-sélectifs), dont le potentiel d'équilibre est supérieur au potentiel de membrane, permet de fixer le potentiel de repos autour de -70 mV (-60 ou -80 mV selon les cellules) (Hodgkin and Katz, 1949; Keynes, 1963). Le potentiel de membrane créé par le K^+ induit une forte augmentation du gradient électrochimique de l'ion Na^+ . Le potentiel de repos correspond alors à l'équilibre dynamique atteint entre ces deux ions. Ce flux d'ions à travers la membrane est ainsi déterminé par deux forces : la force de conduction électrique (dépendante de la différence de potentiel) et la force de conduction chimique (dépendante du gradient de concentration) (Hodgkin and Huxley, 1952; Hodgkin and Katz, 1949). La fuite ionique passive (Cl^- notamment), contrebalancée par les divers transports « actifs » (tel que les transporteurs secondaires au chlore, NKCC1 et KKCC2), permet alors de maintenir la polarité de la membrane. Le potentiel de repos de la membrane est ainsi en partie déterminé par la proportion de pompes et canaux ioniques à la surface de celle-ci. Une dépolarisation par activation d'un récepteur ionotrope par

exemple déclenche l'activation d'une cascade de canaux ioniques permettant la genèse du potentiel d'action (PA). Depuis longtemps, de nombreuses recherches ont été initiées sur l'origine des potentiels électriques suite à la mise en évidence de la relation entre le potentiel électrique et la diffusion de ces ions en solution (Nernst, 1889). Rapidement, l'implication de la membrane des cellules comme élément essentiel dans ce phénomène d'excitabilité a été mis en avant, notamment suite aux travaux de Bernstein. Ceux-ci montrent que les membranes des cellules excitables seraient sélectivement perméables à l'ion K^+ , lorsque celles-ci sont au repos (Bernstein, 1902). Il aura en revanche fallu attendre plusieurs années, notamment avec les débuts de l'électrophysiologie en potentiel imposé (années 1950 par Hodgkin et Huxley), pour mettre en évidence les propriétés de perméabilité membranaire, et la description de la propagation de l'influx nerveux (Hodgkin and Huxley, 1952). Les protéines présentes au niveau des membranes vont ainsi recevoir l'information, et différencier celle-ci en signal électrique justifiant sa propagation rapide le long des neurones (sensoriels ou moteurs).

Potentiel d'action

Historiquement, le potentiel d'action (autrefois nommé influx nerveux) fut décrit pour la première fois en 1952 par étude de l'axone de calmar géant, en utilisant la technique de potentiel imposé. Ces études ont également révélé l'action des canaux de type sodiques et potassiques comme composante principale du potentiel d'action (Hille, 2001; Hodgkin and Huxley, 1952). Ces recherches ont été basées sur des données antérieures mettant en évidence que le potentiel d'action est dû à une entrée de sodium, et que le pic de ce potentiel est déterminé par le potentiel d'équilibre du sodium. Suite à l'activation des canaux sodiques et potassiques, la genèse du potentiel d'action (signal électrique unidirectionnel parcouru le long des neurones) est permise par le passage d'ions engendrant une modification du potentiel de repos de la membrane de la cellule nommée dépolarisation. Celle-ci, pouvant varier en fréquence, est suivie d'une repolarisation ainsi que d'une période réfractaire, déterminant le PA. En fonction du type cellulaire, de l'intensité ainsi que de la nature du stimulus, la réponse en potentiel d'action varie en nombre et en fréquence. L'amplitude et la durée du PA dépendent en effet du tissu et de l'espèce considérés, mais sont, tout comme le potentiel de repos, constantes pour un type cellulaire chez une espèce donnée. Des potentiels d'action de type neuronaux, musculaires ou encore cardiaques impliquant différents canaux

ioniques peuvent être ainsi retrouvés. Le PA s'active selon la loi du tout-ou-rien : soit la stimulation électrique perçue est trop faible et le PA ne se déclenche pas, soit l'intensité de stimulation est suffisante pour atteindre le seuil critique, déclenchant des PA (immédiatement maximaux) dits individuels. Des "bouffées" de PA, pouvant varier en fréquence ou en durée, sont également déclenchées. Ces potentiels d'action engendrent l'activation des canaux de type calcique, provoquant la libération de neurotransmetteurs au niveau de la fente synaptique et la propagation de ces PA d'un neurone à l'autre. Ces différents canaux ioniques (N_{av} , C_{av} et K_v) sont dits dépendants du voltage car sensibles aux variations du potentiel électrique, et s'ouvrent et se ferment selon le potentiel de membrane.

Le potentiel d'action peut ainsi être divisé en plusieurs phases, selon l'état l'ouverture et fermeture de ces canaux (Figure 13). A l'état de repos, les canaux potassiques dépendants du voltage (K_v) sont fermés et la perméabilité au sodium (Na^+) est particulièrement faible. Seuls les canaux K^+ dits « de fond » participent au maintien du potentiel de repos de la membrane. Lors d'une première phase de dépolarisation de la membrane (transitoire et locale), les canaux sodiques (N_{av}) s'ouvrent, libérant ainsi un nombre important d'ions Na^+ dans le milieu intracellulaire, se traduisant par une brusque inversion du potentiel, passant de valeurs négatives à positives (de -60 mV à +40 mV, en moyenne). Les canaux calciques dépendants du voltage s'activent également durant cette phase de dépolarisation. En fonction du potentiel de membrane, deux types de canaux peuvent être différenciés : à « haut seuil » (canaux HVA, pour *High Voltage Activated* en anglais) ou à « bas seuil » d'activation (canaux LVA, pour *Low Voltage Activated* en anglais), activés respectivement par de fortes et faibles dépolarisations de la membrane. Parmi les canaux LVA, l'ouverture des canaux calciques de type T induit une dépolarisation prolongée de la membrane. Cette forte dépolarisation de la membrane finit par inactiver alors les canaux N_{av} de façon rapide (potentiel d'équilibre du Na^+ atteint) mais induit l'ouverture des canaux K_v . La non-fermeture de ces canaux a alors pour effet d'augmenter la perméabilité au potassium. Les ions K^+ , en nombre plus important à l'intérieur qu'à l'extérieur, quittent la cellule et permettent au potentiel de membrane de revenir à sa valeur initiale (état de repos). On parle ici de la phase de repolarisation de la membrane. S'ensuit un phénomène d'hyperpolarisation membranaire de très faible amplitude : les canaux K_v n'étant pas immédiatement désactivés lors du retour au potentiel de repos, les ions K^+ continuent à migrer massivement vers l'extérieur de la cellule. Le potentiel de membrane diminue alors jusqu'à la valeur d'équilibre du potassium (environ -80 mV). A moindre mesure,

l'ouverture concomitante des canaux Cl^- a pour effet d'augmenter la charge négative intracellulaire. Durant cette courte période dite période réfractaire, il y a absence d'excitabilité et aucun potentiel d'action ne peut être induit. Celle-ci peut notamment être expliquée par la désensibilisation des canaux Na_v , et représenterait la cause de l'unidirectionnalité du potentiel d'action. Le retour au potentiel de repos est facilité par l'inactivation progressive des canaux K^+ et par l'activation de canaux cationiques ouverts à ces potentiels négatifs (canaux HCN, canaux Cl^- , etc), et dont le potentiel d'inversion est plus positif (-30 à 0 mV). Ces canaux permettent de conduire du Na^+ , et s'ouvrent au potentiel de repos de la membrane (Robinson and Siegelbaum, 2003). En revanche, ceux-ci ne sont pas exprimés chez certains organismes, tels que le ver nématode *C. elegans*. Mais le retour au potentiel de repos ne signifie pas que les conditions initiales sont restaurées : cela dépend en grande partie de la pompe Na^+-K^+ dépendante de l'ATP, faisant entrer activement le potassium et sortir l'excédent de sodium ($3 \text{ Na}^+/2 \text{ K}^+$) afin de restaurer les conditions initiales.

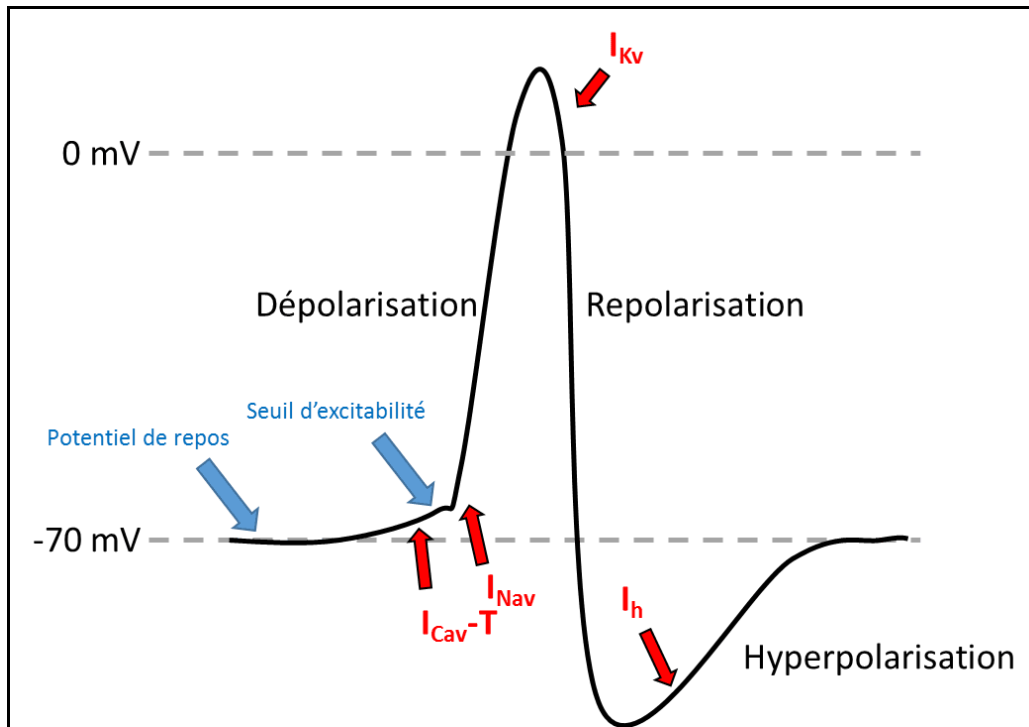


Figure 13 : Illustrations des différentes phases d'un potentiel d'action de type neuronal et principales conductances ioniques impliquées. Les canaux calciques dits à « bas seuil » d'activation (type T), s'ouvrent à des potentiels hyperpolarisés (à partir de - 50 mV) lors d'une dépolarisation. Cette activation permet d'atteindre le seuil d'excitabilité des canaux sodiques dépendants du voltage (I_{Nav}) facilitant l'entrée de sodium. Le courant sodique entrant va dépolariser la cellule au-delà de 0 mV, activant les canaux potassiques dépendants du voltage (I_{Kv}) dits à « haut seuil » d'activation. Suite à l'inactivation rapide des canaux sodiques, l'activation des canaux potassiques induit alors une sortie du potassium et permet la repolarisation de la membrane.

Canalopathies

Chez l'Homme, de nombreuses maladies sont associées à des dysfonctionnements génétiques ou acquis de ces canaux ioniques. L'intérêt tout particulier porté à l'étude de ces canaux provient notamment du fait que ces protéines membranaires représentent la seconde cible la plus visée par les médicaments, après les protéines couplées aux protéines G (Overington et al., 2006).

Chez les insectes, ces protéines canal sont la première cible visée par les composés insecticides ainsi que les toxines naturelles. Considérant que le génome de l'abeille domestique *Apis mellifera* a été publié il y a plus de 10 ans (Weinstock et al., 2006) et que ces insectes sociaux sont utilisés dans la recherche en neuroscience comme modèles de compréhension de la cognition, y compris la mémoire et l'apprentissage (Hammer and Menzel, 1995; Menzel, 2012), il est étonnant que l'on en connaisse si peu sur les bases moléculaires à l'origine de la

neurobiologie complexe de cet insecte pollinisateur. En effet, encore peu de travaux portent sur les canaux ioniques d'insectes, et beaucoup de données sur les canaux et récepteurs d'abeille domestique manquent encore. Il aura en effet fallu attendre le séquençage du génome de l'espèce *Apis mellifera* afin de pouvoir déterminer, notamment par comparaison avec d'autres séquences d'insectes connues (comme pour la mouche *Drosophila melanogaster*), les canaux et récepteurs potentiellement présents au niveau de sa neurobiologie. L'expression particulièrement difficile des canaux ioniques d'insectes dans des systèmes recombinants en est sans doute une des causes principales. La récente caractérisation des premiers canaux calciques et sodiques d'abeilles *Apis mellifera* (Figure 14) par l'équipe du Dr P. Charnet (IBMM, Montpellier), apparaît comme un pas en avant significatif, pour la recherche fondamentale comme en recherche appliquée, offrant notamment de nouvelles possibilités pour évaluer les risques que représentent les insecticides et pesticides pour les abeilles domestiques mais également pour les autres types d'insectes (Cens et al., 2013, 2015; Gosselin-Badaroudine et al., 2015).

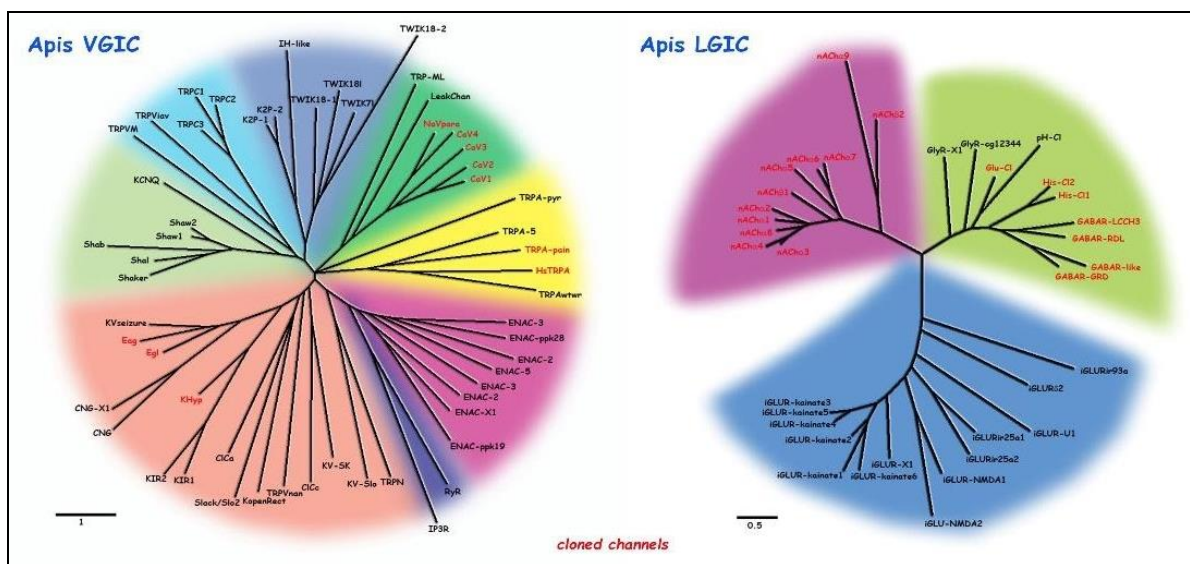


Figure 14 : Dendrogramme représentant l'ensemble des canaux ioniques dépendants du voltage (VGIC) et récepteurs membranaires dépendants d'un ligand (LGIC), cloné chez l'abeille domestiques *Apis mellifera*. (Equipe Charnet, IBMM, Montpellier).

Les canaux ioniques chez l'abeille

Chez les abeilles comme chez les mammifères, les canaux ioniques sont divisés en deux groupes, fonction de leur typologie d'activation (Figure 14). La famille des canaux ioniques dépendants du voltage (VGIC) comprend divers types de canaux sélectivement perméables à un ion donné. Parmi ceux-ci, le canal sodique (Na_v), le canal potassique (K_v), le canal calcique (Ca_v) et le canal chlorure, montrent un rôle essentiel au niveau de la cellule en participant au maintien de la physiologie de la cellule par le transport des ions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Cl^- , respectivement. Ceux-ci vont s'activer lors de toute modification de la polarité de la membrane, à des potentiels donnés. Ces différents types de canaux présentent quelques différences topologiques, en plus de leur divergence pharmacologique. [Ici seront décrit uniquement les canaux de type calcique, sodique, et potassique (de façon brève)]. La famille des canaux ioniques dépendants d'un ligand (LGIC), appelés aussi récepteurs ionotropiques, regroupe divers canaux dont l'activation est permise par liaison d'un neurotransmetteur ou second messenger. Parmi ceux-ci, le GABA via le récepteur au GABA (GABAR), l'ACh par le récepteur à l'ACh (nAChR) ou encore le glutamate par le récepteur au glutamate (iGluR) représentent les ligands les plus abondants du système nerveux de l'abeille, et permettent, par liaison, l'activation du récepteur adéquat. [Dans ce manuscrit, ne seront traités que les nAChR et le GABAR].

- **Canaux ioniques activés par le voltage**

i. Canaux Sodiques

Les canaux sodiques dépendants du voltage (canaux Na_v) représentent un déterminant moléculaire de l'excitabilité par leur action indispensable dans la genèse et la propagation du potentiel d'action, et sont présents au niveau de la plupart des cellules excitables (Catterall, 2000; Hille, 2001). Ceux-ci sont également retrouvés faiblement exprimés au niveau de cellules non-excitables où leur rôle est encore peu défini (Black and Waxman, 2013). Les premiers courants sodiques ont été enregistrés par Hodgkin et Huxley, utilisant la technique de potentiel imposé (Hodgkin and Huxley, 1952). Ces études ont notamment permis à l'époque de mettre en évidence trois caractéristiques clefs qui singularisent aujourd'hui le

canal sodique : (1) l'activation dépendante du voltage, (2) l'inactivation rapide, et (3) la conductance sélective pour les ions sodium (Na^+) (Hodgkin and Huxley, 1952). Durant les années 1960 et 1970, des analyses biophysiques plus détaillées ont permis de déterminer divers modèles mécanistiques pour rendre compte du fonctionnement des canaux sodiques. Afin d'arriver à ces résultats, la méthode dite du voltage imposé (ou « voltage-clamp ») appliquée aux axones géants des invertébrés mais également aux fibres nerveuses myélinisées des vertébrés avait été mise au point (Armstrong, 1981; Goniou et al., 1984). A l'époque, ces diverses études fonctionnelles avaient pu prédire le caractère ardu de l'analyse biochimiques des canaux sodiques, tant dans la rareté de ces protéines membranaires que dans la difficulté à identifier et isoler ces canaux des autres protéines de membranes excitables.

Les canaux sodiques dépendants du voltage sont maintenant, et ce depuis de nombreuses années, particulièrement étudiés chez les mammifères (Catterall, 2000, 2012; Catterall et al., 2005). Cependant, peu de recherches ont été entreprises chez les insectes, en particulier les pollinisateurs. Pourtant, les insectes représentent le groupe animal le plus important et le plus diversifié avec 2,8 à 10 millions d'espèces (Ødegaard, 2000; Windley et al., 2012). Les facilités de séquençage d'organismes entiers ont permis notamment de déterminer les séquences de nombreux canaux sodiques de différents insectes, et montrent une importante homologie de séquence et de structure entre ces canaux et ceux de mammifères (Gosselin-Badaroudine et al., 2015; Raymond-Delpech et al., 2005; Shen et al., 2018).

Structure générale

Les canaux sodiques dépendants du voltage présentent la même structure générale que les canaux calciques dépendants du voltage (voir chapitre ii. Canaux calciques). Ceux-ci sont des glycoprotéines hétéromultimériques transmembranaires constituées d'une sous-unité principale α formant le pore (~220–260 kDa) (Figure 15). Celle-ci est constituée de 4 domaines homologues (DI – DIV) reliés entre eux par trois boucles cytoplasmiques appelées « linker » (L1, L2 et L3). Chaque domaine est constitué de 6 segments transmembranaires organisés en hélice α (S1-S6), et possède ses extrémités N et C-terminales du côté intracellulaire. L'organisation structurale des domaines induit la formation de boucles ré-entrantées appelées boucles P, entre les segments S5 et S6 de chaque domaine, qui participent à la formation du pore. En se réinsérant dans la membrane, ces boucles forment la partie extracellulaire du canal et correspondent également au site de liaison aux cations et toxines. Les segments S6

de chaque domaine participent, quant à eux, à la formation de la partie intracellulaire du canal. Les segments S4, riches en résidus lysine et arginine (retrouvés tous les trois acides-aminés) portant les charges positives, jouent le rôle de senseur de voltage, et sont à l'origine de l'ouverture du canal. Lors de l'activation du canal par dépolarisation, ces derniers se déplacent, sous l'influence des charges positives, vers le compartiment extracellulaire provoquant ainsi l'ouverture du pore (Catterall, 2000, 2010). Il est à noter que cette activation de nature particulièrement rapide (de l'ordre de la milliseconde) est caractéristique des canaux sodiques. Enfin, la boucle intracellulaire située entre les domaines homologues III et IV (linker 3) permet l'inactivation rapide du canal en se repliant à l'intérieur du pore, et en obstruant celui-ci pendant les dépolarisations membranaires soutenues. La seconde forme d'inactivation, de nature plus lente, observée sur les canaux sodiques dépendants du voltage serait quant à elle due au resserrement du pore du canal (Payandeh et al., 2012). Enfin, la spécificité ainsi que la sélectivité ionique des canaux sodiques dépendants du voltage sont définies par deux clusters d'acides aminés délimitant le pore de conduction ionique. L'un de ces deux clusters est défini par une succession D-E-K-A, représentant le seul cluster conservé entre mammifères et insectes connu à ce jour. Ces résidus délimitent ainsi le filtre de sélectivité du canal, situé à des positions similaires au sein des domaines I, II, III et IV, respectivement, de la sous-unité α .

La plupart des informations obtenues sur les canaux sodiques dépendants du voltage est issue d'études sur des sous-unités de canaux sodiques de mammifères, avec lesquelles les canaux sodiques d'insectes partagent des niveaux élevés de similarité de séquence et de fonctionnalité.

Mammifères

Chez les mammifères, 9 gènes codent pour la sous-unité α du canal sodique allant de SCN1A à SCN5A et SCN8A à SCN11A. Ceux-ci ont été clonés il y a quelques années dans les divers tissus et étiquetés $Na_v1.1$ à $Na_v1.9$ (Catterall et al., 2005; Goldin et al., 2000). Ces différentes isoformes jouent un rôle crucial en permettant le flux d'ions Na^+ à travers la membrane des cellules excitables, et ce en fonction de l'état d'excitabilité membranaire. Chez la souris et l'Homme, une dernière isoforme est rattachée à cette famille de canaux, appelée Na_x , codée par le gène SCN6A et le gène SCN7A, respectivement (Goldin et al., 2000). Certaines études émettent l'hypothèse que ce canal Na_x jouerait un rôle de senseur de sodium au niveau de

l'organisme, mais son rôle est encore mal compris à l'heure actuelle. En revanche, il a été montré que ce canal était étroitement lié aux canaux sodiques dépendants du voltage en partageant 50% d'identité avec la sous-famille Nav1 (Catterall et al., 2006). Ces diverses isoformes du canal sodique sont alors réparties en deux groupes en fonction de leur sensibilité à la tétrodotoxine (TTX) : les sous-unités Nav1.5, Nav1.8 et Nav1.9 sont dites résistantes à la TTX ($IC_{50} = 40$ à $60 \mu M$) et présentent environ 64% d'homologie de séquence avec les autres sous-unités, Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6 et Nav1.7 sensibles à cette toxine ($IC_{50} = 4$ à 25 nM) (Catterall, 2000; Catterall et al., 2006; Shen et al., 2018). Cette sensibilité à la TTX est définie par la succession d'acides aminés délimitant le pore du canal, entre les segments S5 et S6. Ainsi, deux clusters de résidus D-E-K-A (conservé chez les invertébrés) et E-E-D-D sont retrouvés au niveau de la boucle réentrant au niveau du pore (Catterall, 2000; Gosselin-Badaroudine et al., 2015). Ces deux clusters se différencient l'un l'autre par leur position au niveau du pore : les résidus D-E-K-A se trouvant à l'intérieur de celui-ci, tandis que les acides aminés E-E-D-D sont retrouvés à l'extérieur (un tour d'hélice α plus haut) (Catterall, 2000). Enfin, diverses études ont montré que la toxicité de la TTX (issu du poison de poisson-globe, aussi appelé poisson fugu) était due à la suppression de la genèse du potentiel d'action au travers d'une inhibition spécifique de l'influx Na^+ (Fleisher et al., 1961; Kao, 1966; Ritchie, 1980).

Les différentes sous-unités de canaux sodiques de mammifères s'activent de façon rapide, suite à une faible dépolarisation de la membrane, entraînant alors un mouvement du segment S4 vers l'extérieur amenant à l'ouverture du pore (Catterall, 2000), puis l'inactivation du canal. Des études de mutagenèse, mais aussi d'alignement des séquences, ont notamment permis de mettre en évidence une succession de résidus hydrophobes I-F-M-T, située au niveau de la boucle intracellulaire liant les domaines III et IV. Ces résidus montreraient alors une implication directe dans l'inactivation rapide du canal sodique (Catterall, 2000; Gosselin-Badaroudine et al., 2015; West et al., 1992). Enfin, la boucle intracellulaire retrouvée entre les domaines III et IV, mais aussi I et II, et enfin entre les domaines II et III serait le siège de sites de phosphorylation (Catterall, 2000; Yu and Catterall, 2003) (Figure 15) pouvant potentiellement réguler son activité. Le canal sodique dépendant du voltage est également susceptible de se lier à une ou deux sous-unités auxiliaires β (~33-39 kDa) comprenant quatre isoformes, $\beta 1$ à $\beta 4$ (Isom, 2001). Bien que celles-ci ne soient pas nécessaires à l'activité du canal, ces sous-unités β présentent la capacité à moduler les caractéristiques biophysiques du

canal (activation/inactivation et dépendance au voltage) par co-expression avec la sous-unité α , ainsi que leur disponibilité et leur expression à la membrane (Brackenbury and Isom, 2011; Catterall, 2000). Il est à noter que les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$ se liaient de manière non-covalente à la sous-unité α , contrairement aux sous-unités $\beta 2$ et $\beta 4$ présentant une liaison covalente via un pont disulfure (Chen et al., 2012; Namadurai et al., 2015). La présence de sous-unité(s) β permettrait ainsi de diminuer la vitesse d'inactivation du canal, et de stabiliser celui-ci (Catterall, 2000; Yu and Catterall, 2003).

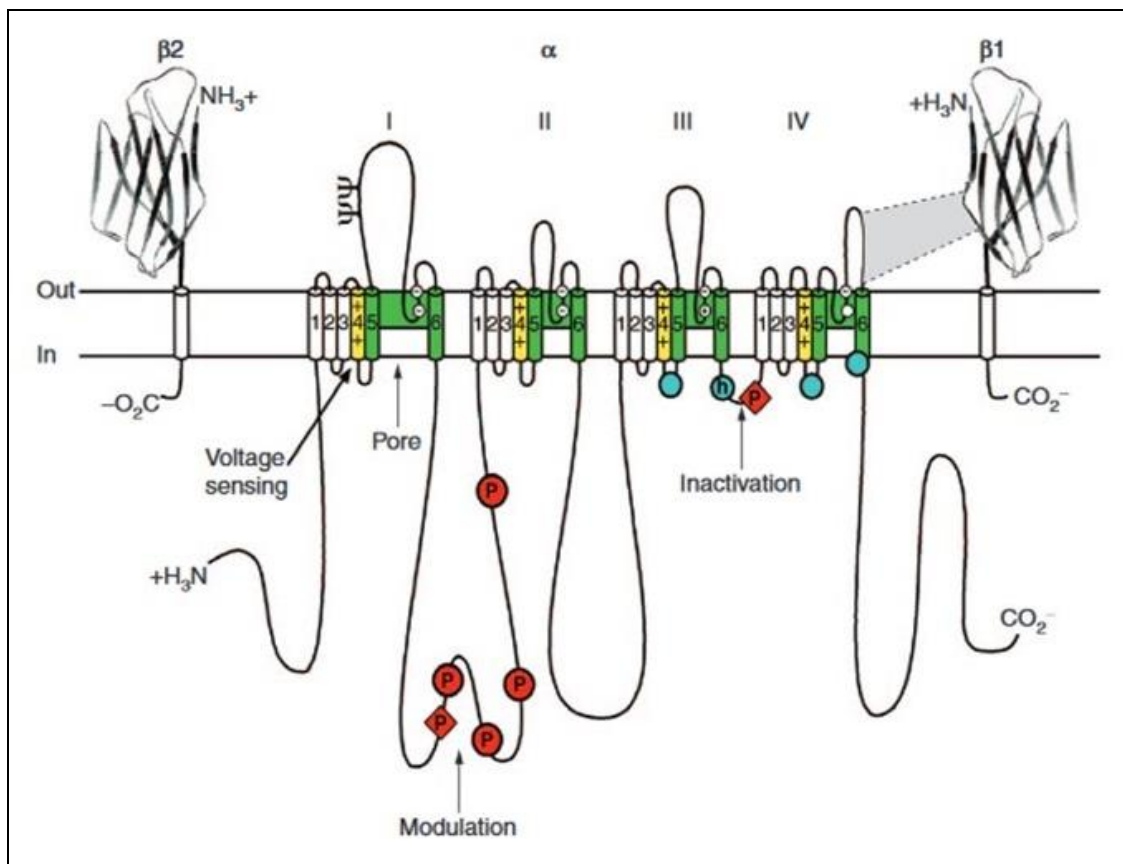


Figure 15 : Structure du canal sodique dépendant du voltage. Représentation schématique des sous-unités du canal sodium. La sous-unité α du canal Na_v est illustrée avec les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$; les domaines extracellulaires des sous-unités sont représentés par des "boucles", qui interagissent avec les boucles des sous-unités, comme indiqué. Les chiffres romains indiquent les domaines de la sous-unité ; les segments S5 et S6 (en vert) forment le pore du canal, tandis que les hélices S4 (en jaune) constituent les senseurs de voltage. Les cercles bleus dans les boucles intracellulaires des domaines III et IV indiquent le motif IFM de la porte d'inactivation et son récepteur (h, porte d'inactivation) ; P, sites de phosphorylation (dans les cercles rouges, les sites de la protéine kinase A ; dans les diamants rouges, les sites de la protéine kinase C). Les cercles dans les boucles rentrantes dans chaque domaine représentent les acides aminés qui forment le filtre de sélectivité des ions (les anneaux extérieurs ont la séquence EEDD et les anneaux intérieurs DEKA). Tiré de (Yu and Catterall, 2003).

La sous-unité α de mammifères présente également divers sites de fixation pour des neurotoxines (six sites de fixation différents) mais un site unique de fixation aux anesthésiques locaux, localisé à l'intérieur de la cavité du pore (Catterall et al., 2006). L'ensemble des neurotoxines et toxines ainsi que les différents sites de fixation au niveau des divers domaines et segments de la sous-unité α sont regroupés dans le Tableau 2 (Catterall et al., 2006).

Receptor Site	Toxin or Drug	Domains
Neurotoxin receptor site 1	Tetrodotoxin	IS2-S6, IIS2-S6
	Saxitoxin	IIS2-S6, IVS2-S6
	μ -Conotoxin	
Neurotoxin receptor site 2	Veratridine	IS6, IVS6
	Batrachotoxin	
	Grayanotoxin	
Neurotoxin receptor site 3	α -Scorpion toxins	IS5-IS6, IVS3-S4
	Sea anemone toxins	IVS5-S6
Neurotoxin receptor site 4	β -Scorpion toxins	IIS1-S2, IIS3-S4
Neurotoxin receptor site 5	Brevetoxins	IS6, IVS5
Neurotoxin receptor site 6	Ciguatoxins	
Local anesthetic receptor site	δ -Conotoxins	IVS3-S4
	Local anesthetic drugs	IS6, IIS6, IVS6
	Antiarrhythmic drugs Antiepileptic drugs	

Tableau 2 : Récapitulatif de l'ensemble des toxines et neurotoxines agissant sur les canaux sodiques dépendants du voltage, ainsi que les sites de fixation au niveau des différents domaines et segments de la sous-unité α . Tiré de (Catterall et al., 2006).

Invertébrés

Chez les invertébrés, 18 gènes codants pour le canal type Nav ont été clonés chez différentes espèces, mais beaucoup n'ont pu être fonctionnellement exprimés (King et al., 2008a; Olson et al., 2008; Ramaswami and Tanouye, 1989). Ainsi, basés sur leur homologie avec les canaux Nav connus, deux gènes ont été fonctionnellement identifiés comme canaux de type sodique (*para* et *DSC1*), d'abord chez la mouche *Drosophila melanogaster* dans les années 1980, puis chez de nombreuses autres espèces d'insectes, incluant l'abeille *Apis mellifera* (Gosselin-Badaroudine et al., 2015; King et al., 2008b; Olson et al., 2008; Ramaswami and Tanouye, 1989). Historiquement, le gène *para* (pour canal sodium paralytique) fut le premier gène de

canal sodique d'insecte à être cloné dans les années 1980 chez *Drosophila melanogaster* (renommé ainsi plus tard DmNav_v1) (Ramaswami and Tanouye, 1989), mais d'autres gènes orthologues ont été également rapidement découverts chez différentes espèces d'invertébrés : MdNav_v1 chez *Musca domestica*, et BgNav_v1 chez *Blattella germanica* (Liu et al., 2001). Plus récemment, l'équipe du Dr Chahine a su mettre en évidence la caractérisation fonctionnelle et la modélisation moléculaire d'un gène orthologue chez l'abeille domestique *Apis mellifera* non-identifié jusqu'alors, AmNav_v1 (Gosselin-Badaroudine et al., 2015). Un second gène, DSC1 (pour *drosophila sodium channel 1*, en anglais), a été mis en évidence également chez la mouche *Drosophila melanogaster*, puis chez la blatte *Blattella germanica* (BSC1) (Dong et al., 2014, 2015; King et al., 2008b; Liu et al., 2001). Ce gène, partageant environ 43 à 53% d'identité de séquence avec le gène *para* (Tableau 5) ainsi qu'une organisation structurale identique, a été prédit en premier lieu pour coder le canal Nav (Littleton and Ganetzky, 2000). Or, des études récentes, notamment chez l'abeille domestique *Apis mellifera*, rapportent que ce gène DSC1 coderait plutôt pour un nouveau canal cationique perméable au calcium (voir chapitre ii. Canal Calcique -invertébrés-), et est aujourd'hui considéré comme un canal de type calcique d'un nouveau type nommé Cav_v4 (Dong et al., 2014, 2015; Gosselin-Badaroudine et al., 2016). Ainsi, le gène *para* fut rapidement considéré comme canal Nav_v1 chez les invertébrés (Gosselin-Badaroudine et al., 2015).

Gène *para*

Ce gène *para* partage une homologie avec les sous-unités α du canal sodique de mammifères, tant par son organisation structurale que par sa séquence en acides aminés (< 50%). En effet, les sous-unités α (mammifères) et *para* sont structurellement identiques. De plus, la succession en acides aminés D-E-K-A, retrouvée pour les canaux sodiques de mammifères (entre les segments S5 et S6), permettant de définir la sélectivité du canal ainsi que la sensibilité à la TTX, se retrouve particulièrement conservée chez les invertébrés (le second groupement d'acides aminés E-E-D-D est substitué par E-E-Q-D) (Gosselin-Badaroudine et al., 2015). Cette conservation en acides aminés permet alors de classer le canal Nav_v de type *para* comme sensible à la TTX. Il a en effet été mis en évidence que la TTX induit une inhibition du courant du canal Nav_v de type *para* de manière dose-dépendante, avec une concentration d'inhibition moyenne (IC₅₀) autour de 0,7 nM (Gosselin-Badaroudine et al., 2015), mettant en évidence le caractère particulièrement affin de ce canal pour la TTX. Tout comme les canaux

Na_v de mammifères, le canal Na_v1 est activé de manière rapide par de faibles dépolarisations de la membrane, et présente également une inactivation rapide à de faibles potentiels. Chez l'abeille *Apis mellifera*, les potentiels de demi-activation et inactivation ont été mesurés à environ -32 mV et -52 mV respectivement (Gosselin-Badaroudine et al., 2015), les cinétiques d'inactivation sont également rapides. En revanche, deux types de sous-unités régulatrices peuvent être retrouvées chez les invertébrés (rôle identique aux sous-unités β de mammifères). Celles-ci permettent notamment d'augmenter le pic du courant ainsi que les taux d'expression du canal à la membrane mais également de moduler son activité, sans pour autant être nécessaire pour l'obtention d'un courant fonctionnel. Ces sous-unités, TipE (pour *Temperature-induced paralysis locus E*, en anglais) d'environ 65 kD, et TEH (pour *TipE Homologue*, en anglais) présentent deux segments transmembranaires, connectés par une large boucle extracellulaire et dont les extrémités N- et C-terminales se retrouvent du côté intracellulaire (Feng et al., 1995; Gosselin-Badaroudine et al., 2015; King et al., 2008b). La protéine TipE permet ainsi d'augmenter l'amplitude du courant Na^+ , causant ainsi une inactivation d'autant plus rapide du canal, modulant alors le transport de celui-ci (Feng et al., 1995; Warmke et al., 1997). Ce gène a en effet été montré d'une forte importance dans le trafic de la sous-unité α du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique des cellules. Cette sous-unité régulatrice TipE a été alors rapidement désigné comme analogue fonctionnel du gène $Na_v\beta$ de mammifères. Le gène homologue à TipE, TEH, présente quatre sous-unités (TEH-1 à TEH-4), chacune structurellement identique à la sous-unité TipE. Comme cette dernière, les sous-unités TEH-1 à 3 permettent d'augmenter l'amplitude du courant Na^+ par co-expression avec la sous-unité α , améliorant ainsi le transport à la membrane. De manière plus spécifique, la sous-unité TEH-1 permet de modifier la dépendance de l'inactivation au potentiel, mais également de ralentir la cinétique de ré-activation, permettant de désigner cette sous-unité comme analogue fonctionnelle de la sous-unité TipE, et de ce fait des sous-unités β de mammifères. Les sous-unités TEH-2 à TEH-4, exprimées au niveau des tissus neuronaux et non-neuronaux, permettent de déplacer la cinétique d'activation du canal vers des potentiels plus polarisés, et sembleraient être impliquées dans la régulation spécifique des courants ioniques Na^+ ainsi que d'autres ions, chez de nombreuses espèces d'insectes (Gosselin-Badaroudine et al., 2015; King et al., 2008b).

Chez l'abeille *Apis mellifera*, il a été montré que ce canal Na_v de type *para* était présent au niveau de l'ensemble des tissus, ainsi que chez la larve, mettant en évidence l'implication de

celui-ci dans les fonctions physiologiques essentielles (Gosselin-Badaroudine et al., 2015). Ces résultats pouvant s'élargir à d'autres espèces d'invertébrés puisque ce canal Nav de type *para* est particulièrement bien conservé entre les divers ordres et espèces d'insectes étudiés à ce jour, avec des pourcentages d'identités allant de 87 à 98% selon les espèces (Tableau 3) (King et al., 2008b).

		Insect para Nav channels								
		<i>Drosophila melanogaster</i> P35500	<i>Musca domestica</i> Q94615	<i>Anopheles gambiae</i> A51843	<i>Bombyx mori</i> A5A2M4	<i>Blattella germanica</i> O01307	<i>Heliothis virescens</i> Q94584	<i>Nasonia vitripennis</i> A519E9	<i>Pediculus h. corporis</i> Q86M38	<i>Tribolium castaneum</i> GLEAN_04126
Insect para Nav channels	<i>Musca domestica</i> Q94615	95%	—	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Anopheles gambiae</i> A51843	92%	90%	—	—	—	—	—	—	—
	<i>Bombyx mori</i> A5A2M4	91%	88%	93%	—	—	—	—	—	—
	<i>Blattella germanica</i> O01307	90%	87%	92%	93%	—	—	—	—	—
	<i>Heliothis virescens</i> Q94584	89%	87%	92%	98%	91%	—	—	—	—
	<i>Nasonia vitripennis</i> A519E9	90%	88%	93%	92%	93%	91%	—	—	—
	<i>Pediculus h. corporis</i> Q86M38	89%	87%	91%	91%	90%	89%	90%	—	—
	<i>Tribolium castaneum</i> GLEAN_04126	89%	87%	92%	91%	91%	91%	93%	90%	—
	<i>Apis mellifera</i> hmm6170	91%	88%	93%	94%	94%	93%	97%	91%	93%
DSC1	<i>Drosophila melanogaster</i> Q9W0Y8	43%	44%	43%	53%	44%	44%	44%	44%	44%

Tableau 3 : Conservation du gène *para* du canal Nav chez les insectes. Pourcentage d'identité entre les sous-unités α de canal sodique de type *para*, codées dans divers génomes d'insectes. Pour comparaison, la séquence du canal cationique sélectif pour le calcium de *Drosophila melanogaster* (DSC1) est incluse. Sont indiqués également les numéros SwissProt ou d'accession au génome.

Tiré de (King et al., 2008b).

Différences entre insectes et mammifères

Des études de comparaison entre invertébrés et mammifères ont également été engendrées afin de mettre en évidence une quelconque différence entre ces deux groupes. Les données de séquençage obtenues indiquent notamment que le canal Nav1 d'abeille *Apis mellifera* et de mouche *Drosophila melanogaster* partagent de nombreux points avec les canaux sodiques de mammifères. En effet, de nombreux acides aminés sont ainsi conservés entre invertébrés et mammifères : la succession D-E-K-A au niveau des boucles reliant les segments S5 et S6 de chaque domaine (vu précédemment), les acides aminés chargés positivement retrouvés au niveau du segment S4 (topologie VSD ainsi identique au canal Nav1.4 humain), et enfin les

résidus hydrophobes au niveau de la boucle intracellulaire reliant les domaines III et IV de chaque domaine sont également conservés. Ces derniers, succession I-F-M-T chez les mammifères et M-F-M-T chez les insectes, sont notamment impliqués dans l'inactivation rapide du canal de type sodium (West et al., 1992). En revanche, même si le gène *para* partage plus de 50% d'identité avec les différents types de canaux Na_v de mammifères, ces taux restent relativement peu élevés (entre 50 à 60%) (King et al., 2008b). Ces différences entre invertébrés et mammifères se reflètent au niveau de l'affinité pour les sites récepteurs aux neurotoxines ; les canaux Na_v d'insectes étant plus ou moins sensibles à l'action de neurotoxines particulières (Warmke et al., 1997). Enfin, les canaux Na_v de mammifères et insectes peuvent être distingués pharmacologiquement par l'action sélective de nombreuses classes de composés largement exploitées dans les insecticides, tels que le DDT ou les pyréthriinoïdes (Dong, 2007; Dong et al., 2014; Raymond-Delpech et al., 2005). En effet, la classe des insecticides pyréthriinoïdes montre une spécificité d'action pour les canaux de types sodiques d'insectes avec de fortes affinités. Chez l'abeille *Apis mellifera*, il a été rapporté que les pyréthriinoïdes de type I, tel que la perméthrine, induisent un courant de queue suite à l'activation du canal et montrent une concentration d'efficacité moyenne (EC_{50}) de l'ordre de 3,7 μ M. Les pyréthriinoïdes de type II, tel que le fenvalerate, provoquent une désactivation lente des courants ainsi qu'une meilleure affinité que ceux de type I, avec une EC_{50} déterminée à 290 nM. En revanche, il est admis que l'ensemble de ces pyréthriinoïdes se lie au niveau du canal Na_v lorsque celui-ci est en configuration ouverte/activée (Dong et al., 2014; Gosselin-Badaroudine et al., 2015; Lauffer et al., 1995; Yu and Catterall, 2003).

Ainsi, et depuis de nombreuses années, divers travaux (biomoléculaires, biochimiques, électrophysiologiques, ...) sur les canaux de type sodique dépendants du voltage se sont multipliés chez le mammifère mais aussi chez l'insecte, amenant aujourd'hui à un large éventail de sous-unités connues.

ii. Canaux Calciques

Les canaux calciques dépendants du voltage permettent un influx de calcium au sein de la cellule, en réponse à une dépolarisation de la membrane. L'ion calcium représente un second messager crucial pour la cellule : celui-ci coordonne divers processus participant à l'excitabilité

cellulaire, tels que la contraction, la sécrétion, la neurotransmission ou encore l'expression des gènes dans de nombreux types cellulaires. Ces canaux sont donc indispensables à la physiologie des cellules excitables, aussi bien musculaires que nerveuses, afin de lier les signaux électriques transmis entre les cellules aux processus intracellulaires dépendants du calcium. Chez les insectes, et plus particulièrement l'abeille domestique *Apis mellifera*, il a notamment été rapporté que l'influx d'ions Ca^{2+} participait entre autre à la formation et à la consolidation de la mémoire olfactive (pour revue voir (Sandoz, 2011), mais aucune caractérisation sur le rôle précis de ces canaux chez l'abeille n'a encore été établie.

Historiquement, les canaux calciques activés par le voltage ont été pour la première fois mis en évidence au niveau des cellules cardiaques, à la fin des années 1960 (Rougier et al., 1969), puis d'autres courants calciques dépendants du voltage ont été rapidement identifiés par la suite, dans divers types cellulaires. L'ensemble de ces courants calciques a alors été divisés en plusieurs types, fonction notamment de propriétés pharmacologiques mais aussi électrophysiologiques. Sur ce dernier critère, deux familles de canaux calciques ont été distinguées : les canaux s'activant par de faibles dépolarisations (environ -40 mV), dits canaux LVA (pour low voltage activated, en anglais), et ceux s'activant à des potentiels plus dépolarisés, les canaux HVA (pour high voltage activated, en anglais). La famille des canaux LVA contient une seule famille de gènes, provoquant des courants dits de type T (pour Transitoire), tandis que la famille des canaux HVA est subdivisée en quatre sous-familles, selon leur cinétique de courant (de type P/Q, N, R et L).

Structure générale

Les canaux calciques dépendants du voltage sont des complexes multiprotéiques composés de quatre à cinq sous-unités associées entre elles. La sous-unité $\alpha 1$ (environ 190 kDa) représente la sous-unité principale, à la fois en terme de taille et de fonction, et est suffisante pour engendrer un courant calcique activé par le voltage (Mori et al., 1991). En effet, cette sous-unité contient l'ensemble des structures moléculaires nécessaires au bon fonctionnement de l'activité : le pore, et son filtre de sélectivité, par lequel les ions calcium vont pouvoir transiter à l'intérieur de la cellule ; le senseur de voltage, structure moléculaire permettant le couplage entre la dépolarisation de la membrane et l'ouverture du pore, et les divers sites de l'activité du canal par les phosphorylations (PKA, PKC) ou les phospholipides ; et enfin, les sites de fixation des différents agonistes, antagonistes et toxines, constituants des

modulateurs exogènes de l'activité du canal calcique (dihydropyridines, Aga- ou Cono-toxines, ...). Cette sous-unité α_1 possède environ 2000 acides aminés organisés en quatre domaines homologues (nommés DI-DIV) chacun constitués de 6 segments transmembranaires (S1-S6). Ces quatre domaines s'organisent autour d'un axe de symétrie perpendiculaire au plan de la membrane formant le centre du pore (Figure 16). Ce pore proprement dit, est formé des séquences S5-S6 de chaque domaine, assemblé sous la forme d'un "tupi inversé" dont la base forme une sorte de porte, s'ouvrant sous l'influence du senseur de voltage lorsque la membrane se dépolarise. La boucle extracellulaire formée entre les segments S5 et S6 de chaque domaine, dite boucle P, constitue la partie la plus étroite du canal et forme un filtre de sélectivité responsable de la sélection des ions et de la conductance du canal. Au sein de chaque domaine, les segments S1-S4 forment le senseur de voltage, structure capable d'apprécier le potentiel de membrane grâce à une série de charges positives (K -arginine-, et L -lysine-) présentent sur chacun des segments S4 de chaque domaine, et présentant la possibilité de se déplacer au sein de la structure en fonction des variations du champ électrique. Les autres segments (S1-S3), de nature hydrophobes, entourent le segment S4 en formant une sorte de canal dans lequel celui-ci peut alors se mouvoir lorsque la polarisation de la membrane change. Cette sous-unité α_1 , pouvant fonctionner seule, est néanmoins associée à plusieurs autres sous-unités qui régulent ses propriétés biophysiques et pharmacologiques, permettant un meilleur trafic du canal vers la membrane, et déterminent la localisation subcellulaire (T-tubule, synapse, corps cellulaire, ...). Deux sous-unités dites auxiliaires, une sous-unité β intracellulaire ainsi qu'une sous-unité $\alpha_2\delta$ extracellulaire, sont présentes sur l'ensemble des canaux à haut seuil (Dolphin, 2016) (Figure 16). Pour certains de ces canaux, on peut également trouver une sous-unité γ (notamment pour le canal musculaire de type L).

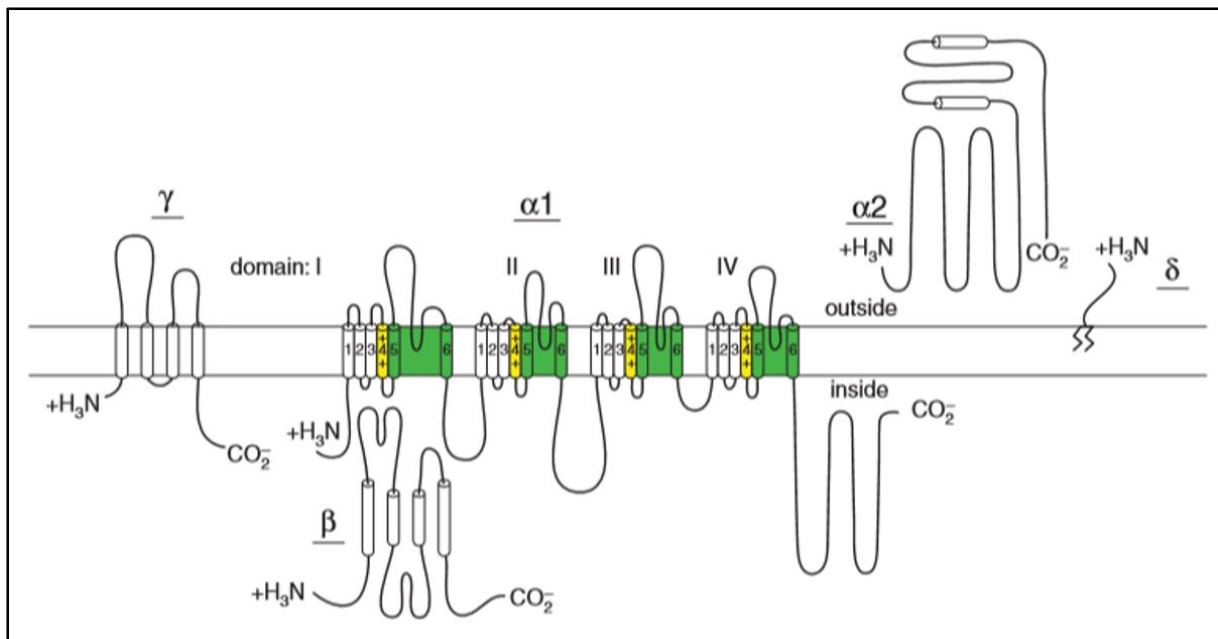


Figure 16 : Structure du canal calcique dépendant du voltage. La sous-unité α_1 , seule ou associée aux sous-unités régulatrices β et $\alpha_2\delta$, forme un canal fonctionnel activé par le voltage. Tiré de (Catterall, 2011).

Ces sous-unités auxiliaires régulatrices (β , $\alpha_2\delta$ et γ) peuvent alors modifier les propriétés de déclenchement de la sous-unité α_1 et donc affecter, par cascade, les propriétés des courants Ca^{2+} . La sous-unité β , codée par quatre gènes, et formée principalement de deux domaines conservés (C1 et C2) entourés de trois régions variables (V1, V2 et V3), selon la structure V1-C1-V2-C2-V3 (Rousset et al., 2005). Au niveau de la séquence, plusieurs sites fonctionnels ont été caractérisés, parmi lesquels le site d'ancrage au canal ou BID (pour *β -binding protein*, en anglais), d'une trentaine d'acides aminés, situé au niveau du domaine C2. Ce site a notamment montré une importance dans la liaison à la sous-unité α_1 , au niveau du segment reliant les domaines I et II des canaux calciques à haut seuil (Rousset et al., 2005). Par cette liaison, la sous-unité auxiliaire principale permet alors un meilleur adressage du canal à la membrane, jouant ainsi un rôle important dans la régulation de l'influx calcique. Cette sous-unité est en effet capable d'augmenter la sensibilité de la sous-unité α au potentiel, en déplaçant la courbe courant-voltage vers des potentiels plus hyperpolarisés. Celle-ci est également capable de modifier de nombreux paramètres des canaux : le nombre, en augmentant leur nombre à la membrane ; la voltage-dépendance ; la cinétique d'inactivation ; la probabilité d'ouverture ; ou encore la régulation par les voies de signalisation intracellulaires (Cens et al., 1996, 2015; Rousset et al., 2005). Ainsi, la co-expression de la sous-unité α_1 avec les sous-unités β_1 , β_3 ou

encore β_4 entraîne une accélération significative des cinétiques d'activation et d'inactivation, tandis que des effets opposés sont observés en présence de la sous-unité β_2 (Figure 17) (Cens et al., 1996).

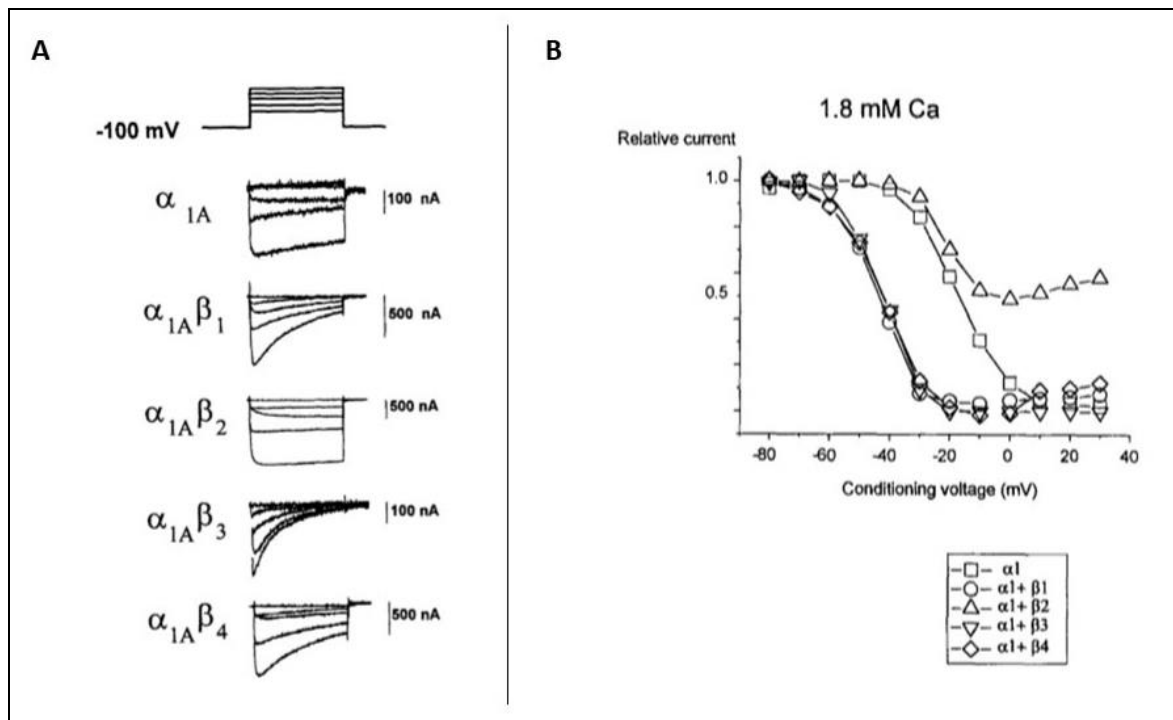


Figure 17 : Enregistrements électrophysiologiques obtenus en présence de la sous-unité α_1 , associée ou non à une sous-unité β (4 gènes). (A) Traces de courant enregistrées à partir d'ovocytes exprimant les sous-unités α_1 , $\alpha_1+\beta_1$, $\alpha_1+\beta_2$, $\alpha_1+\beta_3$ et enfin $\alpha_1+\beta_4$. Les courants ont été produits par des dépolarisations de 400 ms à -40, -20, 0, 20 ou 40 mV à partir d'un potentiel de maintien de -100 mV. (B) Courbes d'inactivation enregistrées à partir d'ovocytes injectés avec les ADNc de la sous-unité α_1 seule, ou $\alpha_1+\beta_1$, $\alpha_1+\beta_2$, $\alpha_1+\beta_3$ et enfin $\alpha_1+\beta_4$. La solution d'enregistrement pour ces tests (A et B) contenait 1,8 mM de Ca^{2+} extracellulaire.

Tiré de (Cens et al., 1996).

Cette sous-unité β , ainsi que la sous-unité $\alpha_2\delta$, participent de manière conjointe au trafic et la stabilité membranaire du canal. La sous-unité $\alpha_2\delta$ est constituée de deux protéines α_2 et δ associées par un pont disulfure. La partie α_2 est extracellulaire et assure l'interaction avec le canal calcique, malgré que la partie δ soit transmembranaire (Gurnett et al., 1997). La sous-unité γ enfin, comprend huit sous-unités mais seulement trois (γ_1 , γ_2 et γ_3) montrent une interaction avec les canaux calciques dépendants du voltage, chacune ayant des spécificités

d'interaction propres. Les sous-unités γ modulent de façon fine les canaux calciques comparativement aux autres sous-unités régulatrices, mais leur rôle reste peu étudié.

Mammifères

Chez les mammifères, la sous-unité CaV_α est codée par dix gènes différents, regroupés en trois classes (CaV_1 , CaV_2 et CaV_3), tandis que les sous-unités CaV_β et $\text{CaV}_\alpha 2\delta$ sont en revanche chacune codées par quatre gènes. Cet éventail de divers gènes conduit à de nombreuses possibilités de canaux calciques, ayant des localisations et propriétés pharmacologiques variées. En effet, la correspondance en terme de type de courant enregistré *in-vivo* sur cellules musculaires ou neuronales par expression de chacun de ces gènes a été établi, notamment grâce au développement de l'expression de gènes identifiés au sein de système d'expression hétérologue (ovocytes de xénope, entre autres). Ainsi, les courants de type T (courants transitoires de type LVA) sont dus aux sous-unités $\text{CaV}_3.1-3$, les courants de type N, P/Q et R sont dus aux sous-unités $\text{CaV}_2.2$, $\text{CaV}_2.1$ et $\text{CaV}_2.3$ respectivement, et les courants de type L (courants de type HVA) sont dus aux sous-unités $\text{CaV}_1.1-4$.

Les canaux de type L (pour Long-lasting, en anglais) présentent une activation pour de fortes dépolarisations de la membrane, avec un seuil d'activation autour de -40 mV. En présence d'ions barium (les canaux CaV laissant passer les ions Ba et Sr), ces canaux présentent une cinétique d'inactivation lente, or il a depuis été montré que cette inactivation était dépendante du voltage mais aussi de l'ion perméant (Brehm et al., 1980; Catterall, 2011; Cens et al., 2006; Doering and Zamponi, 2005; Gutnick et al., 1989). En effet, en présence de calcium, ces canaux présentent une cinétique d'inactivation rapide tandis que l'inactivation dépendante du potentiel est de nature lente. Le qualificatif de "long-lasting", au départ attribué à ces canaux serait ainsi non-approprié (Gutnick et al., 1989). Lors d'un changement d'ions barium vers calcium, un déplacement de la courbe courant-voltage vers des potentiels hyperpolarisés est observé, dû au fait que les ions Ca^{2+} se fixent plus aisément que le Ba au niveau des charges de surface du canal (Catterall, 2011; Hess et al., 1986). Enfin, ces courants de types L sont retrouvés au niveau des cellules excitables (système nerveux, muscles squelettique ou cardiaque...) mais également non-excitables au niveau des fibroblastes entre autres (Catterall, 2011). De nombreux courants de ce type, formant ainsi le type de courant le plus hétérogène, ont été discriminés (types S, L, D, et F) présentant tous la particularité

commune d'être sensibles aux composés dihydropyridines (DHP, famille de molécules comprenant des agonistes et antagonistes des canaux calciques).

Les trois membres de la famille des canaux $Ca_v2.x$ présentent chacun un type de courant particulier. Les courants de type P et Q (produits par deux isoformes de la sous-unité $Ca_v2.1$) s'activent à des potentiels autour de -45 mV en condition de barium (avec à nouveau une perméabilité plus forte pour le Ba que pour le Ca^{2+}). Concernant les cinétiques d'inactivation, les courants de type P s'inactivent de façon lente, tandis que les courants de type Q vont s'inactiver rapidement (Catterall, 2011; Cens et al., 2006). Les courants de type N (produits par les sous-unités $Ca_v2.2$) montrent des caractéristiques intermédiaires entre les courants de type T et de type L, notamment pour les cinétiques d'inactivation. De plus, ces courants de type N s'activent à des potentiels relativement hyperpolarisés avec un seuil d'activation autour de -35 mV, comme les canaux HVA. Lorsque l'ensemble de ces conductances calciques est alors bloqué par diverses toxines, le courant restant enregistré correspond alors à un courant de type R, produit par la sous-unité $Ca_v2.3$. Ceux-ci présentent un seuil d'activation supérieur à -40 mV, et leur inactivation est rapide (Catterall, 2011).

Les canaux de type T (pour Transient, en anglais), de la famille $Ca_v3.x$, sont retrouvés dans de nombreux tissus, au niveau nerveux, cardiaques ou encore musculaires. Ces courants s'activent à de faibles dépolarisations, de l'ordre de -70 mV, faisant de ces canaux l'unique type de courants LVA. Ces canaux présentent une cinétique d'inactivation très rapide, expliquant leur activation transitoire, de laquelle découle leur nom de canaux T (Catterall, 2011; Cens et al., 2006; Nowycky et al., 1985).

	Gènes	Courant	Seuil d'activation	Cinétique Activation	Cinétique Inactivation
Ca_v1 (type L)	Ca _v 1.1 (α1S) Ca _v 1.2 (α1C) Ca _v 1.3 (α1D) Ca _v 1.4 (α1F)	Type L	HVA	Très lente	Nulle/très lente (fct de Ca _v β)
Ca_v2	Ca _v 2.1 (α1A) Ca _v 2.2 (α1B) Ca _v 2.3 (α1E)	Type P/Q Type N Type R	Haut potentiel	Lente	Lente (fct de Ca _v β)
Ca_v3 (type T)	Ca _v 3.1 (α1G) Ca _v 3.2 (α1H) Ca _v 3.3 (α1I)	Type T	LVA	Rapide	Rapide

Tableau 4 : Récapitulatif des cinétiques d'activation et d'inactivation pour les trois familles de canaux calciques dépendants du voltage de vertébrés.

Invertébrés

Chez les invertébrés, y compris les insectes, cet ensemble de sous-unités est plus restreint. En effet, on dénombre seulement trois gènes pour la sous-unité principale α , un pour chaque sous-famille : Ca_v1, Ca_v2 et Ca_v3. De plus, il existe généralement un seul gène pour la sous-unité β , mais plusieurs pour Ca_vα2-δ (au nombre de trois) (Cens et al., 2013, 2015; Weinstock et al., 2006) (Figure 18). Néanmoins, aucun de ces gènes n'a encore été cloné et/ou exprimé, limitant ainsi les connaissances sur leurs rôles dans la physiologie et la toxicologie de l'insecte, notamment chez les abeilles. Cela étant en grande partie dû aux difficultés d'expression des sous-unités invertébrés dans les systèmes d'expression hétérologues couramment utilisés pour l'étude des canaux de mammifères, tels que les ovocytes de xénope ou les cellules de type HEK293 (Salvador-Recatalà and Greenberg, 2012). De plus, les courants Ca²⁺ d'invertébrés possèdent des propriétés pharmacologiques distinctes des canaux mammifères, ne permettant pas de s'y référer. Néanmoins, l'homologie de séquence entre les sous-unités α_1 permet une classification moléculaire des différents gènes des canaux calciques activés par le voltage d'invertébrés.

La sous-unité principale α_1 présente une structure identique à celle de vertébrés : quatre domaines homologues présentant chacun six hélices transmembranaires. Parmi celles-ci, le senseur de voltage (VSD) composé des segments S1 à S4 de chaque domaine, possède bien la répartition des lysines et arginines normalement présente au niveau du S4. Les segments S5

et S6 de chaque domaine forme le pore du canal et la boucle présente entre ces deux segments correspond au filtre de sélectivité du canal, avec les séquences d'acides aminés caractéristiques (Cens et al., 2017). Comme chez les vertébrés, la séquence du pore de ces canaux est chargée négativement et est représentée par une succession de quatre glutamates E-E-E-E pour les canaux Ca_v1 et Ca_v2 , et E-E-D-D pour les canaux Ca_v3 , acides aminés situés sur des positions homologues au sein des régions P de chaque domaine. Un simple changement de quelques acides aminés sur la séquence de ces boucles permet de modifier la sélectivité du canal calcique. Enfin, les sous-unités Ca_v1 et Ca_v2 ont été montrées comme canaux HVA avec des cinétiques d'activation et d'inactivation lentes, tandis que le canal Ca_v3 est considéré comme un canal à "bas seuil" (LVA) présentant une activation à des potentiels hyperpolarisés et une cinétique d'inactivation rapide. Le clonage de deux isoformes d'un même gène de $Ca_v\beta$ il y a quelques années, a permis de mettre en évidence l'importance de cette sous-unité régulatrice, en amplifiant l'amplitude du courant de ces canaux et en déplaçant la courbe de courant vers des potentiels plus hyperpolarisés (Cens et al., 2017).

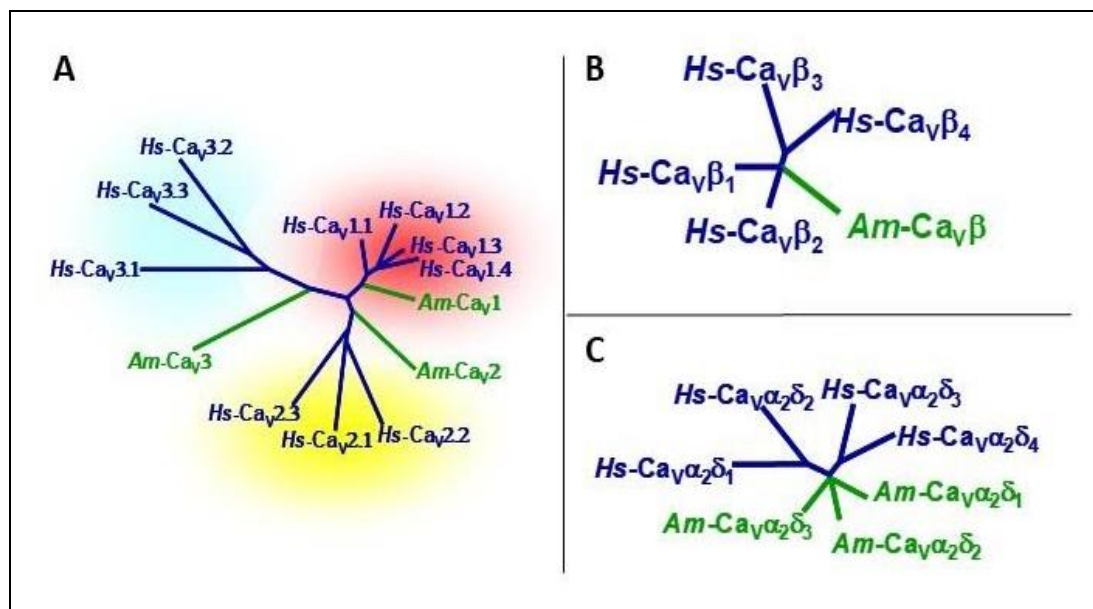


Figure 18 : Dendrogramme représentant les gènes de canaux ioniques dépendants du voltage, identifiés chez l'abeille domestique *Apis mellifera* (en vert), par rapport aux gènes humains (en bleu). A la fois pour la sous-unité principale α (A), et les sous-unités régulatrices β (B), et $\alpha_2\delta$ (C). (Diagramme par équipe Charnet).

Récemment, d'autres études ont identifié un autre type de canal voltage-dépendant présentant des similarités de séquence au niveau du filtre de sélectivité, avec les canaux Ca_v . En effet, un second gène apparenté à un canal sodique fut découvert chez *Drosophila melanogaster* et nommé DSC1 (pour *Drosophila sodium channel 1*, en anglais) (Figure 19) (Zhang et al., 2011). De par sa topologie et sa séquence en acide-aminés plus proches de celles des canaux sodiques, le gène DSC1 fut longtemps considéré comme un gène de canal sodique à proprement parlé (Kulkarni et al., 2002; Zhang et al., 2011). Cependant, la répétition en acides aminés D-E-K-A spécifique du canal sodique dépendant du voltage déterminant la sélectivité des ions, tant chez les mammifères que chez les insectes, ne semble pas conservée au niveau du gène DSC1 (Zhou et al., 2004). En effet, il a été rapporté que la répétition en acide-aminés de la séquence de filtre de sélectivité pour cette famille de gènes correspondait au motif D-E-E-A, séquence intermédiaire entre celle des canaux Na_v (D-E-K-A pour Na_v1) et celle des canaux Ca_v (E-E-E-E ou E-E-D-D pour Ca_v3) (Cens et al., 2017; Cui et al., 2012; Gosselin-Badaroudine et al., 2016). Des analyses fonctionnelles moléculaires et électrophysiologiques de ces canaux DSC1 ont ainsi permis de révéler un nouveau type de canal dépendant du voltage de type cationique sélectif aux ions Ca^{2+} et Na^{2+} (Zhang et al., 2011; Zhou et al., 2004). Plus tard, d'autres études ont pu mettre en évidence divers orthologues de ce gène chez d'autres espèces d'insectes, et ceux-ci furent par la suite découverts chez toutes les espèces d'insectes ayant une séquence génomique complète (Cui et al., 2012; Liu et al., 2001; Park et al., 1999). Des analyses biophysiques plus poussées ont alors permis de montrer que le gène DSC1 chez l'abeille était fortement sélectif à l'ion Ca^{2+} et pouvait ainsi être considéré comme un canal calcique dépendant du voltage, sensu stricto. La disparité de séquence et de propriétés avec les autres canaux calciques identifiés chez l'abeille ont permis de définir un nouveau type de canal calcique et ont conduit à le rebaptiser, canal calcique de type Ca_v4 , Am Ca_v4 (Cens et al., 2017; Gosselin-Badaroudine et al., 2016).

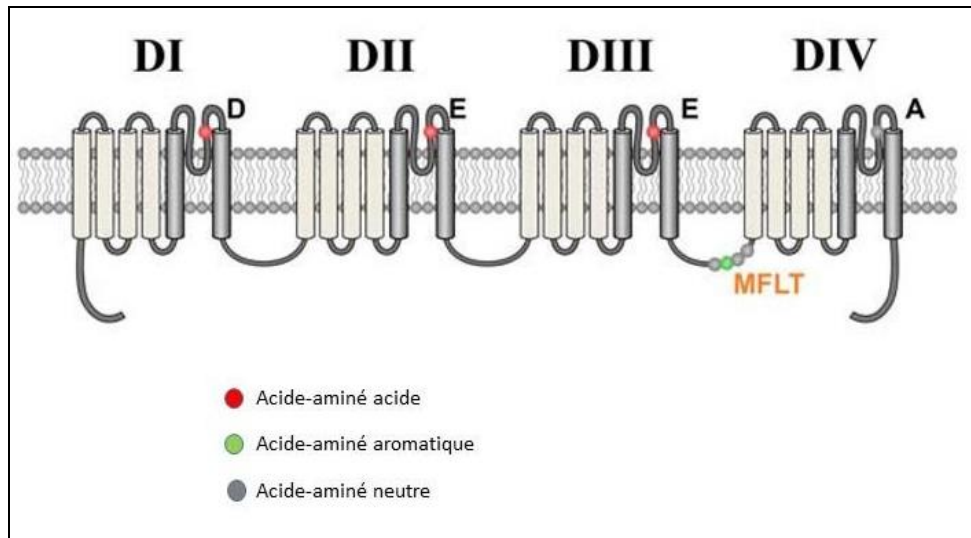


Figure 19 : Représentation schématique de la structure du canal DSC1, avec les différents domaines et boucles qui le compose. Est également représenté la position des acide-aminés caractéristiques de ce canal (DEEA). Tiré de (Gosselin-Badaroudine et al., 2016).

Ce gène présente une séquence d'environ 2120 acides aminés et est retrouvé dans de nombreux tissus. En revanche, la séquence particulière D-E-E-A caractéristique de ce canal a été mise en évidence chez des canaux similaires pour de nombreux organismes, mais pas chez les mammifères, faisant de ce gène un canal spécifique aux invertébrés. Cette succession d'acides aminés, ainsi que ces propriétés fonctionnelles, ont permis de classer ce canal en tant que canal HVA, avec une cinétique d'inactivation rapide. En effet, ce canal présente un potentiel de demi activation de -22 mV, tandis que le potentiel de demi inactivation est de l'ordre de -62 mV. Ces cinétiques d'activation et d'inactivation sont relativement lentes. Enfin, les sous-unités auxiliaires, telle que la sous-unité $Ca_v\beta$, ne permettent pas de moduler les propriétés de ce canal Ca_v4 (Gosselin-Badaroudine et al., 2016). On aurait donc ici un canal à haut seuil d'activation qui ne serait pas régulé par les sous-unités auxiliaires classiques.

	Seuil d'activation	Cinétique d'activation	Cinétique d'inactivation
Cav1	HVA	Lente (haut potentiel)	Lente (haut potentiel)
Cav2			
Cav3	LVA	Rapide (faible potentiel)	Rapide (faible potentiel)
Cav4		Lente (haut potentiel)	

Tableau 5 : Récapitulatif des cinétiques d'activation et d'inactivation pour les quatre familles de canaux calciques dépendants du voltage d'invertébrés.

Enfin, l'hétérogénéité de courant Ca^{2+} retrouvée chez les invertébrés peut en partie s'expliquer par divers processus, tels que les modifications post-traductionnelles, l'édition d'ARN, l'épissage alternatif des transcrits de sous-unité ou encore la présence de sous-unités auxiliaires (Jeziorski et al., 2000).

iii. Canaux Potassiques

Les canaux potassiques représentent la famille de canaux ioniques la plus vaste et la plus hétérogène au niveau des membranes cellulaires. Ceux-ci participent de ce fait à de nombreuses fonctions physiologiques (sécrétion d'hormones, contraction musculaire, cognition...), assurant leur rôle clef au niveau de l'excitabilité cellulaire, en participant à la genèse et à la durée du potentiel d'action dans les cellules excitables, mais ceux-ci sont également présents au niveau de la membrane de cellules non-excitables. Cette famille de canaux, extrêmement diverse, est apparue très tôt au cours de l'évolution, et est retrouvée dans tous les organismes vivants ; chez les mammifères, avec plus de 75 gènes identifiés, ainsi que chez les insectes, avec environ 30 gènes chez la mouche *Drosophila melanogaster*, et 90 chez le ver *C. elegans* (Jiménez-Vargas et al., 2017; Littleton and Ganetzky, 2000; Wei et al., 1996). Ces protéines sont présentes au niveau de la membrane et permettent le flux d'ions K^+ (principal cation intracellulaire) de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur, habituellement. L'activité des canaux K^+ peut être régulée en réponse à divers signaux, tels que les

modifications du potentiel de membrane, les changements calciques intracellulaires et d'autres modifications physiologiques. En fonction de ces différences d'activation, mais également de la structure de la sous-unité principale α , les canaux potassiques peuvent ainsi être divisés en plusieurs sous-familles : les canaux potassium dépendants du voltage (K_V), les canaux potassium activés par le Ca^{2+} (K_{Ca}), les canaux à rectification entrante (K_{IR}) et enfin les canaux potassium à deux domaines pores (K_{2P}) (Figure 20). En effet, chaque canal contient plusieurs sous-unités comportant deux, quatre ou six segments transmembranaires.

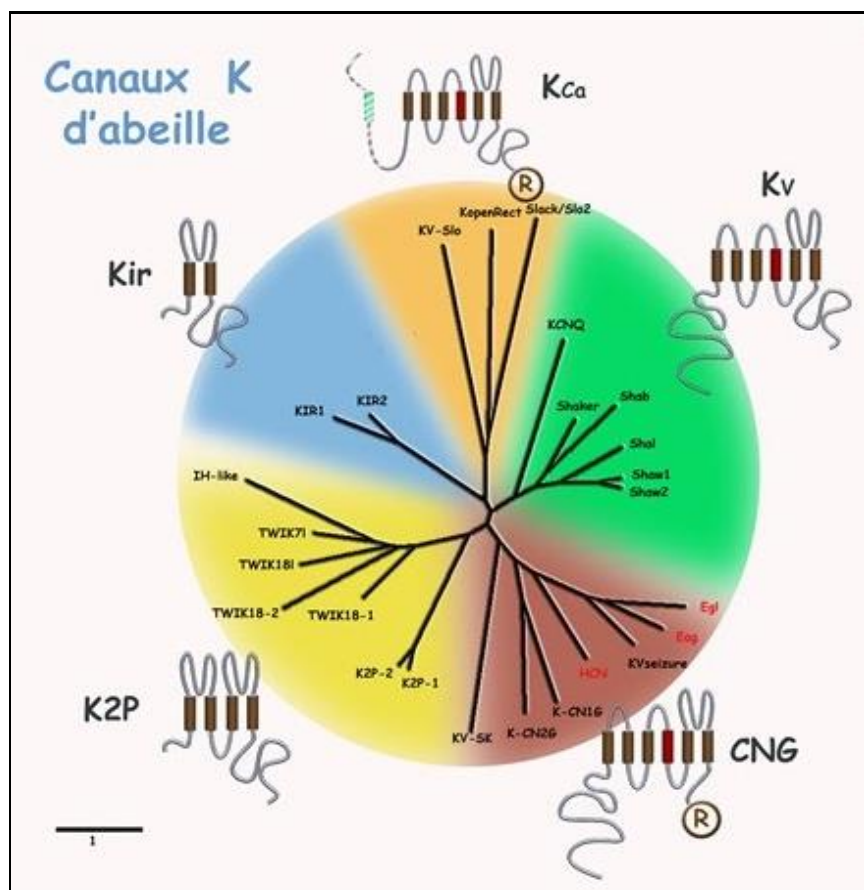


Figure 20 : Dendrogramme représentant l'ensemble des sous-familles de canaux potassiques, identifiés chez l'abeille domestique *Apis mellifera*.

Tiré de Chapitre Canaux potassiques par J.-B. Thibaud et C. Dantec, Abeilles et insecticides, ISTE publisher. Charnet, Collet et Sandoz éditeurs (A paraître).

Sous-familles et structures

La première classe de canaux potassiques à avoir été caractérisée sur le plan moléculaire fut la famille des canaux à six domaines transmembranaires et un pore, dits K_v . Celle-ci représente la famille la plus abondante en regroupant environ 40 canaux dépendants du voltage, groupés en 12 sous-familles (K_v1 à K_v12) chez les mammifères, basées sur leur identité de séquence. Ces canaux sont constitués de quatre sous-unités comprenant chacune six segments transmembranaires, qui peuvent s'assembler en homo- ou hétérotétramères (dans certains cas) autour d'un pore central, avec des propriétés électrophysiologiques alors différentes. Les sous-unités de certaines de ces familles K_v ne peuvent en revanche pas former d'homomères fonctionnels (on parle alors de canaux silencieux). Les quatre premières hélices de chaque domaine (S1-S4) forment le senseur de voltage, appelé VSD (pour *voltage-sensor domain*, en anglais), tandis que les segments suivants (S5-S6) correspondent au domaine de formation du pore. Les sous-unités du canal potassium présentes une structure particulière, dite boucle P, qui se trouve dans la partie supérieure du pore et est responsable de la perméabilité sélective au potassium. La majorité des canaux K_v va alors s'activer progressivement durant la phase de dépolarisation du potentiel d'action, et se ferme lorsque la membrane est hyperpolarisée (Kuang et al., 2015). Parmi cette famille de canaux potassiques dépendants du voltage (K_v), on peut distinguer les canaux KCNQ ($K_v7.x$), présents uniquement au niveau du système nerveux, les canaux ether-a-gogo ($K_v10.x$), hERG ($K_v11.x$) et elk ($K_v12.2$) (Jiménez-Vargas et al., 2017). Les canaux potassiques activés par le calcium intracellulaire (K_{Ca}) possèdent six segments transmembranaires et sont de trois types en fonction de la conductance unitaire : les canaux BK_{Ca} ayant une conductance élevée (allant de 250 à 300 pS, B pour Big), les canaux SK_{Ca} présentant une faible conductance (de 5 à 20 pS, S pour Small) et enfin les canaux IK_{Ca} avec une conductance intermédiaire (variant de 20 à 60 pS, I pour Intermediate).

Une autre classe de canaux potassiques connue est la famille des canaux à deux domaines transmembranaires et un pore, appelés Kir (pour Potassium « Inward Rectifier », en anglais, ou rectifiant entrant), allant de un à sept. Les deux domaines transmembranaires, constituant la sous-unité α , forment des homotétramères activés par hyperpolarisation. Contrairement aux autres canaux potassiques, ces canaux génèrent un courant de type entrant, qui va dépolariser la cellule lors de l'ouverture du canal et ainsi participer au maintien du potentiel de repos. Parmi cette famille, on peut noter que la sous-famille Kir₂ montre des canaux

constitutivement actifs, la sous-famille Kir₃ est activée par les protéines G, et enfin la sous-famille Kir₆ montre une sensibilité à l'ATP (Hibino et al., 2010).

Enfin, on peut citer la famille à quatre domaines transmembranaires et deux domaines pores, nommée K_{2P}. Les sous unités α sont au nombre de 15, réparties en six sous-familles : TWIK, TRESK, TASK, TALK, THIK, et TREK, où les quatre domaines transmembranaires constituant ces canaux vont alors s'assembler dans ce cas en dimères fonctionnels. Les canaux de cette famille sont notamment impliqués dans la modulation du potentiel de repos de la membrane de nombreux types cellulaires, et sont également la cible de diverses molécules.

L'ensemble de ces canaux est également étudié chez les insectes, notamment chez la mouche *Drosophila melanogaster* (modèle étudié pour la cognition, entre autres), mais aussi chez l'abeille *Apis mellifera*. En effet, malgré la distance évolutive séparant les mouches de l'Homme, une forte conservation des gènes et des réseaux moléculaires régulateurs a été montrée. Une étude récente s'intéresse ainsi à analyser la fonction de rectification sortante du canal ORK1, un homologue du canal potassique TREK1 chez la drosophile, sur les phénomènes d'apprentissage, de mémoire ainsi que le sommeil (Zhang et al., 2017). Chez l'abeille, peu de données pharmacologiques ont été mises en évidence. Seuls les canaux HCN ont été clonés à ce jour, et quelques enregistrements électrophysiologiques sur des neurones ont été discriminés (Gisselmann et al., 2004; Wüstenberg et al., 2004).

- **Canaux ioniques dépendants d'un ligand**

La communication rapide entre les neurones du système nerveux, mais aussi d'autres cellules (musculaires notamment) implique le plus souvent des messagers chimiques qui par liaison à leurs récepteurs provoquent alors leur ouverture. L'activité physiologique principale des LGIC réside au niveau de la communication neuronale par transmission de l'information au niveau pré- et post-synaptique, contrôlant ainsi de nombreux processus comportementaux. Les perturbations dans le contrôle de cet équilibre entre ces deux types de synapses, conduisent indéniablement à une activité anormale de ces LGIC, pouvant alors entraîner une activité aberrante au niveau neuronal (épilepsie), un comportement altéré (anxiété) ou même la mort des cellules neuronales (excitotoxicité) (Connolly and Wafford, 2004; Nemezc et al., 2016). De façon générale, les récepteurs impliqués dans la neurotransmission chimio-dépendante

peuvent être regroupés en deux grands types ayant des structures et des fonctions qui leur sont propres. Les récepteurs de type ionotrope représentent une famille de récepteurs-canaux, nommée LGIC (pour Ligand Gated Ion Channel, en anglais), qui s'ouvre par liaison d'un ligand (neurotransmetteur ou second messenger), amenant alors au déclenchement d'un potentiel d'action. La famille des récepteurs métabotropes ne possède en revanche pas de canal ionique et l'activation est alors déclenchée par une cascade d'évènements intracellulaires. Cette famille fut en premier lieu mise en évidence au niveau des terminaisons présynaptiques, où la stimulation des récepteurs entraîne une diminution de la libération de neuromédiateur.

Pour les récepteurs-canaux ionotropiques, les différents sites de liaison aux neurotransmetteurs et autres messagers chimiques provoquant leur ouverture sont situés au niveau de la partie extracellulaire du récepteur, et la présence d'un filtre de sélectivité permet le transport d'ions définis. La conformation des différentes sous-unités constituant le canal engendre en effet la formation d'un pore central, à travers lequel transite les ions entre les milieux extra- et intracellulaire. Selon le type de perméabilité du canal, cationique ou anionique, l'ouverture de celui-ci amènera alors à une dépolarisation ou une hyperpolarisation de la membrane, respectivement (Keramidas et al., 2004). L'activité antagoniste combinée des canaux ioniques dépolarisants cationiques excitateurs (récepteur nACh, par exemple) et hyperpolarisants anioniques inhibiteurs (récepteur GABA, par exemple) provoque le déclenchement d'un potentiel d'action. En fonction de leur caractéristique moléculaire (affinité pour un ligand donné) mais également de leur conformation structurale, les LGIC activés par un ligand peuvent ainsi être séparés en trois super-familles. La super-famille des récepteurs "Cys-loop" (pour boucle cystéine), tels que les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChR), au GABA (GABA_AR), ou encore à la sérotonine (5-HT₃R), présentent une conformation pentamérique, impliquant cinq sous-unités. La super-famille des récepteurs au glutamate [NMDA (N-méthyl-D-aspartate), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4- l'acide isoxazolepropionique) et kaïnate] possèdent quatre sous-unités (tétramère), tandis que la super-famille des récepteurs sensibles à l'ATP, appelés récepteurs P2X montrent une conformation trimérique (Figure 21).

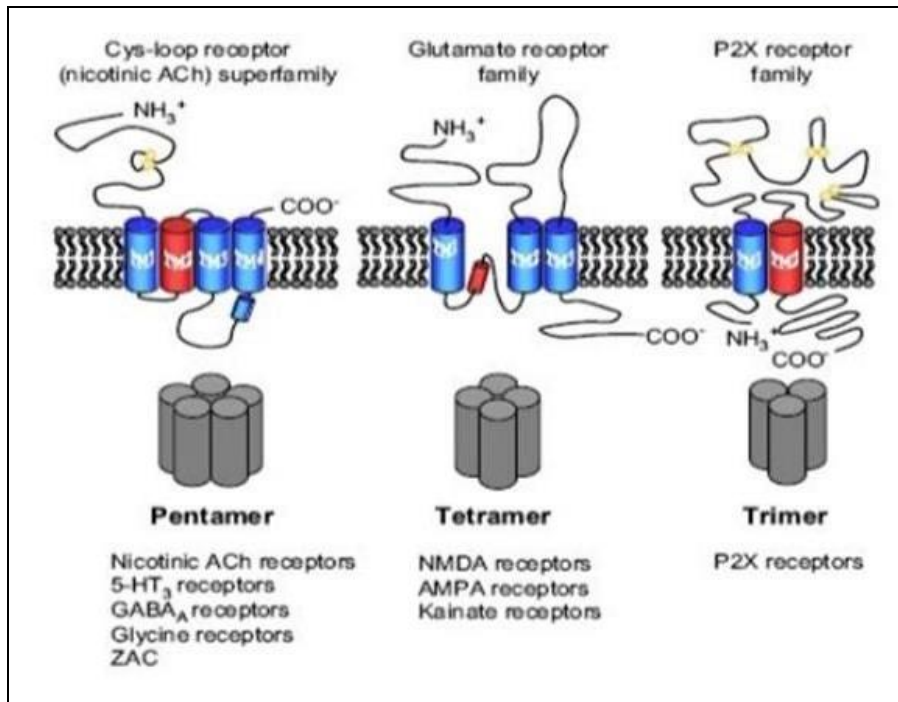


Figure 21 : Représentation des différentes familles de récepteurs ionotropiques en fonction de leurs conformations structurales.
(Equipe Charnet, IBMM).

De par leur conformation structurale différente, les trois super-familles de récepteurs ionotropiques peuvent également se différencier par leurs terminaisons N- et C-terminales pouvant être extra- ou intracellulaires. Les récepteurs Cys-loop (pentamère) présentent leurs extrémités N- et C-terminales toutes deux du côté extracellulaire, contrairement aux récepteurs activés par l'ATP, formés de trois sous-unités, montrant ces deux parties terminales du côté intracellulaire. La famille des récepteurs au glutamate (tétramère) montre une conformation intermédiaire avec la partie N-ter du côté extracellulaire et la partie C-ter retrouvée du côté intracellulaire.

Ces récepteurs diffèrent également par leur localisation et leur fonction. Par exemple, les récepteurs ionotropiques activés par la sérotonine (5-HT₃R), l'acétylcholine (nAChR) ou encore l'ATP (P2X-R) seront disposés préférentiellement au niveau pré-synaptique, tandis que les récepteurs au glutamate (GluR), au GABA (GABAR) ou encore à la glycine (GlyR) seront retrouvés au niveau post-synaptique.

Dans cette étude, seuls les récepteurs sensibles au GABA et à l'acétylcholine (nAChR) appartenant à la famille des LGIC pentamériques, auxquels nous nous sommes intéressés seront développés. Une brève description des récepteurs au glutamate sera également proposée.

Famille des pLGIC

La super-famille des LGIC pentamérique, ou Cys-loop, est ainsi formé de cinq sous-unités homologues (arrangées autour d'un pore central), où chacune possède une partie N-terminale extracellulaire contenant le domaine de liaison au ligand (LBD) ainsi que quatre segments transmembranaires (M1 à M4) formant un complexe protéique d'environ 150 à 300 kDa. La liaison d'un ligand spécifique permet alors de stabiliser le récepteur sous sa conformation ouverte/activée, contribuant ainsi à de nombreuses fonctions physiologiques, notamment la communication neuronale (Corringer et al., 2012).

Chez les mammifères, 40 gènes codent pour ces récepteurs LGIC, divisés en 5 groupes en fonction de leur pharmacologie (Dent, 2010) :

- le récepteur nicotinique à l'ACh (nAChR) comporte 17 gènes : α_1 à α_{10} , β_1 à β_4 , γ , ϵ et δ
- le récepteur au GABA (GABA_AR) comprend 19 sous-unités : α_1 à α_6 , β_1 à β_3 , γ_1 à γ_3 , δ , ϵ , π , θ et ρ_1 à ρ_3
- le récepteur à la sérotonine (5-HT₃R) présente 5 gènes, allant de A à E
- le récepteur à la glycine (GlyR), présente également 5 sous-unités : α_1 à α_4 , et β
- un canal unique activé par le Zinc (ZAC).

Une petite minorité de ces récepteurs est capable de prendre une conformation en homopentamère (α_7 et α_9 de nAChR, par exemple) (Couturier et al., 1990), mais la majorité de ces sous-unités s'assemble en hétéropentamères, afin d'obtenir un canal fonctionnel (Elgoyhen et al., 2001; Nemezc et al., 2016). Par exemple, les sous-unités α_2 , α_3 , α_4 et/ou α_6 peuvent s'assembler aux sous-unités β_2 et/ou β_4 , pour le récepteur nACh (Mishina et al., 1984, 1986). Cette combinatoire de sous-unités peut ainsi générer un nombre important de récepteurs avec des compositions, des stoechiométries et des propriétés fonctionnelles différentes (Zhao et al., 2006). Parmi ces récepteurs, le nAChR est de type cationique exciteur et est fortement perméable au Na⁺ et au Ca²⁺ suite à la dépolarisation engendrée par liaison du neurotransmetteur. A contrario, le récepteur au GABA est de type anionique et est responsable d'une neurotransmission inhibitrice rapide au sein des cellules.

Cette super-famille de récepteurs Cys-loop est également présente chez d'autres organismes, tels que les invertébrés (*C. elegans*, *D. melanogaster*, *A. mellifera* entre autres). En revanche, leur rôle premier dans la transmission synaptique inhibitrice et excitatrice rapide est alors médié par un autre neurotransmetteur que chez les mammifères (transmission neuromusculaire dépendante de l'ACh chez les mammifères et du glutamate chez les insectes) (Dent, 2010). Récemment, un nombre important de pLGIC ont également été découverts au sein des bactéries et archaea (Tasneem et al., 2005). Chez l'abeille domestique *Apis mellifera*, 21 gènes codent pour les récepteurs de cette super-famille LGIC (23 gènes chez *Drosophila melanogaster*), dont 11 pour les récepteurs nACh, représentant la famille la plus largement développée. Contrairement aux mammifères possédant 19 sous-unités pour le récepteur au GABA, celui-ci n'est codé que par quelques gènes chez les invertébrés : RDL (pour *resistance to dieldrine locus*, en anglais), GRD (pour *GABA and glycine-like receptor of drosophila*, en anglais) et LCCH3 (pour *ligand-gated chloride channel homolog 3*, en anglais). Parmi ces 21 gènes retrouvés chez l'abeille, le canal chlore sensible au glutamate (GluCl) n'est codé que par un seul gène, deux sous-unités codent pour ceux sensibles à l'histamine (HisCl1 et HisCl2), tandis qu'un unique gène code pour le canal chlore sensible au pH (pHCl). Enfin, trois sous-unités non-caractérisées (CG8916, CG12344 et CG6927) font également parties des pLGIC chez *Apis mellifera* (Jones and Sattelle, 2006). L'analyse des séquences entre les sous-unités d'abeille et de drosophile a permis de mettre en évidence des caractéristiques structurales communes aux LGIC, telles que la présence d'un pont disulfure entre deux cystéines séparées par 13 acides aminés, une partie N-terminale extracellulaire (site de glycosylation) contenant les boucles A - F formant le domaine de liaison au ligand (LBD), quatre régions transmembranaires (M1 à M4), ou encore la présence d'une boucle intracellulaire entre les domaines M3 et M4 (site de phosphorylation) (Jones and Sattelle, 2006). Parmi les quatre domaines transmembranaires conservés, la région M2 montre une importance particulière dans la formation du pore ionique et pour son rôle dans la sélectivité du canal (Keramidas et al., 2004). Les sous-unités RDL, GluCl, HisCl1 et HisCl2, et pHCl sont ainsi de type anioniques, possédant chacune une séquence PAR (P pour proline) caractéristique au niveau de la région M2. Les sous-unités GRD et LCCH3 forment des canaux hétéromultimériques cationiques liant le GABA, et présentent les motifs ADR (A pour alanine) et SAR (relatif à une sérine), respectivement.

Ces diverses classes de canaux LGIC constituent également une cible pour de nombreux insecticides. Les récepteurs nACh par exemple sont la cible des néonicotinoïdes (touchent également d'autres types de récepteurs), tandis que les récepteurs GABA et GluCl sont les cibles du fipronil et des avermectines, respectivement (Bloomquist, 2009). Les canaux pLGIC représentent donc des modèles intéressants, à la fois pour l'étude de la transmission synaptique chez les invertébrés que pour l'analyse toxicologique des effets des insecticides.

i. Récepteur GABA

Le GABA (pour acide γ -aminobutyrique, en anglais) représente le neurotransmetteur inhibiteur le plus abondant du système nerveux central chez les mammifères (présent dans 30 à 40% des synapses du cerveau) mais aussi chez les insectes (présent dans tout l'organisme). Ce neuromédiateur de nature inhibitrice chez l'adulte a été montré comme excitateur lors du développement embryonnaire (Casida and Durkin, 2015; Hosie et al., 1997). Historiquement, l'existence du GABA au niveau du cerveau a été, pour la première fois, mise en évidence par E. Roberts et S. Frankel en 1950 lors d'études d'acides aminés, dans divers tissus du système nerveux central des vertébrés. En 1956, E. Roberts suggère une relation, de nature directe ou indirecte, entre le GABA (et l'enzyme qui le synthétise) et la conduction de l'influx nerveux. Durant cette même année, deux chercheurs (T. Hayashi et K. Nagai) émettent l'hypothèse que le GABA pourrait posséder un rôle inhibiteur sur l'activité électrique du cerveau. Les recherches sur ce neurotransmetteur GABA se sont ainsi multipliées et les découvertes quant à son rôle se succèdent : implication dans les mouvements ioniques, diverses fonctions inhibitrices, rôle dans l'épilepsie et autres maladies. De structure simple (formule $C_4H_9NO_2$), le GABA joue un rôle en revanche essentiel dans de nombreux processus physiologiques tels que la transmission synaptique ou le contrôle de l'hyperexcitabilité neuronale. Chez l'Homme, le GABA possède une fonction prépondérante ; chez l'adulte, en empêchant l'excitation prolongée des neurones, mais également par sa fonction neurotrophique en favorisant la croissance de certains neurones au niveau du système nerveux. Lorsque celui-ci se lie à l'un des deux types de récepteurs lui étant spécifiques à la surface des neurones, cela se traduit alors par une entrée d'ions chlore (Cl^-) au sein de la cellule, et donc une hyperpolarisation, réduisant ainsi la probabilité de transmission du potentiel d'action. Chez les vertébrés, ces

récepteurs ionotropes peuvent être de deux types dits GABA_A ou GABA_C, en fonction de leur composition en sous-unités. Chez les insectes, plusieurs gènes codent pour le récepteur GABA, notamment les sous-unités RDL, GRD et LCCH3, présentant une haute identité de séquence avec les sous-unités de récepteurs ionotropiques de vertébrés. Ces récepteurs sont particulièrement étudiés chez les mammifères comme chez les insectes puisque ceux-ci représentent une cible de choix pour plusieurs composés pharmacologiques, tels que les benzodiazépines, les barbituriques, les alcools, ou encore les composés insecticides, naturels tel que la picrotoxine, ou synthétiques, comme la dieldrin (Hosie et al., 1997).

Mammifères

Chez l'ensemble des vertébrés et en particulier chez les mammifères, 19 gènes codent pour des sous-unités de récepteur GABA, et nommés : α [1 à 6] ; β [1 à 3] ; γ [1 à 3] ; δ ; ϵ ; π ; θ et ρ [1 à 3]. Cette large diversité de sous-unités, associée à différents profils d'expression des gènes, permet une importante souplesse fonctionnelle. Ces récepteurs au GABA de vertébrés peuvent donc se différencier en fonction de leur composition en sous-unités et de leur localisation. Ceux-ci sont trouvés sous forme de pentamère (avec communément deux sous-unités α , deux sous-unités β et une sous-unité additionnelle) et possèdent deux sites de liaison pour le GABA, localisés à l'interface des sous-unités α et β . Ces récepteurs sont présents au niveau du bouton post-synaptique du neurone, où le GABA libéré dans la fente synaptique, va venir s'y fixer. Ainsi, le récepteur de type GABA_A est formé de multiples combinaisons pentamériques des sous-unités α , β , γ , δ , ϵ , π et θ , et est retrouvé dans l'ensemble du système nerveux central (la transmission synaptique étant classiquement et communément assurée par les récepteurs GABA_A possédant une sous-unité gamma), tandis que le récepteur GABA_C est constitué uniquement de sous-unités ρ , et montre une distribution plus limitée. Ces différences de composition en sous-unités leur confèrent également des différences pharmacologiques. En effet, les récepteurs GABA_A sont régulés par de nombreux régulateurs allostériques et montrent une forte sensibilité à la bicuculline (antagoniste). A contrario, les récepteurs ionotropes de type GABA_C sont insensibles à ces modulateurs ainsi qu'à la bicuculline. En revanche, ces deux types de récepteurs sont tous deux inhibés par la picrotoxine (PTX).

Invertébrés

Chez les insectes, la molécule de GABA est largement présente au niveau du cerveau, et a été mise en évidence chez de nombreux invertébrés, tels que la drosophile *Drosophila melanogaster* (Enell et al., 2007), l'abeille domestique *Apis mellifera* (Bicker, 1999), ainsi que le criquet *Schistocerca americana* (Leitch and Laurent, 1996). Comme chez les mammifères, cette molécule représente le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Chez les insectes, celle-ci possède un rôle primordial en participant au contrôle de la locomotion, l'apprentissage de l'olfaction ainsi qu'à la régulation du sommeil et de l'agressivité (Choudhary et al., 2012; Chung et al., 2009; Dupuis et al., 2010).

Trois classes de sous-unités de récepteurs ionotropiques au GABA codées par trois gènes ont été mises à jour et identifiées en premier lieu chez *Drosophila melanogaster* (Hosie et al., 1997). Parmi ceux-ci, le gène RDL (pour *resistance to dieldrin locus*, en anglais), prédominant, représente le composé principal des récepteurs ionotropiques sensibles au GABA. Les orthologues de ce gène ont été par la suite rapidement identifiés dans diverses autres espèces d'insectes modèles : abeille domestique, moustique, blatte, varroa, etc. Le nombre de sous-unités homologues à ce gène diffère en revanche entre les diverses espèces d'arthropodes étudiées. Une sous-unité unique du gène RDL a ainsi été trouvée chez l'abeille *Apis mellifera* par exemple, tandis que quatre (RDL1 à RDL4) ont été trouvées dans le génome de *Varroa destructor*, un acarien infectant la plupart des ruches en Europe (Dupuis et al., 2010; Ménard et al., 2018). Les concentrations moyennes en GABA nécessaire pour activer ce récepteur ont été rapportées pour de nombreuses espèces d'arthropodes, notamment chez l'abeille avec une EC₅₀ mise en évidence à environ 25,2 μ M (Tableau 7) (Comitani et al., 2016; Ménard et al., 2018). Les sous-unités codées par le gène RDL (Figure 22) présentent une séquence en acides aminés relativement importante pour les membres de la famille cys-loop, et montrent environ 30 à 38% d'identité de séquence avec les sous-unités du récepteur GABA de vertébrés. Ce gène est retrouvé largement distribué au niveau du système nerveux central des insectes, mais est absent au niveau musculaire.

Les récepteurs de type ionotropique d'insectes présentent quelques caractéristiques communes aux récepteurs GABA_A et GABA_C des vertébrés, ainsi qu'une forte similarité au niveau de la séquence, rendant donc ceux-ci aisément classifiables en divers groupes fonctionnels distincts (French-Constant and Rocheleau, 1993; Hosie et al., 1997). Comme pour les récepteurs GABA de mammifères, ceux-ci sont sélectifs aux anions et sont

antagonisés par la picrotoxine (composé naturel ciblant les récepteurs GABA), mais ils sont en revanche résistants à la bicuculline (Hosie et al., 1997). Ces récepteurs sont également la cible de nombreux composés antagonistes, naturels ou synthétiques comprenant notamment des insecticides (Casida and Durkin, 2015). La résistance aux insecticides est un phénomène commun chez de nombreuses espèces d'insectes, et est due à des modifications fondamentales dans la structure des récepteurs GABA (mutagénèse) des insectes résistants. Chez de nombreuses espèces d'arthropodes, et notamment la drosophile, cette résistance est associée au changement d'un simple acide aminé (alanine en sérine) en position 302 de la région M2 ; résistance à la dieldrin caractérisant le gène RDL (Feyereisen et al., 2015; Ffrench-Constant and Rocheleau, 1993; Hosie et al., 1997).

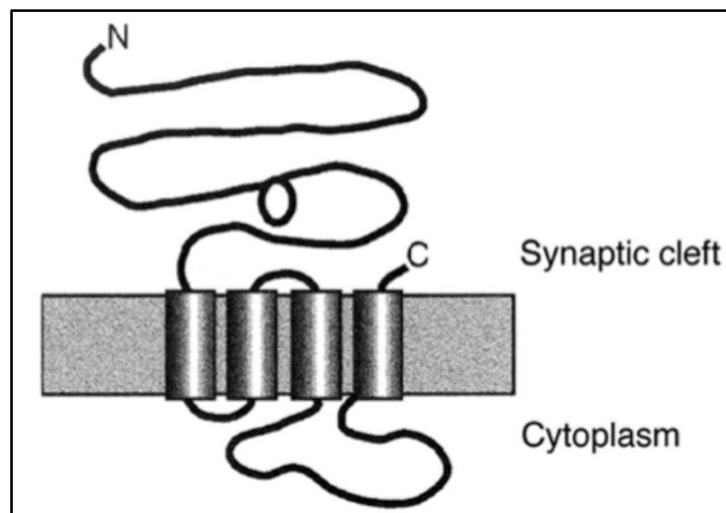


Figure 22 : Diagramme schématisé du récepteur GABA codé par le gène RDL, chez *Drosophila melanogaster*. La région N-terminale est située au niveau extracellulaire et contient une boucle dicystéine, et quatre régions transmembranaires, caractéristiques communes de la famille des récepteurs Cys-loop.
Tiré de (Hosie et al., 1997).

D'autres sous-unités ont été par la suite rapidement mises en évidence chez la drosophile, rattachées à trois classes additionnelles : les sous-unités LCCH3 (pour *ligand-gated chloride channel homolog 3*, en anglais), les sous-unités GRD (pour *GABA and glycine-like receptor of drosophila*, en anglais) et enfin, les sous-unités de type CG, codées par 4 gènes connus et identifiés. Comme pour la sous-unité RDL, des orthologues aux gènes GRD et LCCH3 ont été

identifiés chez d'autres espèces d'insectes, telle que l'abeille *Apis mellifera* ou *Varroa destructor* entre autres, mais pas pour les gènes de type CG. Le gène GRD code pour un large polypeptide d'environ 600 acides aminés, et présente 33 à 44% d'identité avec les sous-unités de récepteur GABA de vertébrés. Les sous-unités GRD ont été montrées comme proches des sous-unités γ mais leur profil d'expression n'est pas connu à ce jour. Phylogénétiquement, les sous-unités LCCH3 sont en revanche proches des sous-unités β de vertébrés. Celles-ci présentent le plus court polypeptide avec environ 400 résidus, mais en revanche le plus haut pourcentage d'identité de séquence avec les sous-unités de récepteur GABA de vertébrés (Tableau 6). Dans les années 1990, par expression hétérologue dans des ovocytes de xénopes, les docteurs French-Constant et Rocheleau se sont intéressés aux diverses combinaisons possibles amenant à un récepteur fonctionnel chez la drosophile, à partir de ces sous-unités (French-Constant and Rocheleau, 1993). Ils ont alors démontré qu'un récepteur de type homomérique peut être formé à partir des sous-unités RDL mais pas à partir des autres sous-unités LCCH3 ou GRD (ou encore CG). De plus, par combinaison avec les sous-unités RDL ou GRD, la sous-unité LCCH3 est capable de former un récepteur fonctionnel dont l'expression intervient avant la différenciation neuronale suggérant ainsi une implication dans le développement du système nerveux (French-Constant and Rocheleau, 1993). En revanche, contrairement à la majorité des autres récepteurs ionotropes d'insectes, le récepteur GABA fonctionnel formé par les sous-unités RDL-LCCH3 montre une sensibilité à la bicuculline mais aucune pour la picrotoxine (French-Constant and Rocheleau, 1993; Hosie et al., 1997).

Sous-unité	Nom	Position	Longueur de chaîne	% identité (vertébrés)	Structure (pentamère)
RDL	<u>R</u> esistance to <u>D</u> ieldrin <u>L</u> ocus	66F (K III)	606 résidus	30 à 38%	homo
GRD	<u>G</u> ABA and glycine-like <u>R</u> eceptor of <u>D</u> rosophila	75A (K III)	614 résidus	33 à 44% (proches sous-unités γ)	hétéro (avec RDL ou LCCH3)
LCCH3	<u>L</u> igand-gated <u>C</u> hloride <u>C</u> hannel <u>H</u> omolog 3	13A (K X)	416 résidus	47% (proches sous-unités β)	hétéro (avec RDL ou GRD)

Tableau 6 : Ensemble des données connues sur les sous-unités de récepteurs au GABA, chez *Drosophila melanogaster*. Données tirées de (Hosie et al., 1997). K pour chromosome.

En 2009, les recherches de Dupuis *et al.*, s'intéressants aux effets de l'application de GABA directement sur les lobes antennaires d'abeilles domestiques afin de démontrer l'action de cette molécule sur la transmission olfactive, mettent en évidence l'existence d'un courant entrant de type rapide par application de GABA sur des cellules isolées du lobe antennaire (Dupuis et al., 2010). Ces données ont ainsi permis de confirmer la présence de récepteurs de type ionotropique à la surface de ces lobes antennaires, et mettre en évidence une importante action de la neurotransmission inhibitrice dans le traitement des informations olfactives au niveau du système nerveux central de l'abeille. En effet, chez cet insecte, la discrimination des odeurs est fortement compromise par la perfusion de picrotoxine au niveau des lobes antennaires (Choudhary et al., 2012). De nombreuses autres études s'intéressent de façon plus générale à l'effet de composés insecticides directement sur le système nerveux des insectes, afin d'en évaluer la toxicité (Tableau 7). De nombreux composés sélectifs des récepteurs GABA d'insectes ont ainsi été découverts, notamment la famille des phénylpyrazoles (fipronil), des cyclodienes (dieldrin) ou encore des meta-diamides (broflanilide) (Casida and Durkin, 2015).

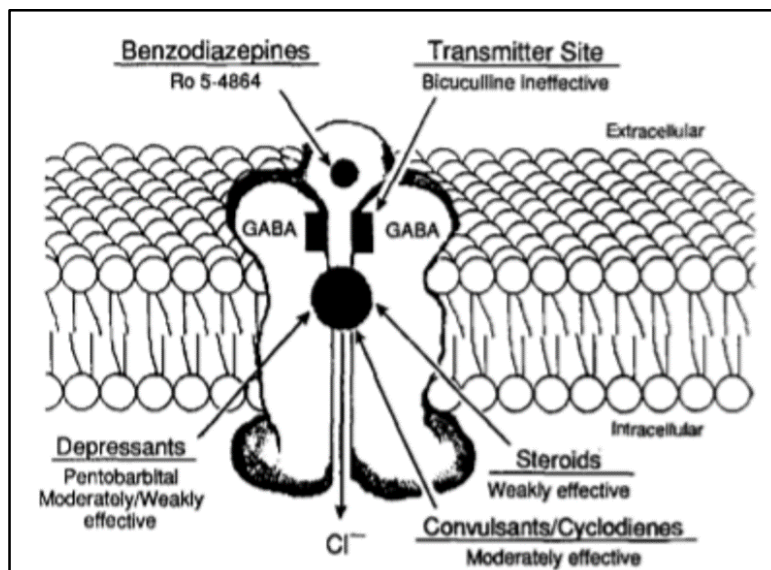


Figure 23 : Représentation du récepteur GABA chez l'insecte avec les différents sites de liaisons des composés pharmacologiques (stéroïdes, benzodiazépines, convulsivants...). Ces sites sont identiques à ceux des mammifères, en revanche les composés qui s'y fixent divergent.

Tiré de (Sattelle et al., 1991).

	EC ₅₀ (μM)	IC ₅₀	Sous-unité et espèce	Source
GABA	95 +/- 10	/	RDL1 <i>Varroa destructor</i>	(Ménard et al., 2018)
	25,2 +/- 3,9	/	RDL <i>Apis mellifera</i>	
	95 +/- 32	/	RDL <i>A. gambiae</i>	(Taylor-Wells et al., 2015)
Fipronil	/	0.5 +/- 0.12 (μM)	RDL <i>A. gambiae</i>	
		55 +/- 11 (μM)	RDL1 <i>Varroa destructor</i>	
Picrotoxine	/	180 (nM)	RDL1 <i>Varroa destructor</i>	(Price and Lummis, 2014)

Tableau 7 : Exemples d'EC₅₀ et d'IC₅₀ obtenues pour le composé agoniste GABA et deux composés insecticides (fipronil et picrotoxine) sur les sous-unités RDL de divers insectes. Les valeurs pour ces composés sont données +/- S.E.M.

ii. Récepteur à l'ACh

L'acétylcholine (ou ACh), synthétisée en 1867 par le chimiste allemand Adolf Von Baeyer, a tout d'abord été considérée durant de nombreuses années comme une molécule, avant d'être identifiée comme le premier neurotransmetteur du système nerveux périphérique au début du XX^{ème} siècle, suite à la mise en évidence de son rôle inhibiteur dans l'activité cardiaque chez les vertébrés. En effet, son action dans les fonctions végétatives et l'activité musculaire (entre autres) fut rapidement prouvée (Langley, 1907, 1909). Il aura fallu en revanche attendre quelques années afin de caractériser son rôle au niveau central, et pouvoir définir l'ACh comme neurotransmetteur endogène (Dale and Dudley, 1929). De nombreuses études ont par la suite permis de révéler le rôle primordial de ce neurotransmetteur ACh au niveau du système nerveux central à la fois chez les mammifères et les invertébrés, notamment dans les phénomènes d'apprentissage et de mémoire (Goldberg et al., 1999; Thany et al., 2003; Weiland et al., 2000). Les récepteurs nicotiques à l'ACh (nAChR) montrent en effet une action au niveau pré-synaptique de par leur forte perméabilité au calcium, afin de contrôler la libération de neurotransmetteurs.

Dès les années 1920, des études de comparaison de l'action de la muscarine et de la nicotine (agonistes partiels des récepteurs à l'ACh) ont alors permis de discriminer deux familles de récepteurs cholinergiques (protéines membranaires capables de lier l'ACh) présentant des propriétés pharmacologiques différentes (Dale, 1914; Dale and Dudley, 1929) : les récepteurs cholinergiques de type muscarinique (mAChR) et ceux de type nicotinique (nAChR). [Dans cette étude, seuls les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine seront abordés]. Malgré l'abondance des récepteurs nicotiniques au niveau du cerveau, il est apparu qu'il existait très peu de réponses synaptiques, au niveau central, imputables à ces récepteurs. Durant la première moitié du siècle dernier, un nombre important de données concernant les récepteurs ACh fut révélé, à la fois sur des aspects structuraux, physiologiques ou encore pharmacologiques. Des études à partir de venins de différentes espèces de serpents (Changeux et al., 1970; Lee and Chang, 1966), ont permis de mettre au point des outils pharmacologiques sélectifs facilitant la purification et la caractérisation des récepteurs à l'ACh. Ainsi, dans les années 1960, le récepteur nACh fut identifié de manière *in-vitro* grâce à une toxine spécifique : l' α -bungarotoxine (α -Bgt) (Lee and Chang, 1966). Par la suite, dans les années 1970, des études sur la raie *Torpedo marmorata* (source naturelle de nAChR) (Mebs et al., 1972) ont permis de nombreuses avancées supplémentaires, notamment sur les récepteurs nAChR de type musculaire. Le récepteur de ce poisson électrique fut ainsi le premier récepteur nAChR à être cloné et caractérisé par expression fonctionnelle dans des ovocytes de xénopes, système d'expression hétérologue largement utilisé depuis (Mishina et al., 1984). Les études effectuées sur la structure, la fonction ainsi que la régulation de ce récepteur ont par la suite servies de modèle pour des études similaires sur de nombreux autres canaux dépendants d'un ligand chez les vertébrés mais aussi chez les invertébrés.

Structure générale

Le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (nAChR) est une protéine membranaire appartenant à la superfamille Cys-loop des LGIC, qui permet la transmission du signal nerveux, au niveau des jonctions neuromusculaires, mais également au niveau neuro-neuronal ou sur les cellules chromaffines par exemple. Ce canal cationique non-sélectif présente des caractéristiques structurales communes aux autres canaux de cette famille LGIC (récepteurs Glycine, 5-HT₃, GABA_A et GABA_C). Celui-ci est ainsi formé par cinq sous-unités homologues (pentamère) agencés autour d'un pore central transmembranaire. Chaque sous-unité présente une région

N-terminale extracellulaire suivie de quatre segments transmembranaires hydrophobes (M1 à M4) contenant une large boucle intracellulaire entre les domaines M3 et M4 (présentant les sites de phosphorylation), ainsi qu'un domaine C-terminal extracellulaire hydrophile (Figure 24.A). La présence d'acides aminés spécifiques au niveau de la région N-terminale (hydrophile) définissant le site de liaison au ligand, permet ainsi de distinguer ces sous-unités α , des sous-unités non- α complémentaires (Hendrickson et al., 2013). Les sous-unités α sont alors caractérisées par la présence de deux cystéines séparées par 13 acides aminés formant un pont disulfure. Enfin, les domaines M2 participent à la formation du pore du canal ainsi qu'à la sélectivité et la conductivité de ce pore vis-à-vis des différents ions présents en solution (K^+ , Na^+ et Ca^{2+}). La molécule d'ACh se lie à l'interface de deux sous-unités adjacentes (sous-unités α - α dans le cas d'homopentamères, ou α - β pour les hétéropentamères) (Figure 24.C et 24.D), au niveau desquelles se trouvent les sites de liaison formés par la présence de boucles, allant de A à F (Corringer et al., 2000; Dupuis et al., 2012). En condition normale, cela induit alors l'ouverture du canal, permettant ainsi l'influx d'ions Na^+ et à moindre mesure d'ions Ca^{2+} , ainsi que le flux d'ions K^+ vers l'extérieur de la cellule (Barik and Wonnacott, 2009; Wonnacott et al., 2006) (Figure 24.B). Les molécules antagonistes compétitives, vont venir se lier aux mêmes sites nicotiniques empêchant ainsi ce processus d'activation.

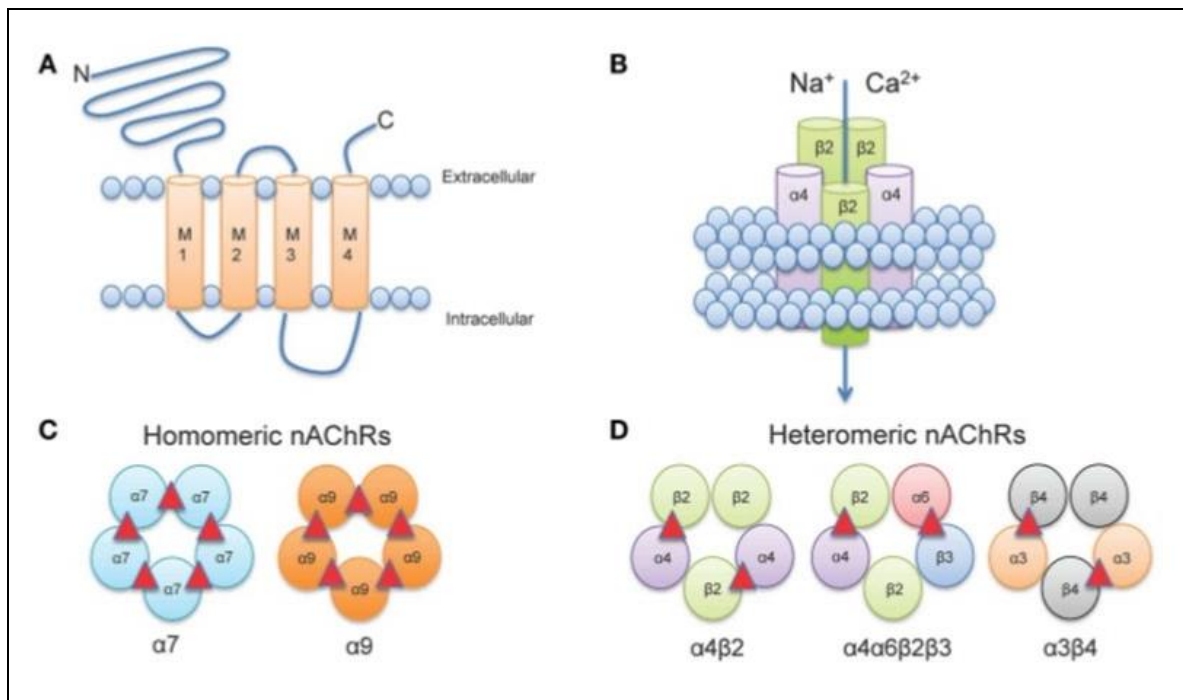


Figure 24 : Représentation de structure des récepteurs nACh neuronaux. (A) Représentation de la topologie membranaire des sous-unités nAChR neuronales disposant d'une longue région N-terminale contenant un pont disulfure entre deux cystéines, quatre régions transmembranaires (M1 à M4) et une large boucle intracellulaire (de longueur variable) entre les domaines M1 et M4 présentant les sites de phosphorylation (jaune). (B) Sous-unité transmembranaire fonctionnelle formée par l'assemblage de cinq sous-unités. (C) Complexes nicotinniques homopentamériques formés de sous-unités α uniquement. Les segments M2 de chaque sous-unité définissent le pore du canal. Les sites de liaison à l'ACh (rouge, cinq sites à basse affinité) se situent à l'interface entre deux sous-unités adjacentes. A ce jour, seules les sous-unités $\alpha 7$, $\alpha 9$, et $\alpha 10$ (non-montrée) sont capables de former des homopentamères fonctionnels. (D) Complexes nicotinniques hétéropentamériques par combinaison de sous-unités α et β (majorité des nAChRs). A noter que de multiples sous-unités α peuvent co-assembler avec diverses sous-unités β . Les sites de liaison à l'ACh (rouge) sont dans ce cas au nombre de deux et présentent une haute affinité.

Tiré de (Hendrickson et al., 2013).

La composition en sous-unités du récepteur va alors permettre de définir le nombre de sites de liaison aux molécules agonistes ou antagonistes. Les récepteurs pentamériques à l'ACh peuvent en effet être trouvés sous forme d'homopentamère (sous-unités α , Figure 27.C) ou hétéropentamère (sous-unités α et non- α , Figure 27.D). Ainsi par exemple, un récepteur formé de la sous-unité $\alpha 7$ (homopentamère neuronal fonctionnel) présentera cinq sites de fixation au ligand, tandis que le récepteur formé des sous-unités $\alpha 4\beta 2$ (récepteur neuronal de mammifère) aura deux sites de liaison (Gotti et al., 2009; Hendrickson et al., 2013; Taly and Charon, 2012; Taly et al., 2009). Cependant, les acides aminés définissant le site de liaison au ligand peuvent varier en fonction de l'espèce étudiée (Brejc et al., 2001; Olsen et al., 2014), mais seule la sous-unité α présente une affinité pour l'ACh. Pour de nombreux agonistes et antagonistes, notamment pour la nicotine (NIC), la clothianidine (CLO), l'imidaclopride (IMI)

ou encore le thiaclopride (THC) entres autres, ces sites de fixation ont été mis en évidence. Pour les agonistes (plus ou moins partiels), ces sites de fixation sont ainsi en grande partie identiques à ceux de l'ACh (Celie et al., 2004; Hendrickson et al., 2013; Hibbs et al., 2009; Ihara et al., 2008, 2014).

Mammifères

Chez les vertébrés, le nAChR représente le récepteur neurotransmetteur majeur au niveau des jonctions neuromusculaires du cerveau. En se basant sur les différences pharmacologiques et de compositions des sous-unités, mais également en fonction des diverses localisations, les récepteurs nACh de mammifères peuvent être divisés en deux classes : les récepteurs de type neuronal, et ceux de type musculaire. En s'appuyant sur ces données et sur l'analyse des séquences des sous-unités composants ces récepteurs, cela a permis entre autres de mettre en évidence un fort degré d'identité entre ces deux types de récepteurs. On dénombre ainsi actuellement 17 sous-unités pour les récepteurs nACh de mammifères, dont cinq de type musculaire ($\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ , ϵ) et 12 sous-unités de type neuronal ($\alpha 2$ à $\alpha 10$, et $\beta 2$ à $\beta 4$). Le récepteur nACh de type musculaire présente une structure hétéropentamérique comprenant deux sous-unités α et une sous-unité β , γ et δ (Albuquerque et al., 2009) agencée sous la forme $\alpha\beta\alpha\gamma\delta$. Il a en revanche été rapporté que la sous-unité γ était présente uniquement au niveau embryonnaire dans le muscle foetal puis remplacée par la sous-unité ϵ , retrouvée dans le muscle squelettique adulte (Mishina et al., 1986; Wonnacott et al., 2006), formant alors le récepteur $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$.

Les récepteurs neuronaux nAChRs forment une famille de récepteurs aux combinaisons variées. En effet, parmi les 12 sous-unités de type neuronal, seules les sous-unités $\alpha 7$, $\alpha 8$ ou $\alpha 9$ sont capables de former une structure homopentamérique fonctionnelle (Couturier et al., 1990), tandis que les autres sous-unités forment des hétéropentamères (Sgard et al., 2002). Les sous-unités $\alpha 7$ et $\alpha 9$ sont en revanche aussi capables de s'agencer en hétéromères avec d'autres sous-unités (Elgoyhen et al., 2001). Le récepteur ionotropique nicotinique hétéropentamérique est formé au niveau neuronal d'un assemblage variable de sous-unités α et de sous-unités β , dont l'identité peut être différer, définissant ainsi leur pharmacologie et leur biophysique (temps d'ouverture, conductance, ...). Diverses études ont montré que le récepteur nACh de type $\alpha 4\beta 2$ était le plus présent au niveau du cerveau mammifère, même si les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, et $\beta 4$ montrent également des taux d'expression significatifs

(Albuquerque et al., 2009; Lloyd and Williams, 2000). Afin d'analyser chacun des sous-types de récepteurs ACh mais également approfondir le rôle de ceux-ci dans les états normal et pathologique, l'emploi de ligands sélectifs de ces récepteurs est essentiel (Nai et al., 2003). Ces recherches ont notamment permis de différencier les récepteurs nicotiniques sensibles à l' α -Bgt (α -bungarotoxine, toxine antagoniste des récepteurs nACh issus du venin de serpent du genre *Bungarus*), de ceux non-sensibles à cette toxine. Ainsi, les récepteurs homopentamériques (formés des sous-unités α_7 , α_8 ou α_9) sont sensibles à l' α -Bgt tandis que les hétéropentamères ($\alpha_{2-6} + \beta_{2-4}$) γ sont insensibles (Couturier et al., 1990) mais montrent une plus forte sensibilité à la nicotine (Gotti et al., 2009). Il a aussi été montré que le récepteur musculaire $(\alpha_1)_2\beta_1\gamma\delta$ et le récepteur neuronal hétéropentamérique $\alpha_9\alpha_{10}$ présentaient une sensibilité à cette toxine de serpent (Elgoyhen et al., 2001).

Par ailleurs, les nAChRs, de par leur implication dans la propagation des potentiels d'action, et leurs rôles dans les fonctions cognitives, ou dans les différentes pathologies du système nerveux central, constituent des cibles d'intérêt pharmacologique (Perl et al., 2003; Weiland et al., 2000). De nombreux sites de fixation pour différentes drogues ou toxines ont en effet été décrits sur ces récepteurs nACh. Parmi ceux-ci, un site de fixation aux stéroïdes, deux sites de fixation aux modulateurs allostériques négatifs ou aux bloqueurs non-compétitifs, et enfin un site de fixation aux modulateurs allostériques positifs (élevant la conductance du canal médiée par les nAChR de type neuronal) ont été mis en évidence (Lloyd and Williams, 2000). Les inhibiteurs non-compétitifs vont venir se fixer dans le pore du canal, au niveau du segment M2 de chaque sous-unité, tandis que les modulateurs orthostériques vont s'ancrer au niveau des segments (ou boucles) formant le site de fixation au ligand (Corringer et al., 2000). Les différents autres modulateurs se fixent sur d'autres boucles. Le composant principal (sous-unité α_1 pour le muscle et sous-unité $\alpha_{(+)}$ pour le type neuronal) est formé par les segments A, B et C, tandis que les sous-unités complémentaires (sous-unités γ , δ ou ϵ pour le muscle, et sous-unités $\alpha_{(-)}$ ou β pour le type neuronal) sont formés des segments D, E et F (Itier and Bertrand, 2001).

Invertébrés

Chez les insectes, l'ACh représente le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central. Contrairement aux mammifères, les nAChR sont retrouvés exclusivement au niveau du SNC (Dupuis et al., 2012; Thany et al., 2003), et aucune sous-unité de type

musculaire n'a été montré. De nombreuses études confirment en effet la présence de courants entrants rapides induits par la perfusion d'ACh sur les différentes préparations neuronales, chez diverses espèces d'insectes (abeille ou mouche domestiques, drosophile, criquet migrateur, ...) (Albert and Lingle, 1993; Buckingham et al., 1997; Déglise et al., 2002; Goldberg et al., 1999; Hermsen et al., 1998; Rohrbough and Broadie, 2002). En revanche, à l'heure actuelle, aucune étude ne décrit précisément la stoechiométrie ainsi que la structure de ces nAChRs d'insectes, et celles admises sont extrapolées des études réalisées sur les nAChRs de vertébrés (notamment par comparaison des séquences codantes) (Leech and Sattelle, 1992; Tareilus et al., 1990; Van den Beukel et al., 1998). Sur le modèle *Drosophila melanogaster*, on a ainsi pu identifier rapidement la première sous-unité α d'insecte, nommée tout d'abord ALS (pour *alpha like subunit*, en anglais) avant d'être renommée $Dm\alpha_1$, puis les autres sous-unités nicotiniques. Ainsi, on dénombre à ce jour 10 gènes codants pour les sous-unités de nAChR chez la drosophile. Parmi ceux-ci, sept codent pour des sous-unités de type α ($Dm\alpha_1$ - $Dm\alpha_7$), et trois codent pour des sous-unités non- α ($Dm\beta_1$ - $Dm\beta_3$) (Bossy et al., 1988). Les gènes codants pour les sous-unités nicotiniques ont par la suite été identifiées chez d'autres espèces d'invertébrés, montrant une diversité du nombre de ces gènes en fonction de l'espèce étudiée : l'abeille domestique *Apis mellifera* et le puceron *Acyrtosiphon pisum* (11 gènes), le papillon *Bombyx mori* (12 gènes) ou encore le scarabée *T. castaneum* (12 gènes) (Dale et al., 2010; Jones and Sattelle, 2006, 2007). Basés sur leur forte homologie de séquences en acides aminés, ces différentes sous-unités de nAChR d'insectes ont ainsi été classées en sept groupes principaux par rapport aux sous-unités de *D. melanogaster* (Dupuis et al., 2012; Jones and Sattelle, 2007, 2010). La comparaison avec les séquences de sous-unités nAChR de vertébrés indique que seulement l'un de ces groupes partage un ancêtre commun avec les sous-unités α_7 et α_8 de vertébrés sensibles à l' α -bungarotoxine (sous-unités α_5 , α_6 et α_7). Les six autres (α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , α_8 et β_1) ont divergés d'un ancêtre commun distinct de celui ayant mené aux sous-unités de vertébrés (Jones and Sattelle, 2007). Ces travaux ont été complétés par des études électrophysiologiques et pharmacologiques sur neurone isolé ou *in-situ*. Celles-ci ont mis en évidence des similitudes entre les courants nicotiniques enregistrés chez l'abeille et des courants nicotiniques correspondant à l'activité de certains sous-types de nAChRs de vertébrés contenant notamment la sous-unité α_7 (Déglise et al., 2002; Dupuis et al., 2012; Goldberg et al., 1999). Dans ces deux cas, une perméabilité élevée au Ca^{2+} et une forte sensibilité à l' α -bungarotoxine sont retrouvées (Déglise et al., 2002; Goldberg et al.,

1999). Sur ces neurones isolés d'abeille (*Apis mellifera*), 80% du courant nicotinique induit par l'ACh est bloqué par l' α -bungarotoxine de manière irréversible (Goldberg et al., 1999; Thany et al., 2003), et aucun nAChR insensible à l' α -Bgt n'a pu être clairement rapportée, ce qui distingue l'abeille des autres insectes (Gauthier et al., 2006).

Au niveau des cellules de Kenyon de l'abeille, une sensibilité accrue pour les composés agonistes totaux (ACh -acétylcholine-, ou CCh -carbamylocholine-) ou partiels (NIC -nicotine-, et EPI -épibatidine-) a été révélée (Wüstenberg et al., 2004). Les composés agonistes dits partiels ne permettent d'obtenir qu'environ un tiers de la réponse nicotinique possible maximale engendrée en présence de composés agonistes totaux. Les cellules de Kenyon sont également sensibles aux composés antagonistes appliqués à de fortes concentrations (DHE -dihydroxy- β -érythroïdine-, et MLA -methyllycaconitine-, par exemple). Comme pour les composés agonistes, les antagonistes totaux permettent d'obtenir une inhibition totale (mais réversible) de la réponse nicotinique, contrairement aux antagonistes partiels dont le blocage s'avère limité (90% et 70% d'inhibition de réponse pour DTC -d-tubocurarine-, et MEC -mecamylamine-, respectivement chez la drosophile) (Wüstenberg et al., 2004). En revanche, l'ensemble des molécules antagonistes montre une inhibition dose-dépendante des courants nicotiques, en partie réversible (Dupuis et al., 2012). Ces études ont ainsi permis de mettre en évidence notamment les EC₅₀ pour les composés agonistes de ces récepteurs, ainsi que les IC₅₀ pour certains composés antagonistes (Tableau 8).

	Agonistes				Antagonistes	
	Totaux		Partiels		Totaux	
	ACh	CCh	NIC	EPI	DHE	MLA
EC ₅₀	6,7 μ M	106 μ M	0,88 μ M	21,5 μ M	/	/
IC ₅₀	/	/	/	/	0,5 pM	24 pM

Tableau 8 : Ensemble des valeurs EC₅₀ et IC₅₀ obtenu pour les composés agonistes (totaux et partiels) et antagonistes au niveau des courants nAChR de cellules de Kenyon d'abeille domestique *Apis mellifera*.

ACh = acétylcholine, CCh = carbamylocholine, NIC = nicotine, EPI = épibatidine, DHE = dihydroxy- β -érythroïdine, MLA = methyllycaconitine.

Résultats tirés de (Wüstenberg et al., 2004).

Enfin, diverses études sur les composés insecticides, en particulier les néonicotinoïdes (ciblant spécifiquement les récepteurs nACh), ont été initiées sur les insectes notamment via des tests de liaison par affinité. L'élaboration des méthodes de cristallisation des composés et la modélisation sur ordinateur a également permis de mettre en évidence les divers sites de liaison des néonicotinoïdes aux nAChRs. Les recherches du Dr Kayser et son équipe par exemple, s'intéressent à ces différents sites de fixation des néonicotinoïdes sur les récepteurs à l'ACh neuronaux d'insectes (Kayser et al., 2004). Ils montrent notamment, grâce à des études de compétition utilisant des néonicotinoïdes radiomarqués chez deux espèces de puceron différentes, que sept membres de la classe des néonicotinoïdes (parmi les huit) partageaient le même site de fixation (Kayser et al., 2004). En revanche, le site de fixation des néonicotinoïdes n'est pas toujours conservé entre les espèces (Honda et al., 2006; Jones and Sattelle, 2010), mais il a été rapporté que ces composés étaient en revanche capables de se fixer aux sites de liaison sensibles à l' α -Bgt (Taillebois et al., 2018).

Malheureusement, les études fonctionnelles sur les récepteurs nicotinniques d'insectes sont peu nombreuses (Millar, 1999), et l'obtention des séquences nucléotidiques de ces différentes sous-unités n'a pas apportée de nouvelles informations sur la stoechiométrie, la biophysique ou la pharmacologie des gènes isolés, principalement à cause des grandes difficultés rencontrées lors des tentatives d'expressions de ces gènes en système hétérologue. Les causes de ces difficultés d'expression sont à ce jour inconnues, mais pourraient être en partie dues à l'absence de protéines chaperonnes nécessaires à l'expression de pentamères fonctionnels comme cela a été décrits pour le vers *C. elegans* (Kratsios et al., 2015; Pierron et al., 2016).

Les protéines chaperonnes

- **RIC-3**

Pour de nombreuses sous-unités de nAChRs, de vertébrés mais également d'invertébrés, la présence de la protéine chaperonne RIC-3 (pour *resistance to inhibitors of cholinestérase*, en anglais) a été révélé comme nécessaire. De nombreuses études mettent en effet en évidence le rôle de cette protéine transmembranaire au niveau de la maturation (folding et assemblage)

des sous-unités de nAChRs (Cheng et al., 2005; Halevi et al., 2002, 2003; Lansdell et al., 2005; Millar, 2009).

Historiquement, le gène *ric-3* de cette protéine (du même nom) fut identifié pour la première fois en 1995 chez le modèle *C. elegans* (Nguyen et al., 1995). Rapidement, d'autres recherches ont notamment permis de montrer que les mutations de ce gène causaient un déficit de la transmission cholinergique particulièrement spécifique, en agissant au niveau du site post-synaptique (Halevi et al., 2002; Miller et al., 1996). Cette protéine, comportant deux domaines transmembranaires et les régions N- et C-terminales au niveau cytoplasmique (Halevi et al., 2002) (Figure 25), montre une expression au niveau des cellules neuronales mais aussi musculaires, chez l'ensemble des espèces (vertébrés et invertébrés) (Halevi et al., 2003). Bien que l'analyse des séquences démontre quelques différences entre les espèces, celles-ci possèdent en revanche toutes un domaine "coiled-coil" (CC) au niveau de la région C-terminale (Halevi et al., 2002, 2003), dont le rôle exact n'est pas encore déterminé, mais ne semblerait pas nécessaire pour l'activité chaperonne de la protéine RIC-3 (Millar, 2009). La présence d'un domaine riche en proline, situé entre deux régions hydrophobes, est également commune à l'ensemble des espèces (Halevi et al., 2002, 003). La fonction de cette région riche en proline n'est pas non plus clairement définie, mais contrairement au domaine CC, celle-ci serait en revanche critique pour l'activité chaperonne de la protéine RIC-3 (Lansdell et al., 2005; Millar, 2009).

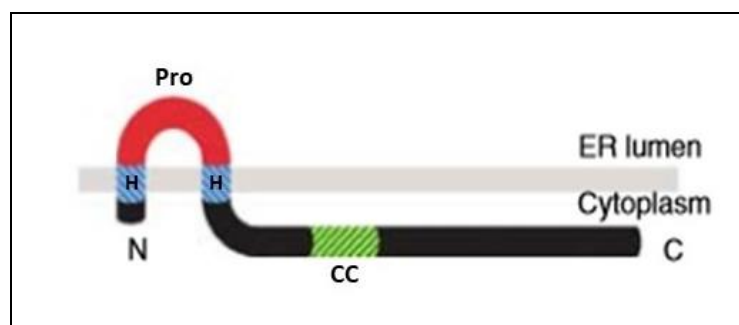


Figure 25 : Topologie transmembranaire de la protéine RIC-3. L'emplacement des domaines hydrophobes (bleu), des domaines "coiled-coil" (vert) ainsi que de la région riche en proline (rouge) est montré. Les régions N- et C-terminales sont situées du côté cytoplasmique.

Modifié à partir de (Millar, 2009).

Des études d'immunoprécipitation notamment, ont permis de révéler que ces protéines RIC-3 étaient capables de s'assembler avec les sous-unités de nAChRs non-assemblées (Lansdell et al., 2005). Parmi celles-ci, la protéine RIC-3 est ainsi capable de se lier à la sous-unité homopentamérique α_7 , mais également aux sous-unités pouvant former des hétéropentamères : α_3 , α_4 , β_2 et β_4 (Lansdell et al., 2005). Par co-expression, la protéine RIC-3 cause ainsi une augmentation des taux d'expression fonctionnelle de ces sous-unités nAChRs à la membrane, mise en évidence lors d'études d'expression hétérologue au sein d'ovocytes de xénope, à la fois chez les modèles invertébrés et mammifères (Halevi et al., 2002, 2003). Des études ont révélées que la protéine RIC-3 était également capable de se lier au récepteur de type 5-HT₃, sensible à la sérotonine, faisant parti de la famille des récepteurs Cys-loop (Cheng et al., 2005; Halevi et al., 2003). En revanche, aucun effet n'a été détecté sur les autres types de LGIC, incluant les récepteurs activés par le GABA ou le glutamate (Halevi et al., 2002, 2003; Lansdell et al., 2005; Millet et al., 1996).

Ces diverses approches révèlent ainsi le caractère nécessaire de cette protéine chaperonne RIC-3 au niveau des sous-unités de nAChRs, à la fois dans l'expression fonctionnelle mais également au niveau de la maturation (folding et assemblage) de ces sous-unités (Cheng et al., 2005; Halevi et al., 2002, 2003; Lansdell et al., 2005; Millar, 2009).

- **NACHO et autres protéines chaperonnes**

Un criblage à haut débit a récemment identifié NACHO, une protéine transmembranaire résidant au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et jouant un rôle important dans le trafic et le repliement des sous-unités α_7 de nAChR (Gu et al., 2016). Par co-expression avec ces sous-unités α_7 , la protéine NACHO permet d'augmenter considérablement les courants induits par l'ACh, mais également la quantité de récepteurs présents à la surface de la cellule. Fait intéressant, cette protéine est exprimée spécifiquement au niveau des aires du cerveau où les neurones sont retrouvés en nombre important : hippocampe, cortex cérébral et bulbe olfactif (Gu et al., 2016). Cette même étude a révélé que les sous-unités NACHO et α_7 n'interagissent pas directement entre elles, et ne forment pas un complexe stable, suggérant ainsi que NACHO n'est pas une sous-unité auxiliaire des nAChR, mais serait plutôt une protéine chaperonne du RE pour la sous-unité α_7 . Enfin, NACHO est capable de fonctionner en synergie

avec la protéine RIC-3, conduisant à une plus forte augmentation des courants médiés par $\alpha 7$ et provoqués par l'ACh (Crespi et al., 2018; Gu et al., 2016).

D'autres protéines chaperonnes des récepteurs nicotiques sont aujourd'hui connues, parmi lesquelles unc50, unc74, ou encore emc6. Au laboratoire, nous disposons de différentes protéines chaperonnes et toutes ont été essayées sur les récepteurs nicotiques, mais ces tests n'étaient malheureusement pas reproductibles.

L'ensemble de ces données permet de mieux comprendre la diversité des nAChRs de vertébrés et d'invertébrés, mais également d'envisager la recherche de toxines ou de molécules naturelles ou synthétiques qui soient spécifiques de certaines combinaisons de sous-unités. De tels agents pharmacologiques constitueraient ainsi des outils extraordinaires, non seulement pour l'analyse de ces combinaisons *in-vivo* dans la physiologie des insectes (et notamment de l'abeille), mais aussi pour la conception éventuelle de nouvelles molécules insecticides qui seraient plus sélectives des insectes ravageurs que ne le sont les néonicotinoïdes actuels.

iii. Récepteur au Glutamate

Le glutamate (forme ionisée de l'acide glutamique), représente le neurotransmetteur exciteur le plus répandu du système nerveux central des vertébrés. En effet, celui-ci correspond au médiateur de plus de 50% de la neurotransmission au niveau central, et est capable de provoquer des dépolarisations. Ce métabolite énergétique est également connu pour son rôle dans les phénomènes d'apprentissage et de mémoire, et comme intermédiaire dans la synthèse de glutamine et de GABA dans les neurones GABAergiques (Dingledine et al., 1999). Au niveau de la fente synaptique, le glutamate va se lier à divers types de récepteurs qui lui sont spécifiques, situés au niveau de la membrane post-synaptique. Différentes familles de récepteurs au glutamate ont pu être distinguées pharmacologiquement par la découverte d'agonistes naturels (comme l'acide kainique) ou de synthèse (tel que le NMDA, premier agoniste de synthèse des récepteurs ionotropiques du glutamate). Diverses approches pharmacologiques et moléculaires ont ainsi permis de classer ces récepteurs du glutamate en fonction de leur modalité de transduction et de leurs caractéristiques pharmacologiques.

Parmi ces récepteurs au glutamate, on distingue trois récepteurs de type ionotrope, en fonction de leur agoniste préférentiel : les récepteurs AMPA, NMDA et Kaïnate. Une fois ouverts, ces trois récepteurs ionotropes sont alors perméables aux cations : K^+ , Na^+ et Ca^{2+} . D'un autre côté, les récepteurs métabotropes activent de façon indirecte des canaux ioniques par l'intermédiaire d'une cascade de réactions impliquant les protéines G, auxquels ceux-ci sont couplés, mais également des protéines kinases, des lipases, ou encore des phosphatases.

Récepteurs ionotropiques

Les récepteurs au glutamate de type ionotrope (iGluR) sont tous capables de lier le glutamate et sont formés de l'association de quatre sous-unités (tétramère), dont chaque famille présente une diversité importante. En revanche, leur affinité pour le glutamate, leur durée d'ouverture ainsi que leur perméabilité pour le calcium divergent, permettant ainsi de les différencier. Chaque sous-unité présente une structure particulière proche de celle de la sous-unité α du récepteur nicotinique : une partie extracellulaire hydrophobe N-terminale (nécessaire à l'adressage) suivie d'un sous-domaine de liaison du glutamate dit S1 (partie hydrophile), puis de trois hélices transmembranaires hydrophobes (M1, M3 et M4). Le segment M2 correspond à une boucle se réinsérant au sein de la membrane côté cytoplasmique (Dingledine et al., 1999). Ces segments sont à nouveau suivis par un second sous-domaine de liaison au glutamate S2 (large boucle hydrophile), une hélice transmembranaire et enfin, une extrémité C-terminale intracellulaire (Figure 26). L'organisation des segments hydrophobes dans la membrane plasmique et la tétramérisation des sous-unités permet la formation d'un pore à travers lequel diffusent les ions K^+ , Na^+ et Ca^{2+} .

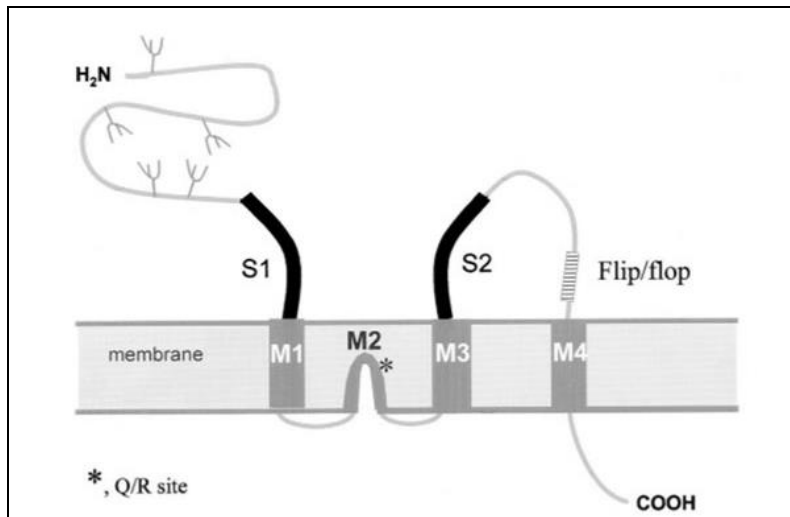


Figure 26 : Topologie de structure des sous-unités du récepteur ionotrope au glutamate. La structure transmembranaire est représentée avec les deux domaines de liaison au ligand (S1 et S2). Les symboles Ψ au niveau de la région N-terminale représentent les sites de glycosylation.
Tiré de (Dingledine et al., 1999).

Parmi ces récepteurs ionotropes au glutamate, les récepteurs de type AMPA (pour *aminométhylphosphonique acid*, en anglais) sont localisés généralement au niveau de la membrane post-synaptique des synapses excitatrices, et produisent un courant cationique dépolarisant porté par les ions K^+ , mais surtout Na^+ . Les quatre sous-unités aux structures communes qui composent ce récepteur, sont issues de quatre gènes identifiés appartenant à une même famille, allant de GluR1 à GluR4. Le récepteur AMPA va ainsi pouvoir fixer quatre molécules de glutamate, venant s'ancrer entre les parties S1-S2. Les récepteurs NMDA (pour *N-méthyl-D-aspartate*), localisés au niveau des synapses excitatrices, représentent le second groupe de iGluR. Ceux-ci sont activés par une co-liaison de glutamate et de glycines sur des sites différents au niveau du récepteur et montrent une forte perméabilité au calcium. Ces récepteurs sont formés par un assemblage de quatre sous-unités dont l'organisation est proche de celle des récepteurs AMPA précédemment décrite. Les gènes codants pour ces récepteurs fonctionnels NMDA possèdent tous deux sous-unités NR1, liant le glutamate, et deux autres sous-unités parmi les gènes NR2 et/ou NR3. En effet, il existe un seul gène codant pour la sous-unité NR1, mais quatre codent pour la sous-unité NR2 (NR2A à NR2D) et deux gènes pour la sous-unité NR3 (NR3A). Enfin, la famille des récepteurs au Kainate montrent une relative abondance au niveau du système nerveux central, et sont codés à partir de cinq gènes différents dont les produits forment deux familles de sous-unités : les sous-unités GluR5,

GluR6 et GluR7, et les sous-unités KA1 et KA2, présentant une très forte affinité pour le kaïnate. Ces récepteurs sont notamment localisés au niveau des terminaisons pré-synaptiques et joueraient un rôle dans la libération de neurotransmetteurs.

- **Récepteurs métabotropiques**

Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) sont des protéines transmembranaires hétérotrimériques couplés aux protéines G, appelés RCPG, présentant sept segments hydrophobes. Ces récepteurs sont classés en trois groupes, en fonction de leur homologie de séquence, de leur pharmacologie ou encore de la voie de transduction à laquelle ceux-ci sont couplés. De manière générale, les récepteurs mGluR1 et mGluR5 sont couplés positivement à la phospholipase C, via les protéines G de type Gq, et forment le premier groupe de mGluR, localisé au niveau post-synaptique. Les récepteurs mGluR2 et mGluR3 représentent le second groupe, tandis que les récepteurs mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8 forment un troisième groupe à part entière. Contrairement aux mGluRs du groupe 1, tous les mGluRs constituant les groupes 2 et 3 sont couplés négativement à l'adénylate cyclase, via une protéine G de type Gi/Go, et montrent une localisation pré-synaptique en modulant la libération de neurotransmetteurs. L'ensemble de ces récepteurs participe ainsi à la transmission synaptique au niveau neuronal (Dingledine et al., 1999).

Les différents récepteurs au glutamate de type ionotropique et métabotropique (brièvement présentés ci-dessus), montrent de larges possibilités de combinaisons de sous-unités. Le glutamate représentant le neurotransmetteur le plus abondant du système nerveux central, ses récepteurs sont particulièrement étudiés dans de nombreux domaines de recherche, à la fois chez les mammifères, comme chez les insectes.

L'ensemble de ces canaux ioniques et récepteurs membranaires forment une famille de canaux particulièrement étudiée, notamment par leur rôle clef dans la genèse et la propagation des signaux électriques dans les cellules excitables, mais également par leur nombreuses combinaisons et diversité pharmacologique ainsi que leur sélectivité et spécificité à de nombreux composés, naturels (toxines animales) ou synthétiques (composés insecticides).

d. Venins animaux

1. Généralités

Depuis toujours les venins animaux représentent une importante source de composés naturels, tels que des peptides (constituants les plus représentés correspondant à un assemblage d'acides-aminés), enzymes, polyamines, alcaloïdes et autres petites molécules (Escoubas et al., 2008; Kuhn-Nentwig et al., 2011; Rash and Hodgson, 2002; Vassilevski et al., 2009), dont de nombreux sont exploitables et/ou déjà exploités. En effet, au cours de l'évolution et ce depuis des millions d'années, les animaux venimeux ont développé des stratégies neuropharmacologiques particulièrement sophistiquées, et les venins se sont adaptés et spécialisés, devenant aujourd'hui des cocktails inépuisables de composés spécifiques de chaque espèce animale (Dutertre, 2014; Dutertre and Lewis, 2006, 2010; Dutertre et al., 2013, 2014a, 2017; King, 2004; King and Coaker, 2014; King and Guralnick, 2004; 2008b, 2016). Les venins animaux et notamment les toxines qui les composent, présentent une capacité d'action unique, se caractérisant par une forte affinité et une très haute sélectivité pour leurs cibles respectives, notamment les canaux ioniques. Les recherches sur ces venins animaux et toxines sont nombreuses (études moléculaires, électrophysiologiques, chimiques, structurales, ...), et ce depuis de nombreuses années. Historiquement, les premières observations et études des venins animaux débutent dès l'Antiquité, mais c'est à la fin du XVIIIe siècle que F. Redi prouve que le venin ingéré est sans nocivité, et que seul le venin injecté dans le corps lors d'une morsure était capable d'entraîner des effets néfastes engendrant parfois la mort. Par la suite, la description des espèces venimeuses s'est affinée grâce aux avancées dans les domaines de l'analyse de venin, telle que la biochimie, la biologie structurale et plus récemment les techniques « omiques » (protéomique et transcriptomique). Malgré cela, il aura tout de même fallu attendre les années 1940 pour voir apparaître les toutes premières publications concernant la recherche sur les animaux venimeux (Hermitte, 1946). Néanmoins, depuis plusieurs années, ces composés sont employés dans le but de décoder le fonctionnement et analyser le rôle des récepteurs et canaux physiologiques, chez diverses espèces modèles (mammifères et invertébrés). Certain(e)s des peptides, toxines ou encore molécules étudié(e)s ont su montrer diverses caractéristiques intéressantes pour une approche thérapeutique, notamment chez

l'Homme. Plus tard, d'autres analyses protéomiques des venins furent initiées, et certaines études ont pu discriminer des compositions de venins diverses, en fonction de l'espèce. Ainsi par exemple, le venin de scorpion contiendrait quelques centaines de peptides différents, tandis que celui de cône marin ou encore d'araignée en contiendrait plus de 1000. Chez les araignées et malgré ces chiffres éloquentes, cela n'est rien en comparaison du nombre d'espèces retrouvées, et par ce fait, de la diversité des composés retrouvés chez l'ensemble de ces espèces (King, 2004). En effet, à ce jour, environ 47 000 espèces d'araignées ont été répertoriées à travers le monde, mais beaucoup n'ont pas encore été découvertes. Ainsi, partant des données connues et en prenant en compte l'idée que, sur une estimation basse, chaque venin contient environ 300 peptides différents (moyenne), cela amène à plusieurs millions de biomolécules actives au sein des venins. Au fil du temps, ces biomolécules ont été épuré, arrangé et amélioré par la nature, ainsi que par la pression de sélection générée sur l'ensemble des espèces (King, 2011). Celles-ci ont alors obtenues d'importantes spécificités d'action engendrant une grande efficacité, envers les diverses cibles moléculaires d'intérêt, notamment les canaux ioniques. Par leur efficacité d'action si particulière, les venins animaux montrent un potentiel thérapeutique à fort intérêt et diverses toxines ont déjà été mises sur le marché ou sont actuellement en cours d'essai clinique, notamment contre des troubles du système nerveux ou les phénomènes de douleur chez l'Homme. En revanche, malgré le fait que les animaux venimeux aient comme proie principale les invertébrés (les araignées représentant les plus grands prédateurs d'insectes à travers le monde), seule une toxine connue (ω -Hexatoxin-Hv1a) a été exploitée à ce jour dans le but de concevoir des produits phytosanitaires sélectifs d'espèces en particulier (voir paragraphe : Exemples de toxines d'araignées agissant sur les canaux ioniques). En effet, les insecticides actuels ne montrant aucune spécificité d'action (voir Chapitre Insecticides), ceux-ci affectent l'ensemble des insectes, ciblés ou non. Les toxines animales pourraient ainsi permettre l'apport de nouveaux composés naturels pour la conception d'insecticides spécifiques des insectes dits nuisibles.

2. Action des venins

De manière générale, l'animal utilise communément son venin afin de paralyser, tuer et pré-digérer sa proie, mais celui-ci possède également de nombreuses autres propriétés. En effet,

le venin peut également être exploité par l'animal à des fins de défense ou encore d'intimidation, face à ses prédateurs (Dutertre et al., 2014b). Le relargage de venin est en revanche coûteux en énergie pour l'animal ; celui-ci ne l'usant donc pas de façon inopportune. Le venin mais plus précisément les toxines peptidiques qui le composent, possèdent des effets multiples : nécrose, paralysie et tétanie, palpitations ..., pouvant dans certains cas entraîner la mort. L'un des avantages notables fournis par la complexité de composition du venin de chaque espèce, au-delà de la diversité des proies potentielles, est l'action complémentaire, voire synergique, résultant de la combinaison de peptides agissant sur différentes cibles. Sur l'ensemble des cellules constituant l'organisme (humain ou autres) sont retrouvés des canaux et récepteurs biologiques, activés via les hormones, neurotransmetteurs, etc (voir chapitre Canaux Ioniques). Lors d'une envenimation (soit l'injection d'une multitude de toxines peptidiques), un grand nombre de canaux et récepteurs sont alors inhibés au même moment engendrant une réaction inadaptée voire disproportionnée de l'organisme de la victime. La recherche sur les venins montre donc un fort intérêt pour ce mode de fonctionnement particulier. En effet, si l'ensemble des toxines peptidiques injecté à des doses fortes est dangereux pour l'organisme, chaque toxine prise individuellement est alors capable d'activer sélectivement un type unique de canaux ou récepteurs, et dont l'effet procuré sera alors connu et contrôlé (Dutertre and Lewis, 2010; King et al., 2008b; Langenegger et al., 2019; Windley et al., 2012).

Toxines animales

Dans l'édition 2019 du *Larousse*, une toxine est définie comme « poison rencontré chez certains organismes vivants ». Les toxines peptidiques issues de venins animaux, dont la diversité est immense, peuvent être classées en diverses catégories, parmi lesquelles :

- Les neurotoxines (majoritaires), comme leur nom l'indique, s'attaquent directement au système nerveux par blocage des protéines membranaires (canaux ioniques), interrompant ainsi la transmission synaptique.
- Les hémorragines, provoquent des hémorragies mais également des hémolyses, troubles cardiaques, nécroses, etc.
- Les cytolytines, engendrent une destruction des cellules induite par rupture de la paroi cellulaire.
- Les hémolysines, amènent à la destruction des cellules érythrocytaires (globules rouges)

- Les cardiotoxines, les myotoxines,

Parmi ces toxines peptidiques présentes au sein du venin, certaines neurotoxines vont jouer le rôle de bloqueur du pore, en empêchant la transmission nerveuse, entre la source et le centre nerveux (King et al., 2008b; Windley et al., 2012). D'autres en revanche, présenteront des caractéristiques de modulateurs de l'ouverture du canal ("gating modifier" en anglais), en se liant à des sites différents. Dans la plupart des cas, chaque toxine animale correspond à un canal ou récepteur unique, diminuant ainsi le risque d'engendrer divers effets secondaires par action sur plusieurs cibles. En effet, la majorité des composés non-naturels (entrants dans la composition de nombreux médicaments) actuellement trouvés sur le marché présentent la capacité d'activer plusieurs canaux et/ou récepteurs au même moment, amenant à une série d'effets indésirables. Le manque de sélectivité et spécificité de ces composés expliquerait alors les nombreux effets secondaires engendrés, limitant ainsi leur utilisation. La diminution de ces effets requiert en effet un ciblage bien plus précis des divers et nombreux sous-types de canaux ioniques. Dans ce but, certains médicaments commercialisés à ce jour sont conçus à partir de toxines animales afin de tenter de contrebalancer ces potentiels effets néfastes, mais ceux-ci restent encore peu développés.

Intérêt thérapeutique des toxines

Diverses toxines issues de venins animaux sont connues et déjà aujourd'hui utilisées en thérapeutique dans la conception de médicaments pour le traitement de certaines maladies ou troubles chez l'Homme, notamment en neurobiologie.

Parmi ces médicaments issus de venin, le *Ziconotide* est de loin le plus connu. Commercialisé sous le nom de *Prialt*, et autorisé en Europe depuis 2005, ce médicament correspond à une version synthétique de la toxine ω -conotoxine MVIIA, issue du cône *Conus magus* (McIntosh et al., 1982). Celle-ci montre une forte sélectivité d'action pour les canaux calciques dépendants du voltage de type N, qui participent à la transmission du message nerveux, engendrant ainsi une activité analgésique (McGivern, 2007). De plus, cette toxine possède une meilleure affinité et efficacité que la morphine (environ 2000 fois plus puissant), sans les effets secondaires de cette dernière, ne provoquant ainsi pas de phénomène d'accoutumance (McGivern, 2007). Plus récemment, les toxines mambalgines furent mises en évidence au début des années 2000 par l'équipe du Dr Lingueglia (IPMC, CNRS, Sophia-Antipolis) (Diochot

et al., 2016). Ces toxines ont été isolées à partir du venin de mamba noir *Dendroaspis polylepis*, et représentent moins de 0,5% du volume du venin. Celles-ci agissent directement sur les canaux ioniques de type ASIC (pour *acid-sensing ion channels*, en anglais), jouant un rôle dans la phase de transmission de la douleur, et montreraient une efficacité plus élevée que la morphine sans pour autant présenter des effets secondaires aussi importants (Diochot et al., 2016). Ces toxines sont à l'heure actuelle en phase d'essai pour l'élaboration d'un nouvel analgésique agissant contre la douleur chez l'Homme.

D'autres venins animaux sont à l'heure actuelle étudiés pour leur spécificité et sélectivité d'action, afin de discriminer leur cible parmi les différents canaux ioniques et récepteurs membranaires de mammifères mais également d'insectes. Les animaux et arthropodes venimeux, telles que les araignées, les scorpions ou encore les serpents, ayant pour cible les petits animaux ou les insectes, possèdent des toxines peptidiques au sein de leur venin montrant une forte sélectivité pour ces types de canaux et récepteurs (Dutertre and Lewis, 2006, 2010; Dutertre et al., 2017; King and Coaker, 2014; King et al., 2008b, 2016; Windley et al., 2012).

Toxines agissant sur des canaux ioniques

Ainsi, la majorité des venins montre une action au niveau des canaux ioniques et ont évolué dans le sens d'une facilitation de prédation. En effet, les venins démontrent une visée spécifique, fonction du comportement de prédation ou de défense de l'animal (Dutertre et al., 2014b). Par exemple, afin de diminuer les risques encourus et dans le but de faciliter la capture, l'animal va alors immobiliser sa proie. Dans ce cas-là, les venins et de ce fait les toxines qui les constituent doivent agir rapidement en affectant la mobilité et la coordination des mouvements de la proie. La manière d'agir la plus rapide et efficace est de viser ainsi directement les canaux ioniques des cellules nerveuses situées à la périphérie, afin d'obtenir l'effet escompté. Diverses toxines, de nature peptidiques ou non-peptidiques, ont déjà prouvé leurs effets sur les canaux ioniques, et il a été rapporté qu'un changement dans la séquence en acides aminés de ces peptides pouvait modifier cette spécificité d'action. Il serait alors possible de tenter de mimer un peptide ayant l'activité recherchée dans un but thérapeutique (Murray et al., 2015).

- **Non-peptidiques**

Parmi ces toxines non-peptidiques, peut être citée en premier lieu, la **Tétradotoxine** (TTX) (Figure 27), issue du poisson tétraodon et isolée pour la première fois en 1909. Cette neurotoxine agit principalement sur les canaux dépendants du voltage de type sodique, et peut être fatale par simple ingestion. Celle-ci inhibe la génération de potentiels d'action au niveau des nerfs, par obstruction du pore du canal (Bane et al., 2014). L'étude de cette toxine a permis de distinguer les canaux sodiques sensibles à la TTX ($Na_v1.1-4$, $Na_v1.6$ et $Na_v1.7$), de ceux résistants à cette toxine ($Na_v1.5$, $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$). Les **Ciguatoxines** (réparties en 3 familles), produites par *Gambierdiscus spp*, s'accumulent chez les poissons ayant ingérés cette microalgue. Ces toxines agissent sur les canaux ioniques dépendants du voltage de type sodique et potassique causant des effets centraux et périphériques (cardiovasculaires et gastro-intestinaux entre autres) (Kopljar et al., 2016; Strachan et al., 1999; Zimmermann et al., 2013).

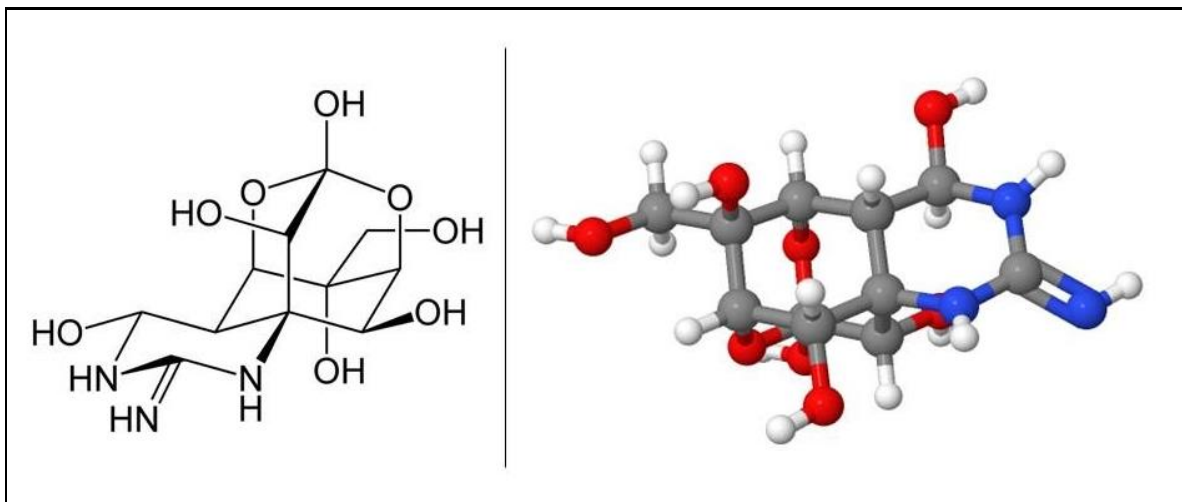


Figure 27 : Représentation de la structure 2D de la Tétradotoxine, issus de poisson tétraodon, ciblant spécifiquement les canaux dépendants du voltage de type sodique.

Tiré de (Bane et al., 2014).

- **Peptidiques**

Au sein des venins, divers arrangements et motifs de peptides peuvent être trouvés permettant de discriminer les venins entre eux. Classiquement, outre leurs structures diverses leur conférant des propriétés pharmacologiques propres, les toxines peptidiques présentent toutes certaines caractéristiques communes. En plus de leur haute affinité et sélectivité pour leur cible vu précédemment, celles-ci contiennent en effet habituellement entre 10 et 150 acides aminés, sont riches en ponts disulfures (liaison entre cystéines) et présentent une haute stabilité.

Parmi les toxines peptidiques, celles présentant un **motif ICK** (pour *i*nhibitory *c*ystine *k*not, en anglais) sont les plus répandues et de ce fait les plus étudiées et connues à ce jour. Ces peptides détiennent une combinaison originale composée de six cystéines reliées entre elles par trois ponts disulfures, et agencées comme telle : CX₃₋₇CX₃₋₆CX₀₋₅CX₁₋₄CX₄₋₁₃C, où X peut être représenté par un acide-aminé de tout type (Kozlov and Grishin, 2005). Cet arrangement leur confère une structure tridimensionnelle caractéristique aux toxines, notamment de venin de cônes marins et araignées, les rendant ainsi particulièrement résistantes à la dégradation (Daly and Craik, 2011). Les six cystéines sont elles-mêmes reliées de manière précise, la 1^{ère} allant avec la 4^e, la 2^d avec la 5^e, et enfin la 3^e reliée à la 6^e. Principales composantes de nombreux venins, ces toxines peptidiques au motif particulier sont l'objet de diverses études, dans le but de définir des solutions pour des traitements contre multiples pathologies et maladies neurologiques (Baeriswyl and Heinis, 2013).

En 2011, la base de données regroupant l'ensemble des informations connues sur les toxines issues de venin d'araignées appelée ArachnoServer (<http://www.arachnoserver.org>) recensait, sur un total de 1525 toxines connues provenant de plus de 90 espèces différentes, 177 portant le motif ICK (recherche « ICK ») (Herzig et al., 2011). Au sein de cette famille de toxines à motif ICK, certaines montrent une importante homologie de séquence. Parmi celles-ci, les phrixotoxines, purifiées à partir du venin de l'araignée *Phrixotrichus auratus* (Diochot et al., 1999), montrent une activité intéressante sur les canaux sodiques et potassiques dépendants du voltage (Bosmans et al., 2006; Chagot et al., 2004). La Protoxine-2 (ProTxII) (Figure 28), isolée à partir du venin de l'araignée *Thrixopelma puriens* (Middleton et al., 2002) est testée pour son activité inhibitrice sur divers isoformes de canaux dépendants du voltage,

notamment ceux de type sodique et le sous-type $Na_v1.7$ particulièrement (Bladen et al., 2014; Edgerton et al., 2008, 2010; Park et al., 2014; Priest et al., 2007; Xiao et al., 2010).

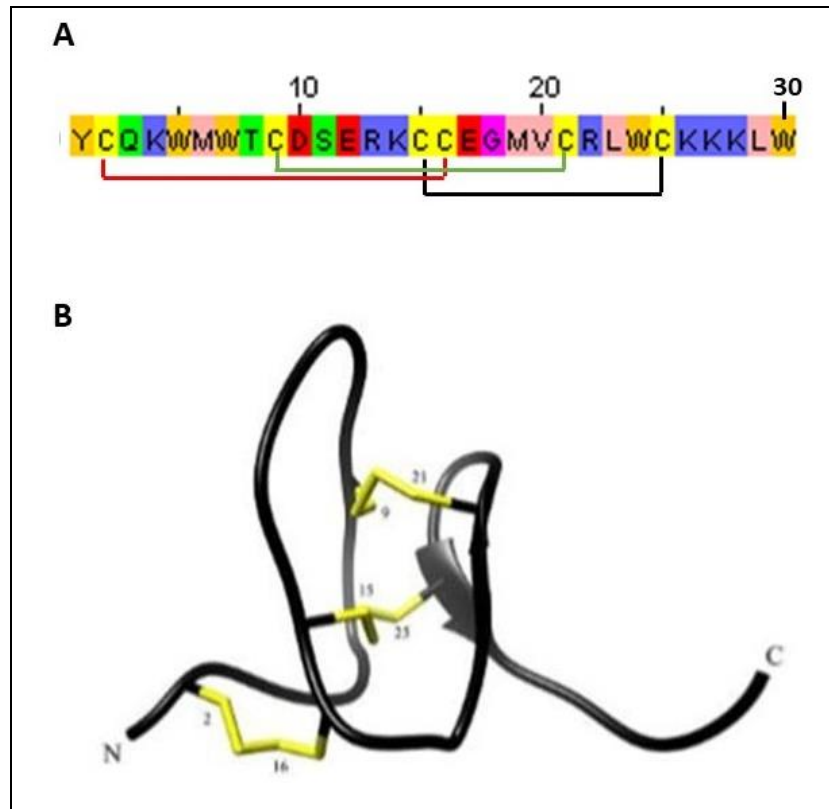


Figure 28 : Représentation de la séquence (A) et de la structure 3D (B) de la Protoxine-II. (A) Séquence en acides aminés de la ProTx-II. Les lignes rouge, verte et noire, représentent les liaisons entre les différentes cystéines, formant des ponts disulfures. Séquence obtenue sur Uniprot. Coloration des acides aminés sur Jalview. (B) Représentation 3D de la structure de la ProTx-II. Les barres jaunes représentent les trois ponts disulfures formés entre les cystéines de la protéine, marquées par un numéro indiquant leur position dans la séquence. Les annotations N et C indiquent les extrémités terminales. Tiré de (Park et al., 2014).

Enfin, extraite du venin de l'araignée *Grammostola porteri*, la toxine GpTx-1 montre une activité envers les sous-unités $Na_v1.4$, $Na_v1.5$ et $Na_v1.7$ de canaux sodiques dépendants du voltage (Murray et al., 2015, 2016).

Parmi les autres motifs pouvant être retrouvés au sein des peptides, le **motif DDH** (pour *disulphide-directed β -hairpin*, en anglais) est retrouvé au sein de la toxine Huwentoxine-2, issue du venin de l'araignée *Haplopelma schmidtii*. Celui-ci est caractérisé par un motif ICK (ponts disulfures ayant la conformation C₁-C₃, C₂-C₅ et C₄-C₆) ainsi qu'un feuillet β antiparallèle (Rong et al., 2016; Shu and Liang, 1999). Au sein de la famille des Huwentoxines, la HwTx-XI (pour Huwentoxine-11, ou encore κ -theraphotoxin-Hh1a) possède un motif différent dit **repliement Kunitz** (ou Kunitz-fold, en anglais) (Figure 29). Ce motif est caractérisé par une hélice α au niveau de la région C-terminale, une hélice courte côté N-terminal, ainsi qu'un agencement de cystéines selon le modèle : C₁-C₆, C₂-C₄ et C₃-C₅ (Peng et al., 2006; Tang et al., 2010).

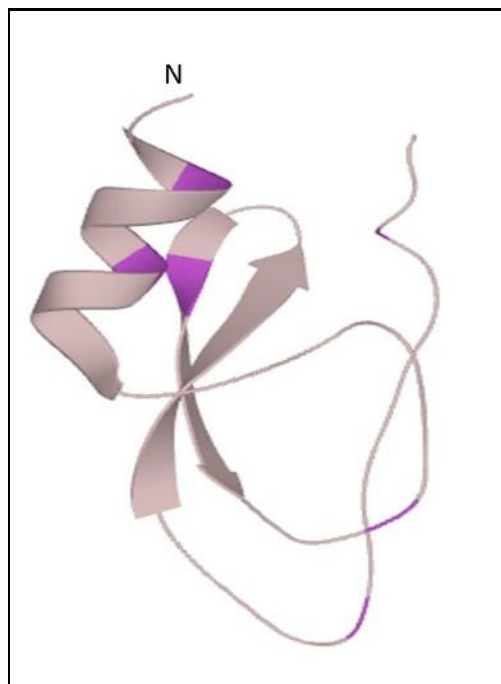


Figure 29 : Représentation 3D de la structure de la HwTx-XI. Les cystéines sont représentées en violet. Courte partie N-terminale.
(Structure obtenue sur Uniprot).

3. Venins d'araignées

Les araignées représentent un genre très particulier d'animaux venimeux ayant évolués à partir d'un ancêtre arachnide commun au cours de la période carbonifère, il y a environ 400 millions d'années. Cela permet de mettre en avant la période de temps étendue durant laquelle les araignées ont amélioré et enrichi la complexe composition de leur venin. Ces créatures, à la morphologie si particulière, représentent les prédateurs terrestres les plus redoutables envers les insectes. Avec à ce jour, plus de 47000 espèces décrites et connues, ce nombre n'est qu'une sous-représentation du nombre total réel d'araignées existantes, dont on estime à environ 4 fois plus le nombre d'espèces encore non-découvertes (Coddington and Levi, 1991; Platnick, 2014). Les araignées, à partir de leurs glandes à venin, sont capables de produire du venin hautement toxique utilisé afin de dissuader les prédateurs et maîtriser leurs proies. S'appuyant sur une stratégie de type trophique qu'est la prédation, les araignées ont su développer une bibliothèque complexe de composés au sein de leurs glandes à venin, tels que des neurotoxines, des composés cytolytiques ou encore des enzymes (Escoubas et al., 2008; Kuhn-Nentwig et al., 2011; Rash and Hodgson, 2002; Vassilevski et al., 2009). Ces divers composés peuvent alors être séparés en 3 classes, fonction de leur masse moléculaire : (i) les protéines à haute masse moléculaire (> 30 kDa), représentées principalement par les neurotoxines et enzymes, (ii) les peptides cytolytiques et neurotoxines riches en ponts disulfures (1 à 30 kDa), et enfin (iii) les acylpolyamines et autres petites molécules non-peptidiques (< 1 kDa). Parmi ces composants, les petites neurotoxines peptidiques chargées en ponts disulfures, estimées à plus de 10 millions, dominent largement la composition de la plupart des venins d'araignées et représentent ainsi la classe de toxines la plus vaste et la plus étudiée. Sur le site ArachnoServer version 3.0, on trouve à ce jour environ 1400 toxines appartenant à 97 espèces d'araignées différentes (Pineda et al., 2018). Ces toxines furent isolées du venin de nombreuses familles d'araignées, en particulier des deux principaux sous-ordres, Mygalomorphae (araignées « primitives ») et Araneomorphae (araignées « modernes »). Cette dernière classe d'araignées représente plus de 90% de toutes les espèces d'araignées confondues à travers le monde. Cependant, de par la taille importante de leurs glandes à venin mais également pour leur longévité (pouvant vivre plus de 25 ans), les mygalomorphes représentent une source de venin durable et facilement accessible. Au fur-et-à-mesure du temps et des avancées dans la recherche sur les venins d'araignées, dont

certaines contiendraient plus de 1000 peptides différents, il est devenu clair que ceux-ci présentaient une composition bien plus complexe que ce qui avait pu être imaginé auparavant (King, 2011). Ainsi, les venins d'araignées contiendraient plus de 10 millions de peptides bioactifs, mais seulement 0,01% de cette diversité peptidique a été exploré à ce jour (King et al., 2008a). En revanche, parmi l'ensemble de ces venins d'espèces d'araignées diverses, certains ont su dévoiler des toxines intéressantes par leur spécificité d'action sur les canaux ioniques et récepteurs membranaires d'invertébrés (King et al., 2008b). En effet, certaines toxines sélectives des insectes ont été criblées et brevetées pour leur possible application comme potentiels agents bioinsecticides (Herzig et al., 2011).

Exemples de toxines d'araignées spécifiques des invertébrés

Diverses toxines spécifiques des canaux ioniques d'insectes, notamment les canaux Cav et Nav , ont été mises en évidence à partir de venins d'araignées (King et al., 2008b). Parmi celles-ci, les ω -atracotoxines (ω -ATX, issues du venin d'araignée du genre *Atrax*) constituent une des rares familles de neurotoxines peptidiques sélectives des arthropodes, notamment les insectes. Ces toxines représentent une source intéressante pour la recherche de composés insecticides et biopesticides potentiels (Nicholson et al., 2006). En effet, ces toxines peptidiques ont montré une activité toxique sélective des insectes plutôt que des mammifères (Tedford et al., 2004). Dans ce sens, la toxine ω -Hexatoxin-Hv1a (ou ω -ATX-Hv1a), l'une des neurotoxines les plus puissantes, a été montrée comme ciblant spécifiquement les canaux de type calcique et potassique d'invertébrés (notamment $Cav1$ mais avec également une faible affinité pour $Cav2$) (Nakasu et al., 2014; Powell et al., 2020). Cette toxine de 37 acides aminés est hautement toxique pour de nombreux arthropodes et induit une paralysie irréversible précédant la mort, mais ne montre pas d'effet sur les canaux de vertébrés. Celle-ci représente à ce jour la seule toxine entrant dans la composition de produits insecticides, et est commercialisée par la société Vestaron sous les noms de Spear-T et Spear-Lep (<http://www.vestaron.com/spear-t-liquid-concentrate/>). Ces insecticides agissent sur les insectes nuisibles tout en montrant un excellent profil de survie pour les insectes pollinisateurs et bénéfiques. Il a également été récemment rapporté que cette toxine Hv1a montre des effets puissants en tant que modulateurs allostériques positifs des récepteurs nicotiques de l'ACh (nAChR) des insectes, conformément à leur toxicologie neuroexcitatrice (Chambers et al., 2019). Son homologue, ω -ATX-Hv2a (toxine de 42 à 45 résidus), inhibe les

courants calciques de type HVA, en agissant sur les canaux Ca_v2 , et représente le bloqueur le plus puissant des canaux Ca_v d'insectes. En effet, la plupart des toxines agissant sur les canaux calciques d'insectes a révélé plutôt une action au niveau des canaux Ca_v2 . Parmi les nombreuses toxines pouvant être citées, la toxine peptidique ω -Aga-IVA (Agatoxin-IV), issue du venin de l'araignée *Agelenopsis aperta*, a tout d'abord été décrite comme ciblant les canaux $Ca_v2.1$ de vertébrés. Mais des études montrent que le canal Ca_v2 d'insectes représentent le seul sous-type de canal chez l'insecte ayant un site de liaison pour cette toxine peptidique. En revanche, aucune toxine sélective des canaux calciques d'insectes de type Ca_v3 et Ca_v4 n'a été mise en évidence à ce jour.

Les peptides spécifiques des canaux Na_v sont fortement retrouvés dans les venins de cnidaires, mollusques et arachnides. Contrairement aux toxines précédemment citées agissant comme bloqueurs des canaux Ca_v par obstruction de celui-ci, les toxines ciblant les canaux Na_v peuvent agir de façon similaire, ou encore comme modulateurs du déclenchement de l'activité du canal ("gating modifier" en anglais). Ainsi, ces toxines sélectives des canaux Na_v d'insectes sont capables de lier spécifiquement trois des quatre sites de liaison connus aux neurotoxines peptidiques (sites 1, 3 et 4) au niveau du canal. Ce site de liaison au canal définit alors l'activité de la toxine. Les hainantoxines représentent une famille de toxines ayant 33 à 35 résidus acides aminés et trois ponts disulfures, trouvées au sein du venin d'araignées du genre *Ornithoctonus*. Parmi cette famille de toxines, la toxine HNTX-I agit comme bloqueur du canal $DmNa_v1$ de drosophile en se liant au site 1 du canal, et stabilise celui-ci dans un état fermé/inactivé inhibant ainsi la conductance Na^+ . Celle-ci ne montre en revanche aucun effet sur les autres types de canaux Na_v et Ca_v d'insectes. De nombreuses classes de toxines peptidiques lient le canal Na_v au niveau du site 3 induisant alors une inhibition ou un blocage de l'inactivation du canal. En se liant à ce site, ces toxines agissent donc comme modificateurs de déclenchement de l'inactivation du canal, en affectant le changement conformationnel de celui-ci associé à une rapide inactivation. Parmi celles-ci, la toxine Tx4(6-1), isolée du venin d'araignée *Phoneutria nigriventer* ne montre aucun effet sur les mammifères mais est létale pour une large variété d'insectes. Ce peptide de 48 acides aminés possédant cinq ponts disulfures prolonge la durée du potentiel d'action au niveau des axones par inhibition de l'inactivation du canal Na_v d'insectes. A l'inverse, les toxines se liant au niveau du site 4 du canal Na_v d'insectes agissent comme des modificateurs de déclenchement de l'activation. En effet, ces toxines induisent un déplacement dose-dépendant vers des potentiels plus négatifs

de l'activation du canal, amenant à une activité neuronale spontanée. Parmi les toxines d'araignées ayant une liaison au niveau du site 4 du canal Na_v , les μ -agatoxines induisent une paralysie convulsive chez l'insecte. Ces neurotoxines d'environ 36 à 37 résidus et contenant quatre ponts disulfures, sont issues du venin de l'araignée *Agelenopsis aperta* et sont associées à des inflammations répétitives au niveau des terminaisons des neurones moteurs, augmentant ainsi la probabilité que le canal soit à de l'état ouvert.

Ainsi, de par la capacité de certaines toxines peptidiques à être d'une haute sélectivité, les venins d'araignées représentent aujourd'hui l'une des sources de composés naturels les plus étudiée.

Araignées d'intérêt pour ce projet de thèse

Pour ce projet de thèse, nous avons choisis de concentrer notre étude sur quatre types de venins provenant chacun d'espèces d'araignées diverses (voir description dans le chapitre Matériels et Méthodes), récoltées dans la région de Montpellier (Hérault, 34). Deux de ces araignées (*Lycosa tarantula* et *Nemesia caementaria*) ont été choisis car des recherches sur le venin de ces espèces avaient déjà été entreprises. Pour les deux autres espèces d'araignées, *Thomisus onustus* et *Synema globosum*, celles-ci ont été alors choisies suites à des tests effectués au laboratoire, précédant le démarrage de cette thèse. Ces tests consistaient à analyser la survie des abeilles en fonction du temps, suite à une injection de venin brut de ces araignées et d'autres, au niveau de l'ocelle de l'insecte. Les venins de ces espèces d'araignées locales ont dès lors montré des résultats particulièrement intéressants sur la survie des abeilles (Figure 30).

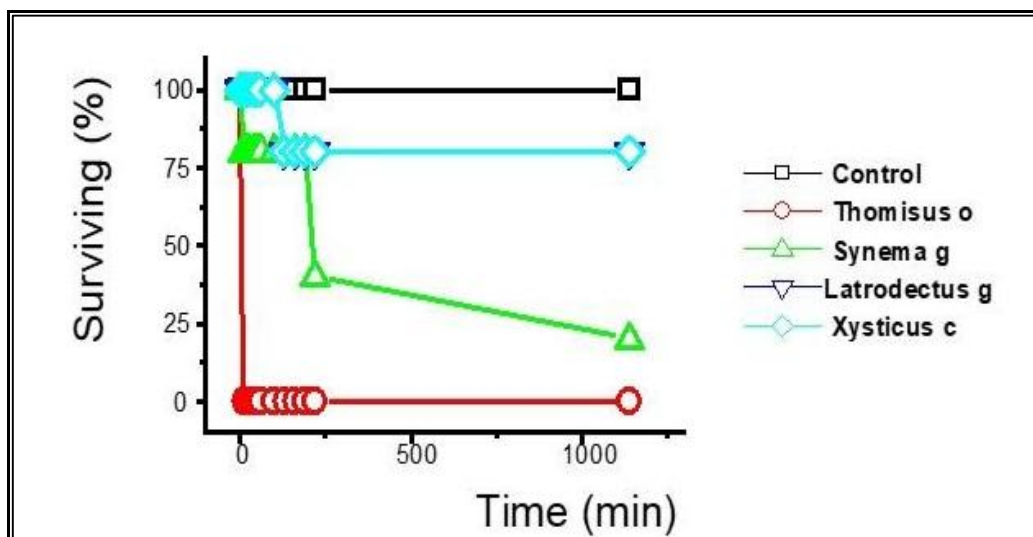


Figure 30 : Dendrogramme regroupant les effets des quatre venins d'araignées testés sur la survie des abeilles domestiques *Apis mellifera* (en pourcentage) en fonction du temps. Le contrôle négatif correspond à de l'eau. Résultats obtenus par le Dr Pierre Charnet, 2015 (IBMM, Montpellier).

Ainsi, les venins de deux araignées de la famille des Thomisidae (*Thomisus onustus* et *Synema globosum*) ont été discriminés et sélectionnés pour ce projet. En effet, ces venins montrant une action rapide voire immédiate sur la survie des abeilles, et semblent ainsi contenir des toxines spécifiques de ces insectes pollinisateurs.

Ce projet de thèse est ici porté sur la caractérisation des canaux ioniques d'abeille et insectes nuisibles, ainsi que sur l'étude de venins d'araignées dont les toxines pourraient être potentiellement sélectives de ces espèces nuisibles. Parmi ces araignées, deux montrent une préférence de proie pour les insectes pollinisateurs, *T. onustus* et *S. globosum*, permettant d'envisager la présence de toxines spécifiques des canaux ioniques et/ou récepteurs membranaires impliqué dans la neurobiologie de l'abeille. Les venins de *Lycosa* et *Nemesia*, araignées prédatrices de tous types d'insectes, ont été choisis afin de mettre en évidence les toxines ciblant les insectes nuisibles, par comparaison avec les toxines découvertes dans le venin d'araignées spécialistes des insectes pollinisateurs (Figure 31).

En particulier, ce travail détaillera ainsi la caractérisation de canaux ioniques d'insectes bénéfiques et nuisibles, ainsi que les divers tests engendrés afin de mettre en avant une pharmacologie complète, et discutera de la potentielle utilisation de nouveaux peptides naturels dans le développement d'insecticides plus sélectifs des insectes nuisibles. Enfin, cette

étude s'est spécifiquement porté sur les canaux calciques voltage-dépendants, ainsi que sur les récepteurs membranaires à l'ACh et GABA, d'insecte pollinisateur (abeille domestique *Apis mellifera*) et/ou insectes nuisibles (puceron *Acyrtosiphon pisum*, ravageurs des champs, et le varroa *Varroa Destructor*, ravageur des ruches par contamination des larves), dans le but d'obtenir un large panel de canaux étudiés chez des espèces diverses.

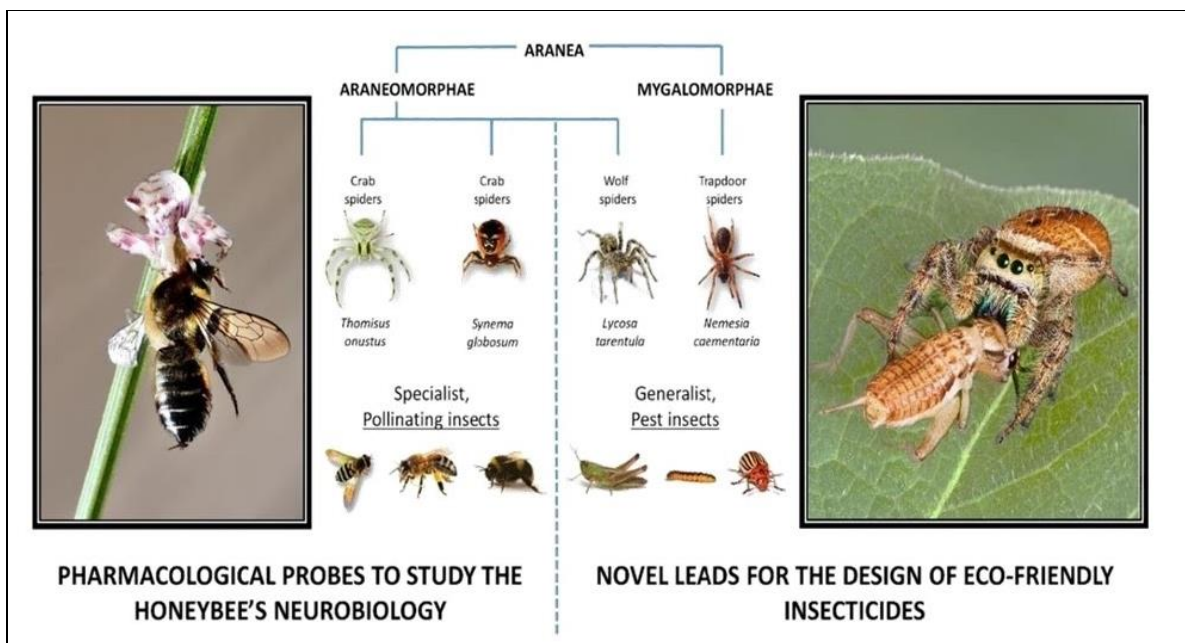


Figure 31 : Diversité des venins d'araignées. Les araignées et leur venin ont évolués depuis des millions d'années par la pression de sélection et certaines araignées, telles que les "araignées-crabes" montrent une spécificité envers les insectes pollinisateurs. Le venin des araignées plus généralistes en revanche fournira des outils pour de nouvelles molécules d'insecticides plus sélectives des insectes nuisibles, et respectueuses de l'environnement.

II. Objectifs du projet de thèse

L'ensemble des données bibliographiques de cette thèse a bien montré à la fois les problèmes de survie que connaissent les pollinisateurs (et en particulier l'abeille *Apis mellifera*), mais également le déclin de leur environnement proche tant en termes d'habitat, et d'approvisionnement en nourriture qu'en termes d'agressions chimiques par différents produits, et notamment les insecticides neurotoxiques. Les principales molécules impliquées dans ces agressions sont des classes d'insecticides qui touchent directement les canaux ioniques et récepteurs membranaires impliqués dans la transmission des messages nerveux et musculaires chez l'insecte, en particulier les néonicotinoïdes agonistes des récepteurs nicotiques, les phénylpyrazoles inhibant les récepteurs GABA, et les pyréthriinoïdes bloquant l'inactivation des canaux sodiques. La mise en relation de l'ensemble de ces données a également permis de montrer la nécessité de mieux comprendre le rôle de ces canaux ainsi que l'importance de définir de nouveaux modes d'évaluation de la toxicité de ces produits (autres que la DL50), afin de prendre en considération les effets délétères de l'exposition chronique à des doses sub-létales. Ceci devrait, à terme, permettre d'identifier de nouveaux produits potentiellement moins polluants de l'environnement et plus sélectifs des insectes ravageurs.

Mon travail de thèse consistait à mettre au point une technique de criblage nous permettant ainsi de tester l'activité de différents composés insecticides mais également de toxines animales issues principalement d'araignées, sur les canaux ioniques d'insectes avec un double but : (1) trouver des outils pharmacologiques nous permettant d'avancer dans l'analyse du rôle des différents canaux ioniques d'abeille dans la physiologie de cette insecte, et éventuellement (2) fournir des pistes pour la conception d'insecticides plus spécifiques des insectes ravageurs et moins polluants pour l'environnement que ceux actuellement trouvés sur le marché. Pour cela, l'abeille *Apis mellifera* avait été choisie comme modèle car :

- l'équipe du Dr Charnet était la seule à pouvoir disposer des cDNAs des grandes familles de canaux ciblées par les insecticides (canaux Na_v, GABAR et nAChR), et indispensables pour la transmission synaptique (constituant la cible principale des toxines et des insecticides neurotoxiques)

- l'équipe avait pour projet d'isoler la totalité des cDNA codant pour tous les canaux ioniques dans cette espèce, ce qui, avec les possibilités importantes d'études en expression hétérologue (TEVC sur ovocyte manuel et robotisé, et enregistrement en canal unitaire) constituait une situation unique et extrêmement favorable à l'identification de nouvelles toxines
- le Dr Dutertre avait identifié localement plusieurs araignées prédatrices des hyménoptères dont le venin n'avait pas été analysé, mais devait certainement contenir des toxines inhibant ces canaux ioniques
- l'équipe était également en collaboration avec d'autres laboratoires (Gif-sur-Yvette, Avignon) spécialisés dans les études comportementales *in-vivo* en condition de laboratoire ou de plein champs
- Enfin, l'abeille représente un modèle emblématique chez les insectes et l'analyse des effets des insecticides chez cette espèce au niveau moléculaire aura des conséquences importantes, non seulement en recherche fondamentale mais aussi en recherche appliquée toxicologique ou environnementale.

La démarche choisie était d'utiliser les cDNA codant pour les différents canaux ioniques d'abeille isolés au laboratoire, en s'intéressant principalement, dans un premier temps, à ceux s'exprimant le mieux en système hétérologue, afin de pouvoir identifier rapidement les conditions expérimentales les plus propices à l'utilisation du robot Hi-Clamp (voir chapitre Matériels et Méthodes -Hi-Clamp-) comme outil de crible.

Étaient disponibles à mon arrivée : (1) sept gènes (trois sous-unités $\alpha 1$ et quatre sous-unités auxiliaires) codants pour les sous-unités des canaux calciques Cav1, Cav2 et Cav3, (2) deux gènes de canaux identifiés comme sodique Nav1 et ASC1 (renommé au cours de ma thèse Cav4) et leur quatre sous-unités régulatrices, (3) les 11 gènes des récepteurs nicotiniques, (4) les gènes des récepteurs GABA d'abeille (trois gènes), de varroa (sept gènes) et de puceron (un gène), et enfin (5) les gènes des canaux HCN. Par ailleurs, l'identification d'autres gènes (récepteurs RCPG, canaux potassiques, autres LGIC) étaient alors en cours.

Dans ce cadre, et afin d'apporter des données à cette double demande, mon projet de thèse a porté sur des essais d'identification et d'isolation de nouvelles toxines animales, plus sélectives de canaux ioniques particuliers. Celui-ci comporte ainsi quatre axes principaux :

1. Caractérisation des canaux ioniques. Les gènes de nombreux canaux ioniques (abeille, puceron, varroa) ont été isolés au laboratoire. Il s'agissait pour moi d'aider à leur caractérisation rapide *in-vitro* (par expression dans l'ovocyte de xénope), afin de pouvoir s'en servir comme sondes dans la recherche de toxines spécifiques.
2. Mettre au point une méthode de crible pour permettre l'identification fonctionnelle de ces « bonnes » toxines par une approche d'électrophysiologie utilisant le robot Hi-Clamp® de Multichannel System. Ce criblage à bas débit mais semi-automatique permettant le repérage de molécules candidates, a permis de valider ensuite par des enregistrements manuels (poste de patch-clamp conventionnel) sur cellules d'abeille en culture.
3. Isolation et caractérisation de nouvelles toxines. A partir d'un nombre restreint d'araignées, connues comme prédatrices des hyménoptères, il s'agissait alors d'isoler puis fractionner leur venin (mélange naturel de nombreuses toxines), vérifier leur toxicité sur des abeilles *in vivo*, et par des approches de transcriptomique et de protéomique, identifier, par homologie de structure avec des toxines d'activité connue, les toxines potentiellement actives sur les canaux Na⁺, Ca²⁺ ou les récepteurs membranaires nicotiniques ACh ou GABA.
4. Enfin, mettre en évidence le rôle de ces canaux ioniques. Ainsi, à partir de ces sondes identifiées, cribler leur spécificité sur les autres canaux de la même espèce (pour les valider comme outils pharmacologiques afin d'analyser le rôle des différents canaux dans la physiologie de l'abeille) et sur les mêmes canaux d'espèces différentes (en tant que présélection pour des insecticides spécifiques).

III. Matériels & Méthodes

a. Electrophysiologie

Afin de pouvoir étudier les courants transitant par les diverses sous-unités de canaux ioniques d'insectes, la technique de double électrode et voltage imposé (TEVC) est la plus adaptée à l'électrophysiologie sur ovocyte de Xénope (système d'expression hétérologue couramment utilisé en recherche).

1. Le xénope *Xenopus laevis*

Le xénope *Xenopus laevis* (Image 1) est une espèce d'amphibien appartenant à la famille des Pipidae. Surnommée également « grenouille du Cap », celle-ci est totalement aquatique mais aérobic. Ces animaux, mesurant environ 15 cm de longueur en moyenne, montrent une coloration de la peau pouvant être particulièrement variable d'un individu à l'autre.



Image 1 : Xénope *Xenopus laevis* femelle adulte.

Les femelles xénopes (de provenance française : Centre de Ressources Biologiques Xénopes (CRB), Rennes) sont gardées en stabulation au sein de l'animalerie du CRBM (UMR 52337, Montpellier). Les xénopes sont réparties dans des bacs d'eau et entretenues par les animaliers. La température (20°C) et l'éclairage de la pièce sont réglés par minuterie afin

d'assurer une photopériode de 12 heures jour et 12 heures nuit, respectant le cycle normal de ces animaux. Les xénopes sont nourries deux fois par semaine avec des granulés pour poisson ou de petits vers rouges. Une fois par semaine, une xénope est prélevée du bac réservé à l'équipe afin d'être opérée.

2. Les ovocytes de xénope

Sur les xénopes, les ovocytes (Image 2) sont obtenus à partir des sacs (ou lobes) ovariens. Les ovaires sont tous constitués de 24 sacs et représentent 15% du poids total de la femelle lors de la reproduction (Lofts, 1975). Chacun des sacs ovariens possède des ovocytes par centaines, présentant les différents stades de développement.

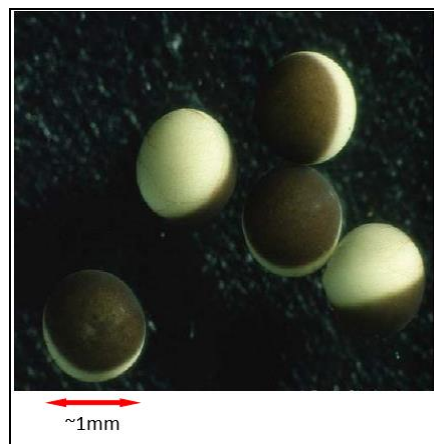


Image 2 : Ovocytes de xénope non-fécondés observés sous loupe binoculaire.

Pour les injections d'ARN (voir description paragraphe 4), seuls les ovocytes de stade V et VI ont été sélectionnés. Ces ovocytes présentent une taille allant de 1 à 1,3 mm de diamètre, et possèdent deux pôles : animal de couleur brune, et végétal (ou végétatif) très peu coloré. Les ovocytes de stade VI présentent également un anneau non pigmenté entre les deux hémisphères, appelé aussi bande ou ceinture équatoriale (Rasar and Hammes, 2006). Au niveau des sacs ovariens, chacun des ovocytes présente une couche de cellules aplaties l'entourant, nommées cellules folliculaires. Cette couche permet notamment de protéger individuellement chaque ovocyte de son environnement.

Depuis les années 1970, les ovocytes de xénope sont reconnus comme modèle d'étude et sont particulièrement exploités comme système d'expression hétérologue. En effet, c'est en 1971 qu'est mis en évidence l'aptitude d'une protéine à être synthétisée au sein d'un ovocyte, après injection de son ARNm (Gurdon et al., 1971). Mais il faudra patienter encore une dizaine d'années afin que l'expression de canaux ioniques au sein des ovocytes de xénope débute (Miledi, 1982; Miledi et al., 1982a, 1982b). Cette technique est alors rapidement devenue une méthode classique pour les analyses électrophysiologiques de canaux ioniques, récepteurs membranaires et autres transporteurs (Bianchi and Driscoll, 2006). Les études sur ovocytes de xénope présentent en effet plusieurs avantages. D'un point de vue technique, les femelles xénopes peuvent être maintenues aisément en captivité, et leurs œufs sont à la fois faciles à extraire mais également à micro-injecter, de par leur taille. Les ovocytes extraient et non-injectés peuvent être maintenus dans une solution physiologique adaptée et survivre plusieurs jours. Enfin, d'un point de vue électrophysiologique, l'avantage majeur de travailler sur ovocyte est la capacité de ceux-ci à exprimer de manière forte les protéines dont les ARNm ont été injectés, combiné à une quasi-absence de canaux et récepteurs endogènes (Bianchi and Driscoll, 2006; Buckingham et al., 2006; Dascal, 1987; Goldin, 1991; Snutch, 1988).

3. Extraction des ovocytes de xénope

Chaque début de semaine, une femelle xénope est prélevée dans le bac réservé à l'équipe contenant les xénopes. La femelle est alors anesthésiée par immersion dans un bain de MS-222 (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt) à 0.2% (Sigma, Laverpilliere, France), assurant également le rôle d'analgésique. Une fois anesthésié, l'animal est alors placé décubitus dorsal et maintenu sur un lit de glace, durant la chirurgie. Une première incision de la peau d'environ 1 cm est réalisée au niveau du flanc de la xénope (laparotomie), suivie d'une seconde incision du tissu musculaire sous-jacent. Les sacs ovariens sont alors aisément visibles à ce niveau. Ceux-ci sont extraits minutieusement en utilisant des pinces et sont alors placés dans une solution OR2 constituée de 82,5 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, et de 5 mM d'HEPES (pH = 7,2 ajusté par NaOH 1N) (voir Tableau 10). Deux points chirurgicaux serrés sont effectués au niveau du tissu musculaire, puis deux autres au niveau de la peau de la xénope, avec du fil de suture résorbable (fil polyamide monofilament, 4/0 monté sur aiguille courbe 20mm 3/8, Filapeau, Peters Surgical, USA). Fait intéressant, la peau de l'animal sécrète

naturellement des petits peptides ayant une activité antimicrobienne (Soravia et al., 1988), aucun antibiotique n'est donc nécessaire, et la xénope est simplement placée dans un récipient d'eau jusqu'à son réveil. Les sacs ovariens extraits sont dilacérés à l'aide de pinces, puis rincés deux à trois fois avec la solution OR2. Les ovocytes sont alors séparés de leur couche de cellules folliculaires par un traitement à la collagénase IA (1 mg/ml) en milieu OR2 (étape de « défollicularisation » enzymatique) durant environ deux heures, sous agitation légère. Ces cellules représentent une barrière mécanique et une complication physiologique (Kusano et al., 1982). Cette étape est donc d'une grande importance et permet une plus grande facilité d'injection ainsi qu'une meilleure perfusion des ovocytes. Après environ deux heures, l'incubation en collagénase est arrêtée. Les ovocytes sont rincés plusieurs fois avec la solution OR2 puis avec le milieu de survie NDS (pour ND96-Survie) composée de 96 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, 5 mM d'HEPES, 2,5 mM de Pyruvate, et enfin 50 µg/ml de gentamycine (pH = 7,2 ajusté avec du NaOH 1N) (voir Tableau 10). Enfin, les ovocytes sont placés au sein d'une boîte de Pétri dans cette solution NDS, et triés sous loupe binoculaire (Stemi 2000, ZEISS) de façon manuelle avant injection. Cette solution NDS de survie est renouvelée chaque jour. Les ovocytes n'ayant pas été sélectionnés pour l'injection peuvent ainsi être maintenus au sein d'un incubateur à 18°C (LIEBHERR, France) dans cette solution NDS et sous légère agitation.

4. Synthèse et purification des ARN

Les ARN des différentes sous-unités à étudier sont préparés selon quatre étapes successives à partir de leur plasmide. La première étape de linéarisation de plasmide consiste en une digestion enzymatique du plasmide sur un site choisi en aval de la séquence codante grâce à une enzyme de restriction appropriée. Le mélange réactionnel est le suivant :

Plasmide codant pour la sous-unité	20 µg
Tampon 10x	5 µl
Enzyme de restriction choisi (20 U/ml)	3 µl
H ₂ O qsp	50 µl

Cette réaction est alors incubée durant 2 heures environ, à 37°C. La purification du plasmide digéré est réalisée grâce au kit PCR CleanUp (ThermoFisherScientific) en suivant les instructions fournies, et repris pour avoir une concentration finale estimée de 0,5 µg/µl. L'ADN est alors quantifié par fluorescence à l'aide du NanoDrop (Nanophotometer N60, Implen), et si besoin, la concentration est rectifiée à 0,5 µg/µl. La synthèse de l'ARN est alors réalisée. Le milieu réactionnel est préparé dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, selon les instructions du kit PureLink RNA Mini kit (ThermoFischerScientific) :

Plasmide digéré	2 µg/ 4 µl
dNTP (2x)	12,5 µl
Tampon 10x	2,5 µl
Polymérase T7 ou SP6	2 µl
H ₂ O qsp 25 µl	4 µl

Le tube est alors vortexé quelques secondes, puis centrifugé et placé dans un bain-marie à 37°C durant 3 heures. L'ARN est alors purifié à l'aide du kit RNA CleanUp (ThermoFisherScientific), en suivant les instructions du constructeur, quantifié à une spectrofluorométrie à l'aide du Nano-Drop (Nanophotometer N60, Implen). La concentration finale est ajustée à 1 µg/µl avec de l'eau traitée RNase-free.

5. Injection des ovocytes

Afin de réaliser les injections d'ARN au sein des ovocytes, des capillaires en verre borosilicate (GC150T-15, 1.5mm O. D. x 1.17mm I. D., HARVARD Apparatus) sont employés. Ceux-ci sont étirés grâce à une étireuse verticale (MODEL P-30, Sutter Instrument. Co., USA) dont les paramètres d'étirement ont été préalablement définis afin d'obtenir une pointe fine. Les injections d'ARN sont ensuite effectuées grâce à un micro-injecteur pneumatique conçu au laboratoire. Les ARN des différentes sous-unités constitutives d'un canal (Cavα1.2 + Cavβ2 + Cavα2δ1 par exemple) sont mélangés dans un rapport 1 : 1 : 1 (Tableau 9). Un microlitre de ce

mélange d'ARN est d'abord placé dans une boîte de Pétri et aspiré par la pointe de la micropipette connectée au microinjecteur (en position aspiration).

Espèce	Famille	Canal/sous-unité	Sélectionné
Abeille	Ca _v	Ca _v 3	Non (peu exprimés <i>in-vivo</i>)
		Ca _v 4	Oui
	GABA	RDL	Oui
		GRD / LCCH3 RDL-LCCH3 RDL-GRD	Non (rôle physiologique incertain)
	nAChR	$\alpha_2\beta_m / \alpha_7\beta_m$ $\alpha_3/\alpha_5/\alpha_7 + RIC3$	Non (mauvaise expression)
Puceron	GABA	RDL	Oui
Varroa	GABA	RDL1	Oui
		RDL2 / RDL3	Non (mauvaise expression)
Mammifères	Ca _v	BI-1- $\alpha_2\delta_1$ - β_{2a} (2.1) BII-1- $\alpha_2\delta_1$ - β_{2a} (2.3) BIII- $\alpha_2\delta_1$ - β_{2a} (2.2)	Oui
	Na _v	PVA2580 (1.2)	Non (faible expression)
Zebrafish	nAChR	$\alpha\beta\gamma\delta$ $\alpha\beta\gamma\epsilon$	Oui (pour collaborations)

Tableau 9 : Ensemble des ARN testés par la technique de patch-clamp dans des ovocytes de xénope.

Les 40 ovocytes d'un lot recevant le même mélange d'ARN sont placés dans une boîte de Pétri de 50mm sous loupe binoculaire, et injectés individuellement avec 25 nl (pression d'injection à 1 bar, et durée d'injection de 150 - 300 msec), soit 25 ng d'ARN. Les ovocytes sont alors placés en boîte de Pétri sous légère agitation à 19 degrés durant 24 à 72 heures, en fonction de la vitesse d'expression des différentes sous-unités déterminée préalablement (canaux K⁺ ou GABAR : 24 heures, Ca_v : 48 à 72 heures). Le milieu NDS est renouvelé quotidiennement.

6. Le voltage imposé en double microélectrodes

La taille des ovocytes et l'amplitude des courants qui y sont exprimés requièrent des conditions et une technique d'enregistrement particulières : le voltage imposé à deux microélectrodes, ou TEVC (pour Two electrodes voltage-clamp, en anglais). Comme son nom l'indique, cette technique électrophysiologique, mise au point en 1982 par le Dr Barnard *et al.*, met en action deux microélectrodes (Barnard *et al.*, 1982). Une première électrode (E1) permet de mesurer le potentiel de membrane de l'ovocyte par rapport au potentiel de la cuve, mesuré par une électrode de référence. Une seconde électrode (E2) permet d'injecter un courant de manière à maintenir le potentiel de l'ovocyte au potentiel de commande (choisi par l'utilisateur). Le courant injecté ne transitant donc pas par l'électrode servant à mesurer le potentiel (contrairement au *whole-cell clamp*), les erreurs de mesure du potentiel dues au passage du courant dans cette électrode sont donc nulles. L'amplificateur utilisé pour le TEVC est un GeneClamp500 (Axon Instrument). Les électrodes ont été étirées sur une étireuse programmable MODEL P-97 (Sutter Instrument. Co., USA), à partir de verre borosilicate GC-150T-15 (Harvard Apparatus), avant d'être remplies d'une solution KCl 3M. D'un point de vue pratique, les enregistrements de courant sont effectués au sein d'une cage de Faraday afin d'éviter tous « bruits » extérieurs pouvant modifier et perturber les enregistrements. L'ovocyte est alors placé au sein d'une cuve perfusée de manière continue par la solution d'enregistrement : milieu BANT10 pour les canaux calciques, et ND-Herg pour les canaux potassiques ou sodiques. Le milieu BANT10 est préparé à partir de 10 mM de BaOH, 12 ml de TEAOH 20%, 30 mM de NMDG, 2 mM de CsOH, et 10 mM d'HEPES (pH à 7.2 en utilisant du méthane sulfonate), tandis que la solution ND-Herg est composé de 96 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 0,5 mM de CaCl₂, et 5 mM d'HEPES (pH ajusté à 7,4 par du NaOH 1N) (voir Tableau 10). Une « reprise » de milieu est placée en bout de cuve grâce à un système d'aspiration relié à une pompe (KNF Laboport, Bioblock Scientific). La cuve est reliée à l'amplificateur par une électrode de référence constituée de tube capillaire GC-150F-10 (Harvard Apparatus) rempli d'Agar 2% dans du KCl 3M (pont Agar). Les électrodes (remplies de KCl 3M) sont alors placées dans le bain et leur résistance mesurée (entre 0,2 et 1-2 MΩ). Les potentiels de jonctions présents entre les têtes de l'amplificateur, les filaments d'Ag-Cl, les solutions KCl 3M, le bain et l'électrode de référence sont à ce moment annulés. Ceux-ci sont en général de l'ordre de quelques mV. Les deux électrodes sont ensuite empalées au sein de l'ovocyte, et le potentiel de membrane mesuré (généralement, -20/-30 mV, mais cela est

également fonction de l'ARN injecté ainsi que du milieu de perfusion). Le potentiel de l'ovocyte est à ce moment fixé à la valeur du potentiel choisi : c'est le passage en voltage imposé (ou *voltage-clamp*, en anglais). Différents protocoles, programmés au préalable, peuvent alors être appliqués grâce au logiciel pClamp 7.1 (Axon Instrument, Foster City, USA), connecté à l'amplificateur à l'aide d'un convertisseur analogique-numérique Digidata 1200 (Molecular Devices). Ce logiciel permet non seulement de stimuler l'ovocyte, mais également d'enregistrer les courants obtenus.

(en mM)	BaOH	TEAOH (20%)	NMDG	CsOH	HEPES	MgCl2	NaCl	KCl	CaCl2	pH
Bant10	10	12 (ml)	30	2	10					7.2
OR2					5	2	82.5	2		7.2
NDS					5	2	96	2	2	7.2
ND-Herg					5	2	96	3	0.5	7.4

Tableau 10 : Ensemble des compositions des différentes solutions (en mM) utilisées pour les tests d'électrophysiologie.

7. Protocoles de stimulation

Différents protocoles ont été mis au point afin de caractériser biophysiquement et pharmacologiquement les canaux dépendants du voltage ou d'un ligand.

A. Canaux dépendants du voltage

i. Conditions expérimentales et solutions

Canaux calciques

Le BAPTA (pour *1,2-Bis(o-aminophenoxy)éthane-N,N,N',N'-tétracetic acid*, en anglais) est un agent de chélation fortement sélectif pour les ions Ca^{2+} , composé de 100 mM d'acide BAPTA-free (Sigma), 10 mM de CsOH, et 10 mM d'HEPES (pH = 7.2). Celui-ci est utilisé pour contrôler les niveaux de Ca^{2+} intracellulaire, et dans notre étude, afin d'inhiber les autres courants activés par le Ca^{2+} lors de l'enregistrement des courants calciques. Le BAPTA est injecté en cours d'enregistrement au moyen d'une troisième microélectrode, façonnée de manière

identique aux autres électrodes, et connectée à un microinjecteur similaire à celui des ARN (20 nl injectés, -soit une concentration d'environ 5 mM finale au sein de l'ovocyte-, pression et temps d'injection identiques). Pour les canaux calciques, la solution d'enregistrement correspond au Bant10 (Tableau 10).

Canaux sodiques

Pour ces canaux, les conditions expérimentales sont identiques à celles mises en place pour l'enregistrement des courants calciques. En revanche ici, l'utilisation de BAPTA est inappropriée et la solution d'enregistrement correspond à du ND-Herg (Tableau 10).

ii. Protocoles

Ca-test

Les courants macroscopiques sont enregistrés sous voltage-clamp à deux électrodes en utilisant un amplificateur GeneClamp 500 (Axon Instruments, Union City, CA). Les électrodes de courant et voltage sont remplies d'une solution de KCl 3M. Les courants Ca^{2+} sont enregistrés durant des tests d'impulsions de 100 msec (Ca_v3) ou 400 msec (autres canaux), par incréments de +10 mV, allant d'un potentiel de -110 mV à +30 mV (Ca_v3) ou de -80 mV à +70 mV (autres canaux), séparés par des intervalles de 10 secondes, durant lesquels les ovocytes sont maintenus à un potentiel de -80 mV. L'amplitude du courant est mesurée au pic du courant. Les courants enregistrés sont filtrés (500 Hz) et numérisés (2 kHz) en utilisant une interface Digidata-1200 (Axon Instruments). Ceux-ci sont stockés sur ordinateur personnel grâce au logiciel pClamp version 7.1, et leur analyse est permise grâce à la version 10. La courbe I-V enregistrée pour chaque ovocyte a été normalisée par rapport à son pic maximal. Enfin, les relations courant-voltage normalisées ont été faites selon une distribution de Boltzmann rectifiée en utilisant l'équation suivante :

$$I/I_{max} = g^*(V - E_{rev}) / (1 + \exp((V - V_{act})/k_a)),$$

où I est l'amplitude de courant mesurée durant les étapes de voltage variant de -80 à +60 mV, I_{max} est l'amplitude du pic de courant mesurée au minimum de la courbe courant-voltage, g représente la conductance normalisée, V la valeur de voltage, E_{rev} le potentiel d'inversion de courant, V_{act} est le potentiel de demi-activation, et k_a représente le facteur de pente.

Ces tests ont été réalisés sur n ovocytes et la moyenne de ces courbes I-V normalisées point à point a été réalisée.

Ca-inac

Le potentiel de repos choisi est de -100 mV, potentiel auquel tous les canaux sont à l'état de repos. Les courants de Ca²⁺ sont déclenchés selon un protocole de double pulse, par des successions d'étapes de dépolarisation d'une durée de 2,5 secondes, allant d'un potentiel de membrane de -80 mV à +30 mV avec des incréments de +10 mV. La dépolarisation test est à une valeur de -30 mV (Ca_v3) ou +10 mV (autres canaux) et une durée de 100 msec (Ca_v3) ou 400 msec (autres canaux). Les courants enregistrés sont alors filtrés et numérisés, puis stockés sur ordinateur personnel grâce au logiciel pClamp version 7.1. Le logiciel pClamp version 10 permet alors l'analyse de ces courants, en mesurant le pic de courant, le temps au pic, ainsi que la constante de temps d'inactivation de ces courants enregistrés en fonction du voltage (Figure 32). Enfin, l'équation permettant d'ajuster la courbe d'inactivation est :

$$I/I_{\max} = R + (1 - R) / (1 + \exp((V - V_{\text{inac}})/k_i)),$$

où I est l'amplitude de courant mesurée durant un test pulse à +10 mV pour les étapes de voltage variant de -80 à +60 mV, I_{max} est l'amplitude de courant enregistré après un pré-pulse conditionnant à -80 mV, V représente le voltage, R la proportion de courant non-activée, V_{inac} est le potentiel de demi-inactivation, et k_i le facteur de pente.

L'ensemble des données est présenté dans ce manuscrit par la moyenne ± l'écart-type.

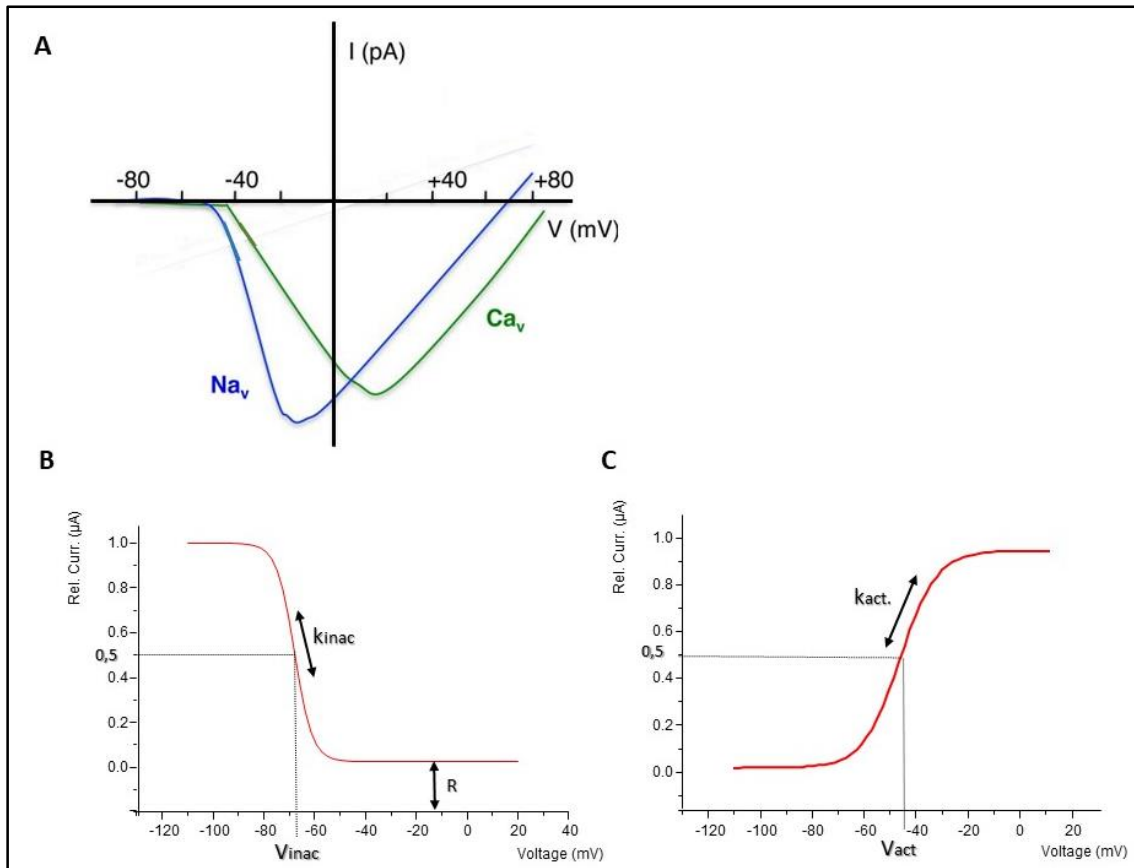


Figure 32 : Illustrations de la relation courant-voltage pour les canaux Ca_v et Na_v, et des courbes d'activation et d'inactivation. (A) Relation courant-voltage (I-V) pour les canaux Ca_v et Na_v. Des impulsions dépolarisantes (400 msec) à -80 mV sont suivies d'impulsions test, allant de -100 mV jusqu'à +30 mV par incréments de +10 mV. Les pics de courants sont normalisés en fonction du courant de pic d'une impulsion test, et tracés en fonction du potentiel. (B) Courbe d'inactivation du courant de canal Ca²⁺ dépendant du voltage. Celle-ci permet de déterminer le potentiel de demi-inactivation (V_{inac}), la pente (k_{inac}), ainsi que la fraction de canaux non-activée (R). (C) Courbe d'activation du courant calcique de canal Ca²⁺ dépendant du voltage. Celle-ci permet de déterminer le potentiel de demi-activation (V_{act}) et le facteur de pente (k_{act}).

Les divers venins et toxines ayant pu être testés durant ce projet ont été dilués avec de l'eau distillée (en fonction de leurs concentrations mesurés), et stockés à -80 degrés au sein de l'institut. Enfin, les concentrations finales souhaitées ont été faites dans du Bant10 (Tableau 10) juste avant l'expérience. Afin d'analyser l'effet des venins, les ovocytes exprimant les canaux calciques sont tout d'abord enregistrés à l'aide du protocole Ca-test, en étant perfusés par du Bant10 (Figure 33). La perfusion est alors arrêtée, et on vérifie alors que les courants ne subissent aucun « run-down ». Après une à deux minutes (environ 4-8 stimulations), 30 μL (correspondant au volume de la partie de la cuve contenant l'ovocyte) de solution Bant10 contenant les toxines ou venin à la concentration voulues sont ajoutés au bain à l'aide d'une micropipette. 15-30 stimulations sont ensuite enregistrées, en perfusion toujours arrêtée.

Eventuellement la perfusion de Bant10 peut être remise en route pour assister à la réversibilité d'un effet. Les effets sont analysés à l'aide d'un graphique montrant l'amplitude du pic du courant (et éventuellement ses cinétiques d'inactivation) en fonction du temps, avant, pendant et après l'ajout de toxine ou venin. L'effet est quantifié en pourcentage d'inhibition/d'augmentation du courant Ca^{2+} enregistré à l'équilibre.

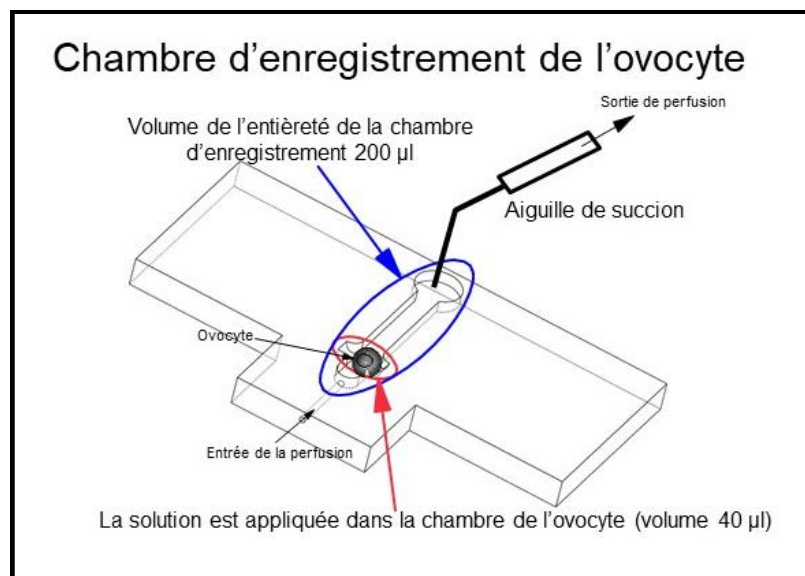


Figure 33 : Schéma de la chambre d'enregistrement de l'ovocyte, sur un poste d'électrophysiologie classique. En bleu est montré l'entièreté de la chambre d'enregistrement (200 µl), et en rouge, la chambre où est disposé l'ovocyte à enregistrer.

B. Canaux dépendants d'un ligand

i. Conditions expérimentales et solutions

Les récepteurs analysés se sont exprimés en général seulement 24 heures après injection des ovocytes. Pour ces récepteurs dépendants d'un ligand, la solution d'enregistrement est le ND-Herg (Tableau 10). Les agonistes et les antagonistes sont dilués dans du ND Herg à partir de solutions stock soit dans l'eau soit dans du DMSO (Tableau 11). Deux moyens d'application ont été choisis, soit, pour les molécules/toxines peu onéreuses ou facilement disponibles, par perfusion à partir de notre système semi-automatique, soit, pour les molécules/toxines rares, par « puff », c'est-à-dire par application à la pipette directement dans le bain, d'un volume

donné de solution diluée, perfusion arrêtée. Le volume est en générale de 30 μl , correspondant au volume de la partie de la cuve contenant l'ovocyte. Pour une même molécule, les réponses enregistrées par l'une ou l'autre des méthodes sont identiques (Figure 34).

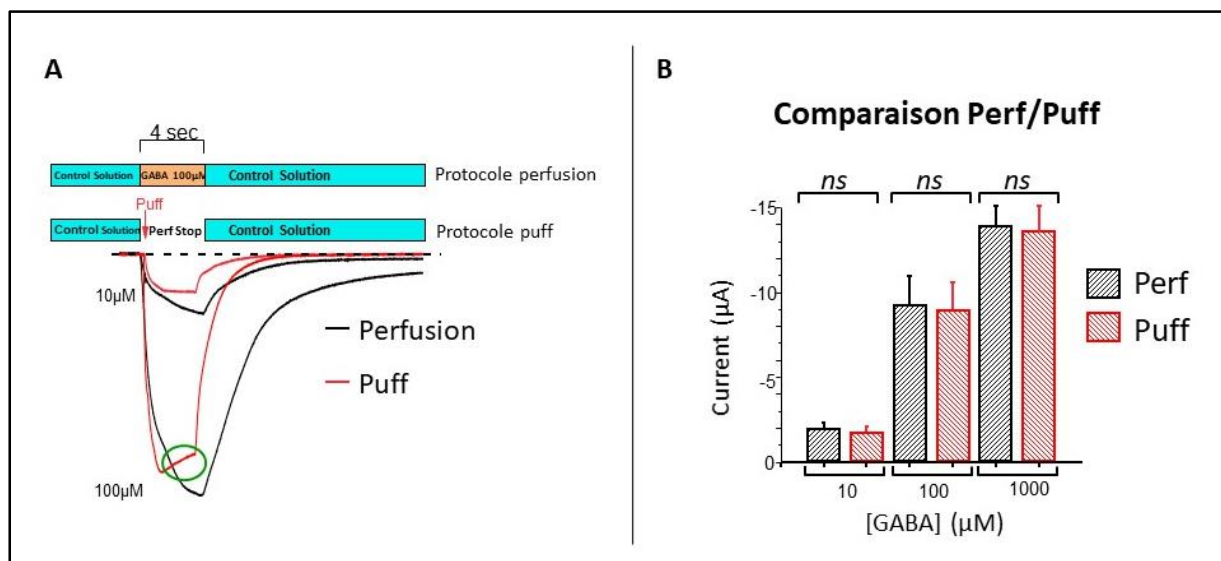


Figure 34 : Représentation de l'application de composé par perfusion ou puff sur le courant de canaux dépendants d'un ligand. (A) Courbes de courant obtenues par application de GABA à 10 ou 100 μM , par perfusion (courbes noires) ou puff (courbes rouges). Les protocoles appliqués sont détaillés au-dessus selon le type d'application. (B) Histogramme de comparaison entre les techniques de perfusion ou puff, par application de GABA à 10, 100 ou 1000 μM . Les résultats ne montrent aucune différence significative entre les deux types d'application.

ii. Courbes dose-effet

Les ovocytes sont « clampés » à -60 mV, et des solutions de GABA ou ACh (Tableau 11) sont diluées à 100 μM dans une solution ND-Herg (Tableau 10) afin de déclencher l'ouverture de ces canaux. Différentes concentrations de solutions GABA ou ACh sont également préparées (en présence de ND-Herg) afin d'obtenir l' EC_{50} de ces récepteurs (exemple Figure 35). Des solutions insecticides, fipronil et la picrotoxine (Tableau 11) sont également préparées à diverses concentrations dans du ND-Herg afin d'obtenir l' IC_{50} de ces récepteurs, en présence de 100 μM d'agoniste. La solution ND-Herg traverse la cuve d'enregistrement à une vitesse d'environ 1 ml/min.

Molécule	Solution stock	Diluant
GABA	500 mM	H ₂ O
ACh	1 M	H ₂ O
Fipronil	200 mM	DMSO
Picrotoxine	10 mM	DMSO

Tableau 11 : Ensemble des solutions stock des molécules utilisées sur les canaux dépendants d'un ligand, lors des tests électrophysiologiques.

Les amplitudes de pic de courant sont obtenues en fonction de ces diverses concentrations de GABA, ou ACh, testées. Les courbes d'inhibition au fipronil ou à la picrotoxine sont obtenues par inhibition de la réponse en courant du récepteur testé. La normalisation de ces courbes est alors déduite par rapport à une valeur de référence définie (réponse induite par le GABA ou l'ACh, en l'absence d'inhibiteur). Le logiciel Origin 6.0 (Microcal Software) permet d'ajuster les courbes et de déterminer l'EC₅₀, l'IC₅₀, ainsi que le coefficient de Hill (n_H), selon l'équation :

$$Y = A1 + [(A1 - A2) / (1 + 10^{\log(x0-x)p})].$$

L'EC₅₀ (pour *Half-maximal Effective Concentration*, en anglais) peut être définie comme la concentration requise pour obtenir 50% de réponse. L'IC₅₀ (pour *Half-maximal Inhibition Concentration*, en anglais) correspond à la concentration d'un composé nécessaire afin d'induire 50% d'inhibition. Le coefficient de Hill correspond au degré de coopérativité du ligand au niveau de la fixation. Ainsi, si n_H est supérieur à 1, on parlera de coopérativité positive, et de coopérativité négative si n_H est inférieur à 1. Dans le cas où n_H serait égale à 1, il y aura absence de coopérativité et l'inhibition sera compétitive. Les données obtenues sont présentées sous forme de moyenne +/- S.E de n ovocytes.

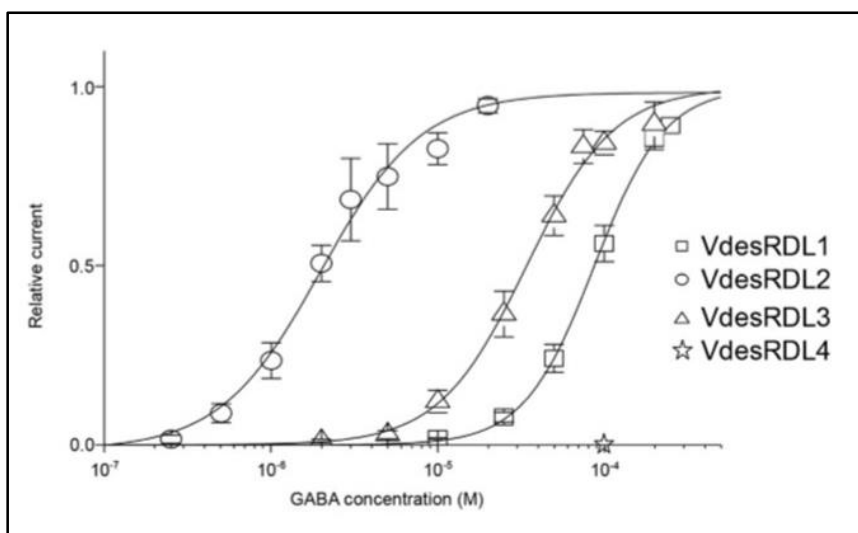


Figure 35 : Exemple de courbes dose-effet obtenues par concentrations croissantes de GABA, sur les sous-unités RDL1, RDL2 et RDL3, ainsi que la sous-unité GRD-LCCH3, du récepteur GABA de *Varroa destructor*. Pour chacune des sous-unités testées, l' EC_{50} et le nombre de Hill (n_H) sont déterminés respectivement à : 92 ± 10 et $2,3 \pm 0,1$ pour VdRDL1 (carré), $2,4 \pm 0,3$ et $2,5 \pm 0,1$ pour VdRDL2 (rond), 37 ± 4 et $2,5 \pm 0,3$ pour VdRDL3 (triangle), et enfin 35 ± 4 et $2,5 \pm 0,3$ pour la sous-unité GRD-LCCH3 (étoile).

Tiré de (Ménard et al., 2018).

Sur la totalité des ovocytes injectés durant cette thèse, beaucoup ne présentaient pas de courants exploitables, c'est-à-dire compris entre 0,5 et 5 μ A. En effet, dans certains cas, la quantité d'ARN injecté ou le temps d'incubation fut trop important, amenant à des courants d'amplitude supérieure à 10 μ A. Ces courants particulièrement importants étaient difficilement « clampés » et souvent inexploitables. A l'inverse, dans d'autres cas, les courants enregistrés étaient bien trop faibles (50 nA à 0,3 μ A) pour pouvoir être exploités.

b. HiClamp

Le nombre et la faible disponibilité des venins que nous avons prévus d'analyser en début de projet, ainsi que les prévisions de crible à plus grande échelle envisagés, nous ont poussés à essayer une méthode de criblage électrophysiologique automatisée. Le robot HiClamp® (MultiChannelSystem) (Image 3), fonctionnant à partir de deux plaques de 96 puits, l'une pour

les ovocytes et l'autre pour les solutions, et offrant la possibilité d'utiliser plusieurs fois le même puit de solution et de récupérer son contenu en fin d'expérimentation, nous a paru tout à fait adapté à cette problématique de thèse. Ce robot est en effet capable de manipuler les ovocytes de la plaque « alimentation », les empaler avec les deux électrodes nécessaires au TEVC, puis les déplacer, dans cette configuration, de puits en puits (thermostatés et agités au moyen de micro-barreaux aimantés, figure 4B) dans la plaque « composés » ou dans la rigole centrale pouvant être perfusée avec quatre solutions différentes. L'ensemble de ces opérations sont programmables à l'aide d'un logiciel tournant sous Windows, gérant les différents protocoles et différents lots d'ovocytes injectés avec des ARN différents, les différentes solutions, les différents protocoles expérimentaux, ainsi que les données obtenues au fur et à mesure de leur acquisition.

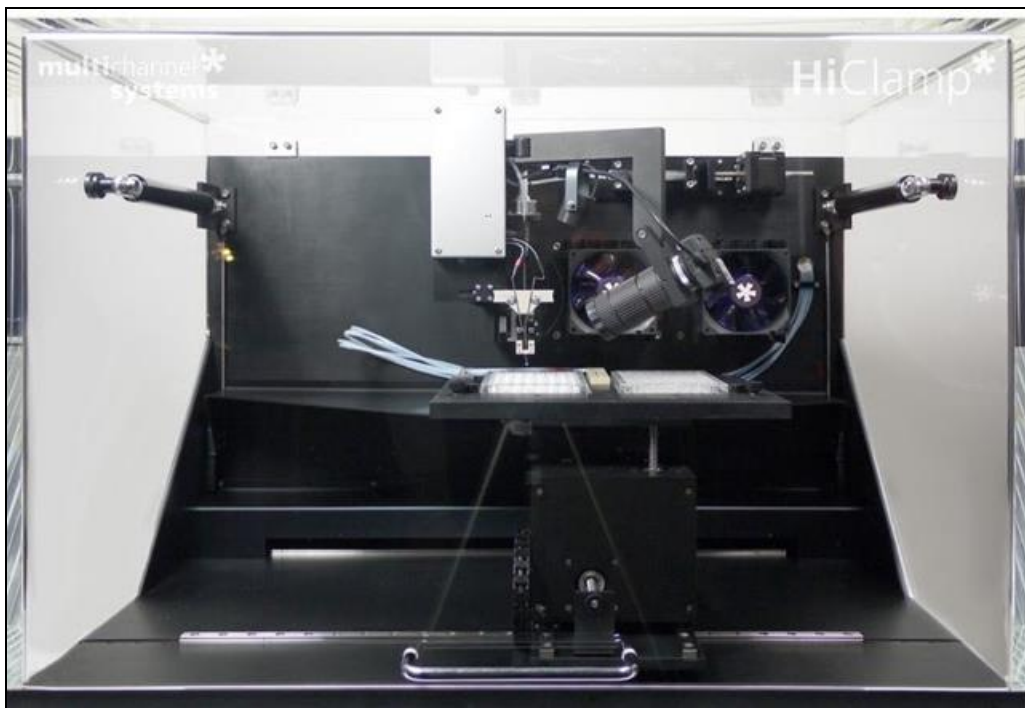


Image 3 : Robot HiClamp® (MultiChannelSystem)

1. Caractéristiques

Le HiClamp® (MultiChannelSystem) fonctionne sur la base de l'électrophysiologie classique en double électrode avec voltage imposé et est doté d'un amplificateur numérique (ClampAmpC) à haute performance permettant d'enregistrer des courants pouvant aller jusqu'à 105 μA , et ce de façon totalement automatisée. Deux des caractéristiques principales de ce robot résident dans la possibilité de travailler avec de petits volumes d'échantillons (environ 160 μL /puit d'une plaque de 96 puits) et d'être non-destructif ou dégradant pour les composés utilisés. Ces deux caractéristiques ont été des points clefs pour notre travail sur les venins et toxines d'araignées où les volumes disponibles sont souvent très faibles (quelques microlitres).

2. Fonctionnement

Le fonctionnement du robot HiClamp® permet de déplacer directement l'ovocyte, alors en cours d'enregistrement d'un puit à un autre, soit d'une solution à une autre. Les plaques 96 puits utilisées sont standards, d'un volume de 0,3 mL en présence de l'agitateur (ThermoScientific) (Image 4.B). Les ovocytes enregistrés sont replacés en fin d'expérience au sein de leur puit d'origine, au sein de la plaque dite « plaque d'alimentation » (Image 4.A). Le principe de fonctionnement du robot est schématisé figure 36. Une caméra, focalisée sur l'ovocyte, permet de suivre les différentes opérations effectuées par le HiClamp®. Enfin, les électrodes sont identiques à celles utilisées pour l'enregistrement manuel (voir plus haut), et présentent une résistance de 0.2 M Ω .

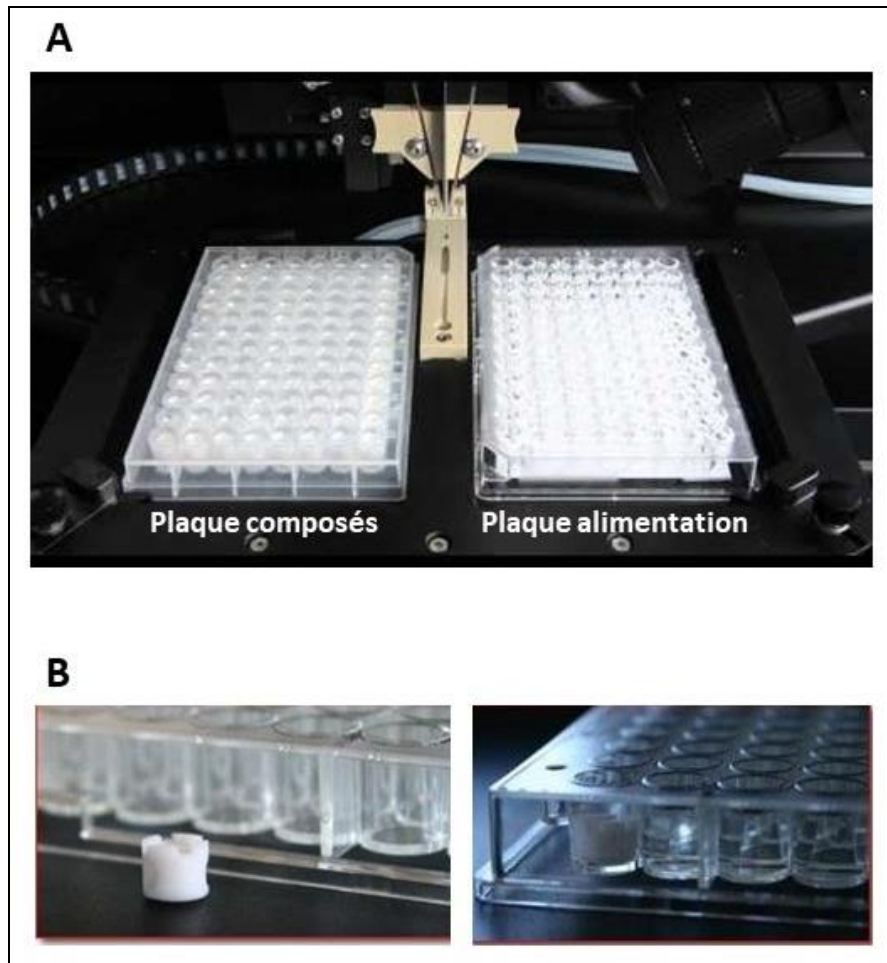


Image 4 : Robot HiClamp®. (A) Photo personnelle montrant le plateau (élément central du robot HiClamp) contenant une plaque d'alimentation contenant les ovocytes injectés avec l'ARN d'intérêt, et une seconde plaque de composés contenant les différentes solutions à tester. Entre ces deux plaques, se situe la station de lavage alimenté en continu par du milieu physiologique. Le plateau est capable de se déplacer dans les directions X, Y et Z. (B) Photos personnelles montrant un micro-agitateur en dehors et au sein d'un puits. Celui-ci permet d'homogénéiser les solutions au sein des puits, mais également de réduire le volume de solutions au sein des puits.

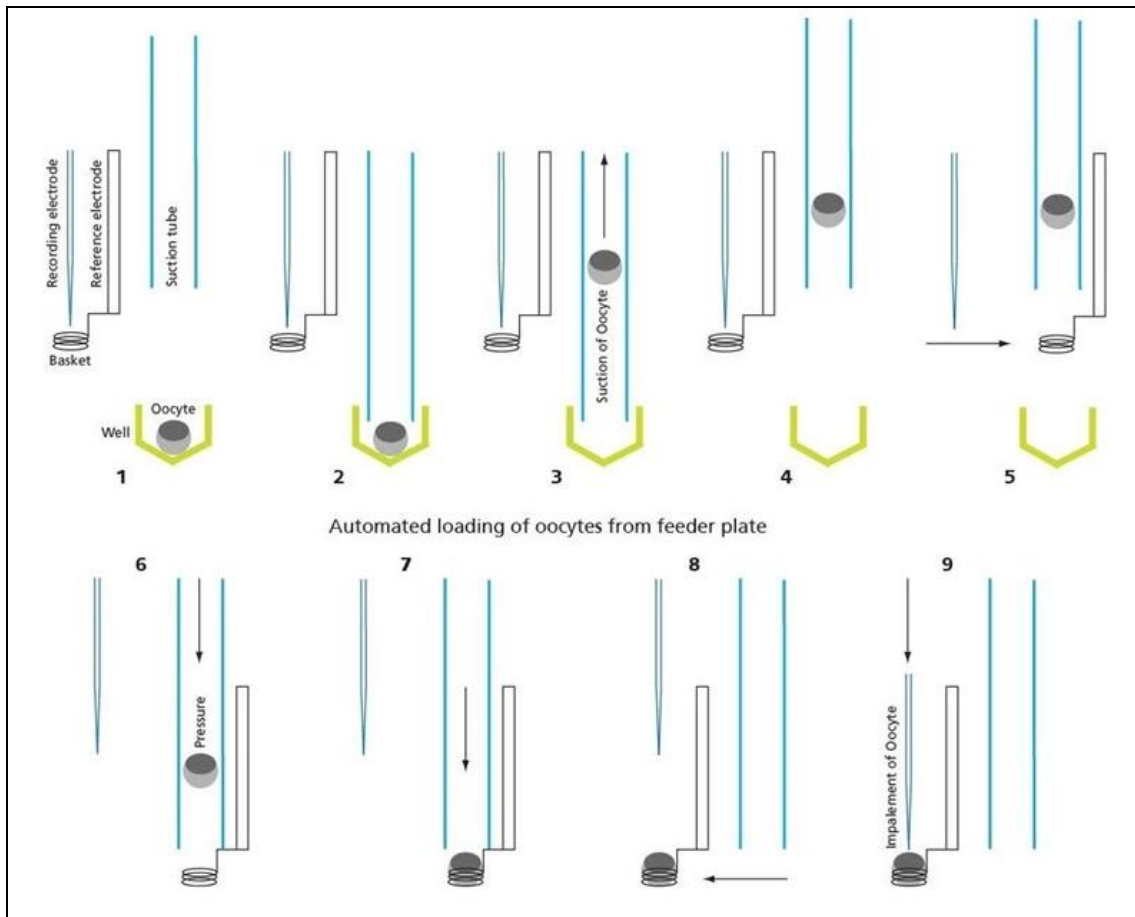


Figure 36 : Récapitulatif des différentes étapes de sélection de l'ovocyte lors du fonctionnement du HiClamp®.

1. Etat OFF. L'ovocyte injecté avec l'ARN d'intérêt se trouve au sein du puit de la plaque alimentation. Les deux électrodes d'enregistrement sont mises en place.
2. Etat ON. Le plateau contenant les plaques alimentation et de composés se déplace. Le tube aspirant descend alors au sein du puit préalablement défini, contenant l'ovocyte.
3. L'ovocyte injecté est aspiré au sein du tube.
4. Le tube aspirant remonte alors à sa position initiale.
5. Le panier se déplace alors sur l'axe des X, jusqu'à être sous le tube.
6. Le tube descend alors à nouveau au niveau du panier, et une légère pression est alors appliquée au sein du tube.
7. L'ovocyte est alors relargué au sein du panier.
8. Le panier se déplace alors jusqu'à sa position initiale.
9. A ce niveau, les électrodes (contrôlées par l'utilisateur) descendent alors vers l'ovocyte afin d'empaler celui-ci et permettre l'enregistrement des courants. Si l'ovocyte répond alors correctement (amplitude du courant correct et peu de fuite de courant) celui-ci est alors sélectionné automatiquement pour la suite du protocole.

La programmation consiste en une séquence basée sur une succession d'icônes permettant d'effectuer les opérations souhaitées. Chaque icône correspond à une procédure donnée. Par exemple, l'icône correspondant à la table des ovocytes permet d'intégrer le type d'ARN injecté au sein des ovocytes, le nombre d'ovocytes disponibles, la localisation de ceux-ci, etc. Une autre icône correspondant à l'amplificateur stockera diverses informations, telles que le gain d'amplification, les conditions du filtre, les réglages de la tension, etc. Enfin, après avoir défini

la séquence souhaitée, mais aussi le voltage imposé, le filtre de sélection, entre autres, le protocole d'enregistrement s'exécute automatiquement et se poursuit jusqu'à la fin du programme ou par interruption voulue par l'utilisateur.

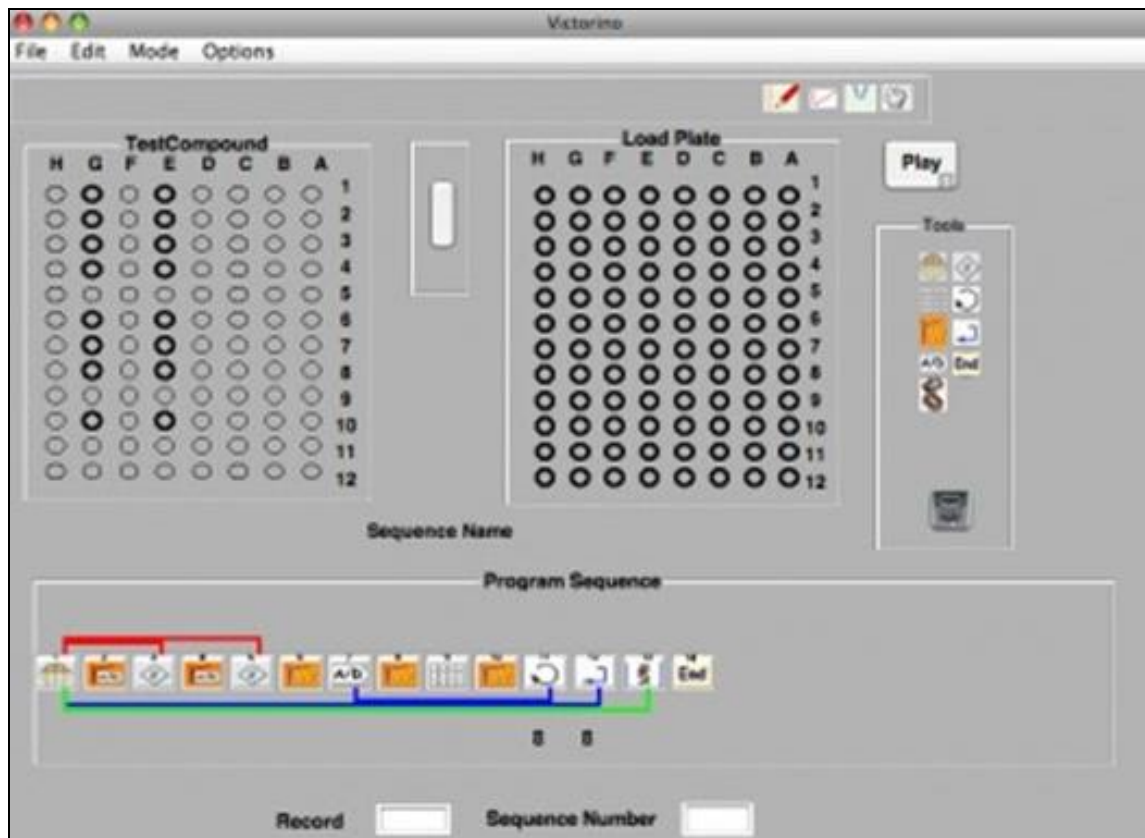


Image 5 : Exemple de page lors de la sélection des icônes pour la programmation, nécessaire sur le logiciel HiClamp®. A droite sont situées les diverses icônes dont chacune correspond à une action définie. Sont représentés également les plaques (alimentation et composés) avec en gras les puits sélectionnés. En bas de la page se situe la séquence sélectionnée par l'utilisateur.

3. Protocoles d'enregistrement

Deux types de protocoles d'enregistrement ont été mis au point en fonction du type d'enregistrement souhaité : canaux dépendants du voltage, nécessitant des dépolarisations, ou canaux dépendants d'un ligand. Il est rapidement apparu que bien que le HiClamp® puisse théoriquement être capable d'enregistrer des canaux calciques dépendant du voltage, deux écueils majeurs rendaient son utilisation problématique.

Tout d'abord, il n'est pas possible d'injecter du BAPTA dans les ovocytes à enregistrer : ni en ligne, comme effectué sur le poste manuel, ni avant les enregistrements. En effet, le BAPTA résidant alors trop longtemps dans les ovocytes avant les enregistrements impactait de façon importante la durée de vie des ovocytes injectés (la durée nécessaire pour enregistrer une plaque 96 puits est de plusieurs heures). Ensuite, dans des conditions très favorables, en absence de BAPTA et en solution BaCl10 (impossibilité de mettre des ponts agar, les solutions sans chlore sont donc à proscrire), les enregistrements montrent que lors du passage d'un ovocyte de la rigole centrale, perfusée avec du BaCl10, à un puit de la plaque « composés », contenant la même solution, il y a apparition d'un artefact sous la forme d'une réduction de l'amplitude du courant enregistré, qui disparaît quand on revient au puit central (voir figure 37). Nous ne connaissons pas la raison de cet artefact qui est indépendant d'une différence de température entre le puit et la rigole centrale.

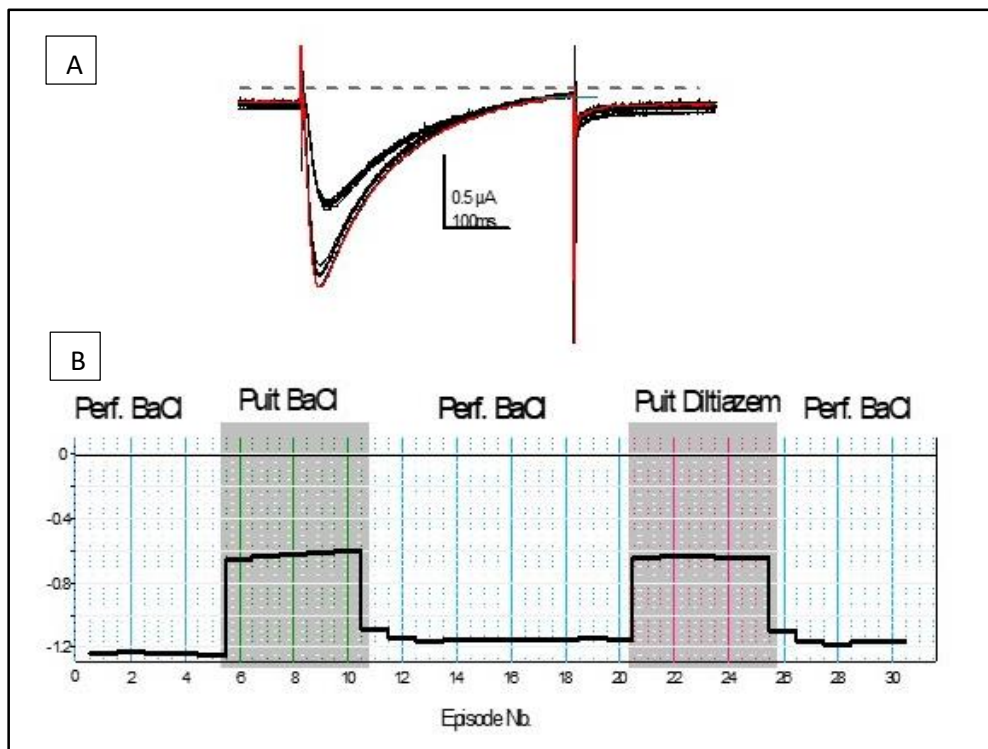


Figure 37 : Mise en évidence de l'artefact sur le robot HiClamp® lors des enregistrements sur les canaux calciques dépendants du voltage. (A) Mise en évidence sur le courant du canal calcique dépendant du voltage Cav4 d'abeille *Apis mellifera*. (B) Séquence observable sur le robot suite à l'enregistrement, et mettant en évidence l'apparition de l'artefact sur les canaux dépendants du voltage, lorsque l'on passe de la rigole centrale (perf BaCl) à un puit connectant la même solution (puit BaCl).

Il convient de noter ici qu'au sein de la rigole centrale l'ovocyte est perfusé en continu, tandis que dans les puits la solution est agitée par un agitateur magnétique (Image 4.B). Nous ne savons en revanche pas si cette différence est responsable de l'artefact enregistré.

A cause de ces deux problèmes nous avons préférés ne pas utiliser le HiClamp® pour l'enregistrement des courants de type calciques.

A. Récepteurs dépendants d'un ligand

Suite à la dissociation mécanique, les ovocytes sont injectés manuellement avec la sous-unité RDL d'abeille domestique *Apis mellifera*, de puceron *Acyrtosyphon pisum* ou de varroa *Varroa destructor* (sous-unité RDL1) à raison d'environ 30 nL par ovocytes, à l'aide d'un système de micro-injection automatique. Les ovocytes sont alors maintenus dans une solution NDS avant analyse, puis incubés dans du ND-Herg (Tableau 10) au sein de la « plaque d'alimentation ». Cette solution ND-Herg correspond également à la solution externe de lavage lors de l'enregistrement des courants sur le robot HiClamp®. Un à deux jours après injection, une solution GABA à 100 µM est préparée juste avant les enregistrements dans du ND-Herg afin d'activer ces récepteurs dépendants d'un ligand. L'acquisition s'effectue à un potentiel de membrane de -60 mV. La courbe dose-effet est obtenue par la mesure des courants enregistrés lors de la perfusion, durant 10 secondes, de doses croissantes de GABA (0.01, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 et 100 µM). Les courbes d'inhibition sont obtenues lors de la perfusion de doses croissantes de composés insecticides fipronil et picrotoxine (0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 10 et 100 µM) en présence d'une concentration de GABA à 100 µM. Pour ces deux composés, aucune pré-incubation n'a été réalisée.

Nous avons enfin vérifié que les courbes doses-effets obtenues avec le HiClamp® sont identiques à celles obtenues sur le poste manuel conventionnel (Figure 38).

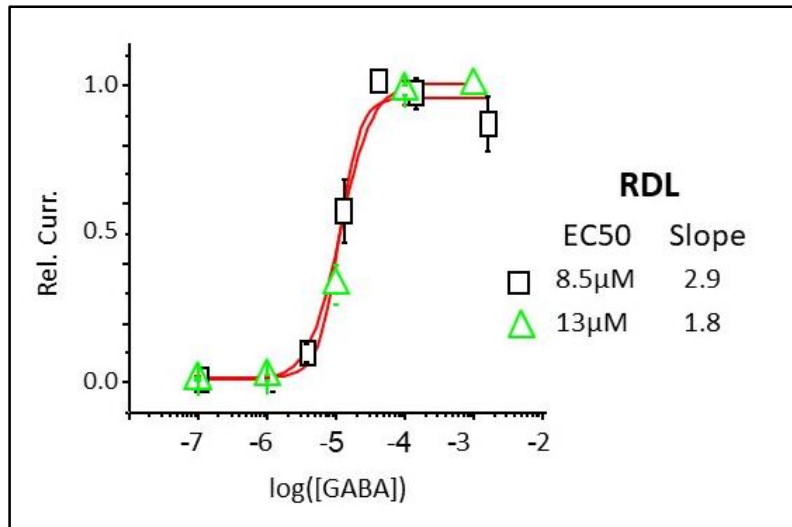


Figure 38 : Courbes doses-réponses au GABA pour les sous-unités RDL d'abeille domestique *Apis mellifera*, déterminées par le système HiClamp (carré noir) ou par approche conventionnelle (triangle vert).

4. Analyse des données

Après avoir effectué les enregistrements, les données obtenues sont analysées avec le programme DataMining. Ces données sont classées sous forme de dossiers organisés par année, mois et jour d'enregistrement. Chaque dossier contient plusieurs fichiers *.mat et *.seq, correspondant chacun à l'activation d'une séquence de lecture. Ainsi, le fichier *.mat contient la séquence de programme utilisée, tandis que *.seq contient l'ensemble de la séquence d'évènements enregistrés durant l'expérience (Image 6). Le programme DataMining permet de mesurer les amplitudes de courants dans les différentes conditions. Ces données sont ensuite analysées à l'aide des programmes Excel et Origin 6.0, suivant la méthode décrite plus haut.

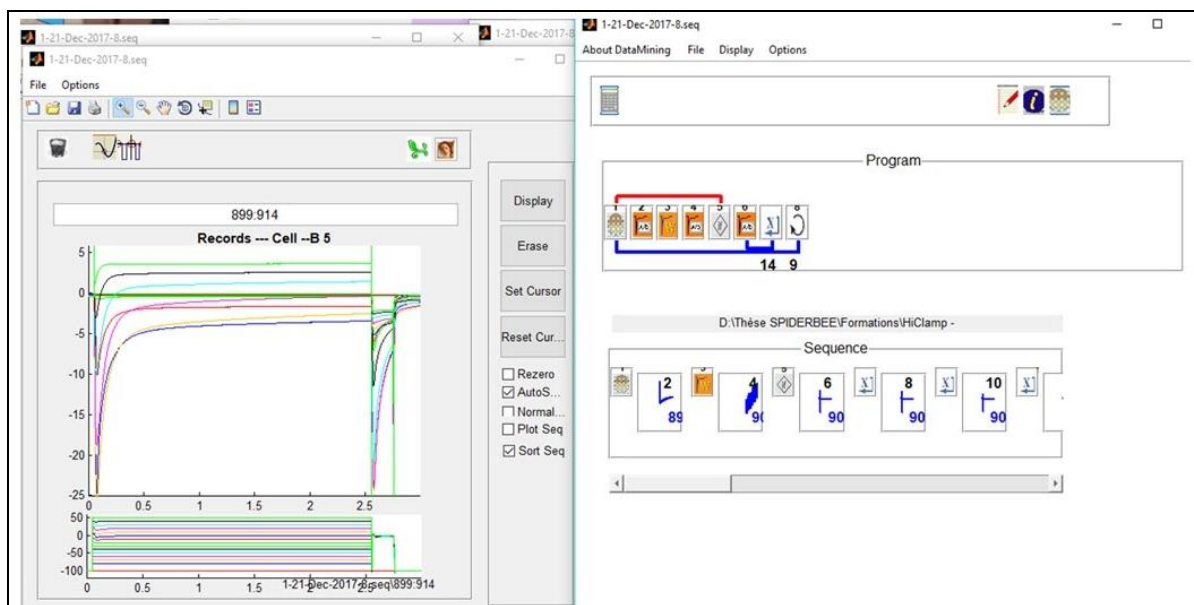


Image 6 : Exemple de page sur le HiClamp® pour analyse des données obtenues. A gauche, un premier écran permet de visualiser le courant obtenu et sélectionner le mode d'affichage. A droite, un second écran permet de sélectionner une icône et observer les évènements enregistrés à ce niveau de l'analyse.

c. Araignées et venins

Les venins de quatre espèces d'araignées ont été sélectionnés et étudiés dans le but de caractériser des toxines peptidiques potentiellement utilisables pour analyser les courants ioniques chez l'abeille. L'originalité de ce projet résidait dans l'analyse de venins d'araignées n'ayant jamais été étudiés auparavant, et à partir d'araignées d'origine locale, provenant toutes de la région de l'Hérault (34), autour de Montpellier. Ces araignées ont été sélectionnées en fonction de leur régime alimentaire, toutes étant à des degrés divers, prédatrices des hyménoptères.

1. Sélection des araignées

Divers tests sur la survie des abeilles injectées du venin de ces quatre araignées (précédents ce projet) ont été réalisés et ont permis de confirmer l'intérêt de ces araignées pour ce projet de thèse (Figure 33).

L'étude s'est ainsi porté sur les venins de deux types d'araignées :

- « Spécialistes », se nourrissant exclusivement d'insectes pollinisateurs, avec deux espèces, *Thomisus onustus* et *Synema globosum* (Image 7) de la famille des Thomisidae (sous-ordre : Araneomorphae), appelées plus communément araignées-crabes.



Image 7 : Images d'araignées de la famille des Thomisidae (« araignées crabes »). (A) Image d'une *Synema globosum*. (B) Photo d'une *Thomisus onustus* dans son milieu naturel, en train de dévorer un insecte.

Ces petites araignées (entre 2 et 10 mm selon le sexe), très communes, montrent une répartition largement répandue à travers le monde en particulier dans les régions méridionales. Celles-ci se retrouvent aisément dans les fleurs où leur pouvoir de mimétisme (grâce à leur couleur) leur permet de se confondre et ainsi attraper leur proie parmi les insectes pollinisateurs.

- « Généralistes », montrant un appétit pour tous les types d'insectes. La *Lycosa tarantula*, aussi appelée araignée-loup, de la famille des Lycosidae (sous-ordre : Araneomorphae), et la *Nemesia caementaria* appartenant à la famille des Nemesiidae (sous-ordre : Mygalomorphae) (Image 8).

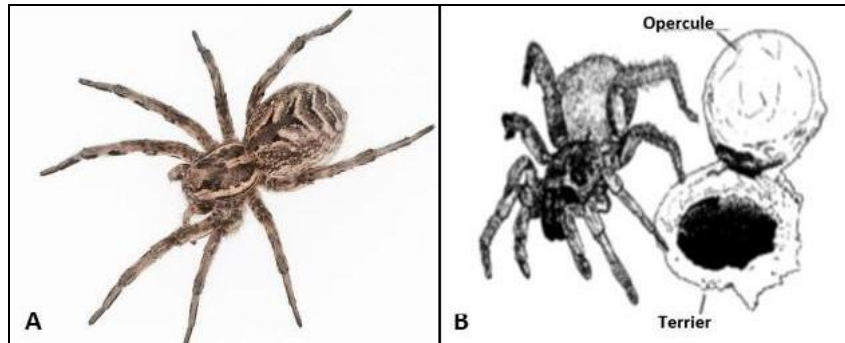


Image 8 : Images d'araignées de la famille des Lycose (« araignées loups »). (A) Image d'une *Lycosa tarantula*. (B) Dessin d'une *Nemesia caementaria* et de son habitat (terrier à même le sol, refermé par son opercule).

Ces espèces présentent une taille plus importante que leurs cousines, avec un diamètre allant de 12 à 20 mm selon le sexe chez les *Nemesia*, et jusqu'à 30 mm pour les Lycose. Toutes deux forment des terriers cylindriques dans le sol, refermé d'un opercule de soie et terre, leur permettant de s'y dissimuler et attraper une proie s'y approchant. Les araignées ont alors été isolées individuellement dans des petites boîtes, puis maintenues au laboratoire, à température ambiante (Image 9). Les araignées ont été abreuvées et nourries deux fois par semaine avec des vers de farine trouvés dans le commerce.



Image 9 : Exemple de maintien des araignées de manière individualisées dans les boîtes. Ici, *Lycosa tarantula* avec deux mâles et dix femelles. (Photo personnelle prise au laboratoire).

2. Extraction du venin

Afin de collecter le venin de ces spécimens, deux méthodes ont été utilisées. Premièrement, une « stimulation manuelle » a été appliquée, similaire à celle décrite par Liu *et al.* (J. Venom. Anim. & Toxins incl. Trop. Dis., 2009), où chaque araignée est présentée avec un morceau de tube souple (0,5 cm de diamètre) et agacée avec des pincettes pour déclencher une morsure (Liu et al., 2009). Les gouttes de venin déposées sur le tube sont alors récupérées à l'aide d'une pipette et diluées dans de l'eau distillée. L'électrostimulation a également été réalisée sur plusieurs échantillons à l'aide d'un extracteur de venin électrique basé sur la carte Arduino® Mega 2560, spécialement conçu pour l'extraction de venin d'arthropodes et d'autres animaux de petite taille (Besson et al., 2016). Les araignées ne sont pas nourries pendant au moins une semaine avant la séance de traite, et sont anesthésiées avant l'extraction (2 minutes au congélateur ou traités pendant 5 minutes avec 5% de CO₂). Les chélicères sont stimulés par des impulsions électriques (3 à 7 V et environ 0,5 à 2 A), déchargées en 2 secondes de "temps de travail" et 2 secondes de "temps de repos". Le venin libéré est alors recueilli au sein d'un cône (Image 10) et transféré dans un microtube de 1,5 ml contenant environ 20 µl d'eau distillée. Les tubes sont annotés avec le nom et le sexe de l'araignée, ainsi que la date d'extraction. La concentration en protéines des échantillons de venin a été évaluée à l'aide d'un nanophotomètre N60 (Implen GmbH, München, Allemagne). Le venin prélevé sur des araignées individuelles a été regroupé, lyophilisé et stocké à -20°C pour une utilisation ultérieure (caractérisation protéomique et électrophysiologie).

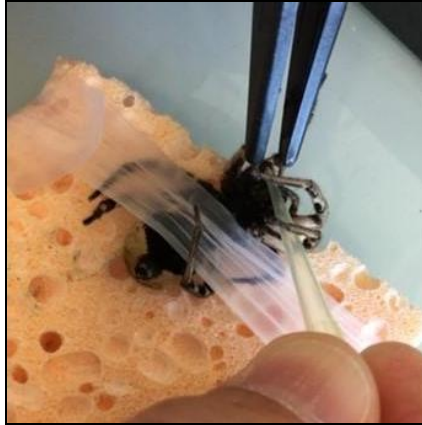


Image 10 : Photo personnelle prise lors d'une extraction électrique de venin sur *Lycosa tarantula*, maintenue par du parafilm sur une éponge de ménage. Le venin est collecté au sein d'un cône 100 μ L sur à une décharge électrique.

3. Extraction ARNm

Afin d'obtenir la quantité d'ARNm requise pour le séquençage *Illumina*, les glandes à venin de X araignées anesthésiées sont disséquées sur un lit de glace, puis placées dans un tube à microcentrifugeuse de 1,5 ml contenant 500 μ L de tampon de lyse. L'ARNm est ensuite extrait à l'aide d'un kit d'extraction (kit d'isolement d'ARNm magnétique, Biolabs) en suivant les instructions du fabricant. Après extraction, la concentration en ARNm a été mesurée à l'aide d'un nanophotomètre N60 (Implen GmbH, München, Allemagne) (voir chapitre Résultats – Tableau 16-).

d. HPLC

La technique HPLC (pour *high performance liquid chromatography*, en anglais) utilise un instrument Dionex U3000 (ThermoScientific), dans le but de séparer les constituants des divers venins étudiés. Les venins bruts sont injectés tels quels, ou dilués avec une solution H₂O + 0,1% d'acide formique, fonction des quantités de venins obtenues lors de l'extraction. Cette solution H₂O + 0,1% d'acide formique permet également d'obtenir le blanc de l'HPLC (contrôle). Le volume d'injection de venin au sein de l'HPLC est de 75 μ L. La séparation est réalisée en utilisant une colonne Synchronis C18 250 x 4,6 mm (ThermoScientific), opérée à un

débit de 1 ml/min. La phase mobile est représentée par l'eau (solvant A) et l'acétonitrile (solvant B), contenant tous deux 0,1% d'acide formique (v/v). Le gradient d'élution débuta alors avec 0% de B suivi d'une augmentation linéaire jusqu'à 80% pendant 60 min, augmentant jusqu'à 100% en 5 min, pour enfin revenir à l'état initial en 10 min. L'absorbance UV était comprise entre 214 et 280 nm. En sortie d'HPLC, des chromatogrammes sont alors obtenus (exemple Figure 39).

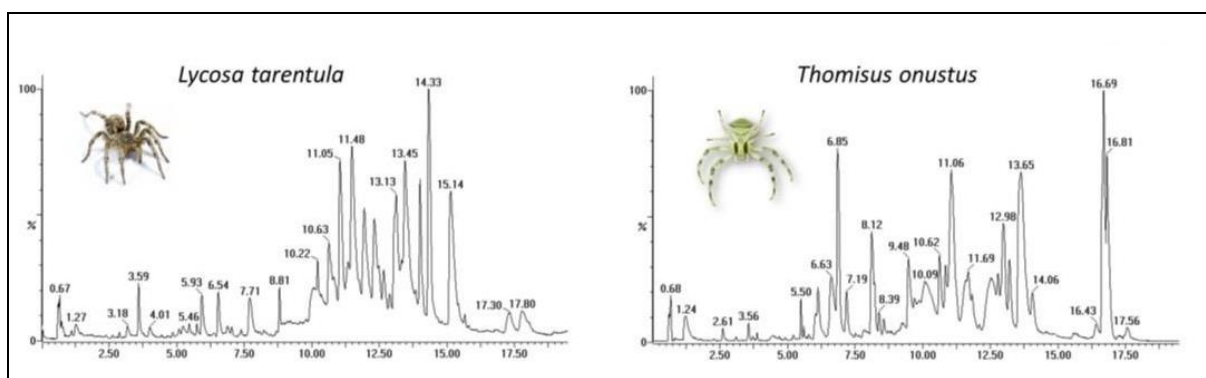


Figure 39 : Exemples de chromatogrammes obtenus en sortie d'HPLC, pour les venins de *Lycosa tarantula* (araignées lous) et *Thomisus onustus* (araignées crabes).
Résultats obtenus par Sébastien Dutertre (IBMM, Montpellier).

Ces graphiques mettent en évidence la variation de la solution testée dans l'éluant, en fonction du temps. Cela permet notamment de sélectionner les composés majoritaires selon l'intensité du pic.

e. Analyses « omiques » du venin de *Lycosa tarantula*

1. Préparation de la bibliothèque et séquençage *Illumina*

Les banques d'ARN-Seq sont construites avec le kit de préparation d'échantillons d'ARNm Truseq (protocole à faible débit) d'Illumina (San Diego, Californie, États-Unis). Selon les échantillons, 100 ou 200 ng d'ARNm sont utilisés pour la construction des bibliothèques.

Ensuite, l'ARNm est fragmenté en petits morceaux en utilisant des cations divalents à température élevée. Un ADNc monobrin est synthétisé à partir de ces fragments d'ARN clivés en utilisant la transcriptase inverse SuperScript II, l'actinomycine D et des amorces hexamères aléatoires. Le second brin de l'ADNc est synthétisé en remplaçant le dTTP par le dUTP. Ces fragments d'ADNc subissent alors l'addition d'une unique base « A » (acide-aminé Adénine). Les produits sont ensuite purifiés et enrichis avec 15 cycles de PCR. Les bibliothèques d'ADNc finales sont validées avec un analyseur de fragments (Agilent Santa Clara, CA) et quantifiées avec un kit KAPA qPCR (Kapa Biosystems, Wilmington, MA).

Le transcriptome de *L. tarantula* est alors séquencé dans le cadre d'un projet plus vaste comprenant 15 autres transcriptomes de glandes à venin. Sur 3 voies de séquençage de cellules, les 16 banques ont été regroupées dans des proportions égales, dénaturées avec du NaOH et diluées à 18 pM avant de se regrouper. La formation de ces groupes, l'hybridation des amorces et la lecture à une seule extrémité, ainsi que le séquençage de 125 cycles sont effectués sur cBot et HiSeq2500 (*Illumina*, San Diego, CA), respectivement. L'analyse d'image est effectuée à l'aide du logiciel de contrôle HiSeq et du composant d'analyse en temps réel. Le démultiplexage est effectué à l'aide du logiciel d'analyse de séquençage d'*Illumina*. La qualité des données est évaluée à l'aide de FastQC du Babraham Institute, et du logiciel *Illumina SAV* (Sequence Analysis Viewer). Les contaminants potentiels ont été étudiés avec le logiciel FastQ Screen du Babraham Institute.

2. Assemblage de transcriptomes, annotation et quantification des transcrits de toxines

Les annotations BLAST résultantes des contigs assemblés sont examinées manuellement et triées en trois catégories : « toxines », « non-toxines » et « inconnues », en fonction de la similitude des annotations avec des toxines de venin déjà connues. Les contigs identifiés comme « toxines » sont attribués à des familles de toxines spécifiques en fonction de leurs annotations. Chaque famille de gènes présentant une expression totale supérieure ou égale à 1% est alors utilisée pour générer des alignements de séquences dans MEGA v7. Cette procédure a permis de récupérer et d'annoter un total de 18 séquences (putatives) de 10 familles structurales comprenant à la fois des protéines de venin (VP) et des peptides typiques de type neurotoxine (SN) (y compris des peptides linéaires, de type neurotoxine et riches en

cystéine). Pour chacune des familles de toxines dont les alignements de séquence ont été produits, les cadres de lecture corrects sont identifiés pour les contigs individuels à l'aide de MEGA v7, facilité par l'inspection manuelle des correspondances Blastn et le portail en ligne ExpASy Translate. Pour produire des alignements de haute qualité, des mesures de contrôle de la qualité sont mises en œuvre dans lesquelles les contigs sont rejetés si : (i) la longueur de séquence correspondant aux toxines connues est inférieure à 100 pb, (ii) 50% ou plus du contig ne correspond pas à une toxine connue, (iii) les 50 premiers pourcentages du contig sont interrompus par un codon stop, (iv) la séquence est composée soit de deux régions exoniques entrecoupées d'un intron (indicatif d'une contamination d'ADN génomique), soit de deux séquences distinctes, basées sur l'annotation, assemblées en continu (indiquant un désassemblage chimérique). Afin de résoudre le problème de « sous-clustering », sous-produit courant de l'assemblage de données génétiques riches en isoformes (Archer et al., 2014), les contigs sont fusionnés si ceux-ci présentent > 98% de similitude de séquence sur une région chevauchante de > 50 pb. Tous les jeux de données sélectionnés sont alors ajustés au cadre de lecture ouvert (soit commencer au niveau de la méthionine et arrêter au niveau du codon STOP) dans MEGA v7, puis alignés en utilisant l'algorithme MUSCLE, sous les paramètres standard.

3. Analyse de séquence bioinformatique

Les données issues de la plateforme de séquençage sont découpées à l'aide de l'outil trimmomatic trinity avec des paramètres par défaut. Les lectures sont assemblées à l'aide du logiciel trinity (version 2.1.1) avec la ligne de commande suivante sur le cluster MUSE : *Trinity --trimmomatic --seqType fq --normalize_reads --max_memory 150G --left \$ input_left --right \$ input_right - CPU 10 --output \$ outputdir --SS_lib_type FR --bflyCPU 8 --bflyHeapSpaceMax 10G. \$ input_left et \$ input_right* représentent respectivement les fichiers de lecture avant et arrière ; *\$ outputdir* représente la destination où la sortie de l'assembly est écrite.

Les lectures assemblées sont ensuite annotées en utilisant la procédure suivante. Une base de données interne composée de toutes les toxines d'araignées d'Arachnoserver (<http://arachnoserver.org>), UniprotKB/SwissProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=organism:spider&fil=reviewed%3Ayes>) et Venomzone (<https://venomzone.expasy.org/>) est créé à l'aide de makeblastdb du package

BLAST+ après la suppression de la redondance à l'aide de CD-HIT (Fu et al., 2012; Li and Godzik, 2006) au seuil de 1,00. Les contigs sont soumis à un premier BLAST contre cette base de données afin de fournir un premier sous-ensemble annoté du transcriptome. Les contigs annotés sont ensuite BLASTés contre toute la base de données Swissprot/Uniprot pour confirmer l'exactitude des hits enregistrés (BlastP contre UniProtKB avec e-seuil = 0,0001 ; matrice BLOSUM-62, non filtrante et espacée ; UniProtKB Swiss-Prot 2019_03). Après cela, les résultats sont classés dans la famille des toxines à l'aide des classificateurs Ekenda et de hmmcompete (Koua and Kuhn-Nentwig, 2017). Le signal peptide et le propeptide sont prédits respectivement en utilisant SignalP (Almagro Armenteros et al., 2019) et SpiderP (Pineda et al., 2018). Une dernière étape de validation manuelle est réalisée : alignements de séquences à l'aide de MAFFT (Kato and Standley, 2013), identification des variantes, prédiction du site de clivage. Tous les contigs obtenus ainsi que leurs lectures correspondantes se référant aux protéines spécifiques des glandes à venin, aux neurotoxines (putatives) et aux peptides, sont analysés au niveau nucléotidique pour détecter les isoformes de transcription. Les variantes de séquence nucléotidique résultant manifestement d'erreurs de séquençage/décalages de trame sont exclues.

4. Protéomique

A. Spectrométrie de masse couplée par chromatographie liquide

La RP-UPLC est exploitée sur un système de chromatographie en phase liquide à ultra haute performance (UPLC) Acquity H-Class (Waters, Corp., Milford, MA, États-Unis) équipé d'un détecteur UV (détecteur PDA) sous le contrôle du logiciel Waters MassLynx (version 4.1). La séparation du venin de *L. tarantula* est alors réalisée en utilisant une colonne Kinetex C18 100Å (2,1 x 150 mm, 3 µm), équipée d'une pré-colonne. L'élution est effectuée en utilisant un gradient de 0 à 80% de B (0,1% d'acide formique dans ACN) en 80 min. Des échantillons élués de l'UPLC sont introduits dans le spectromètre de masse à un débit de 500 µl/min. Des acquisitions sont réalisées sur une plage de 50 Da à 1800 Da m/z toutes les 0,1 seconde sur un système MS haute définition Synapt-G2-S (Waters, Corp., Milford, MA, États-Unis). Afin d'obtenir les masses moléculaires des composants du venin en éluant entre 0 et 40 min, chaque pic du chromatogramme du courant ionique total (TIC) a été analysé avec le logiciel Waters Mass Lynx (version 4.1).

B. Protéomique « shotgun »

Avant la protéomique shotgun, les extraits de protéines de venin sont dénaturés, réduits et alkylés. En bref, chaque échantillon est dissous dans 89 μl de bicarbonate de triéthylammonium (TEABC) 100 mM. Un microlitre de DTT 1 M est ajouté et l'incubation est réalisée pendant 30 min à 60°C. Un volume de 10 μL d'IAA 0,5 M est ajouté (incubation pendant 30 min dans l'obscurité). La digestion enzymatique est réalisée par addition de 2 μg de trypsine (Gold, Promega, Madison USA) dans du TEABC 100 mM, suivie d'une incubation pendant une nuit à 30°C. Après avoir terminé l'étape de digestion, les peptides sont purifiés et concentrés en utilisant la résine en phase inverse OMIX Tips C18 (Agilent Technologies Inc.) selon les spécifications du fabricant. Les peptides sont déshydratés dans une centrifugeuse sous vide.

Les échantillons sont ensuite soumis à une chromatographie liquide nano-flux couplée à la spectrométrie de masse en tandem (NanoLC-MS/MS). Les échantillons sont remis en suspension dans 20 μL d'acide formique (0,1%, tampon A) et 1 μL est chargé sur une colonne analytique à phase inversée de 25 cm (75 mm de diamètre intérieur, Acclaim Pepmap 100® C18, Thermo Fisher Scientific). Celle-ci est séparée avec un Ultimate Système 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific) couplé à un Q Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific) via une source nano-électrospray, en utilisant un gradient de 123 min de 6 à 40% de tampon B (80% ACN, 0,1% formique acide) et un débit de 300 nl/min. Les analyses MS/MS sont effectuées en mode dépendant des données. Des balayages complets (375-1 500 m/z) sont acquis dans l'analyseur de masse Orbitrap avec une résolution de 60 000 à 200 m/z. Pour les analyses complètes, 3 x 10⁶ ions sont accumulés dans un temps d'injection maximal de 60 msec, et détectés via l'analyseur Orbitrap. Les douze ions les plus intenses avec des états de charge ≥ 2 sont isolés séquentiellement à une valeur cible de 1 x 10⁵, avec un temps d'injection maximal de 45 msec, et fragmentés par HCD (dissociation collisionnelle à énergie plus élevée) dans la cellule de collision (énergie de collision normalisée de 28%) et détecté dans l'analyseur Orbitrap à une résolution de 30 000.

C. Intégration bioinformatique des données protéomiques et transcriptomiques

PEAKS Studio 8.5 (Waterloo, ON, Canada), logiciel de base de données assisté *de novo*, est utilisé pour faire correspondre les spectres MS/MS obtenus à partir de l'analyse protéomique du venin de *L. tarantula* à notre base de données personnalisée résultant du transcriptome de la glande à venin assemblé traduit dans les six cadres de lecture. La carbamidométhylation est définie comme modification fixe, tandis que l'oxydation (M) est définie comme modifications variables, avec un maximum de clivages manqués à trois pour la digestion par la trypsine. La tolérance d'erreur de masse des produits intiaux et de masse des fragments est fixée à 5 ppm et 0,015 Da, respectivement. Un taux de fausse découverte (FDR) de 1% et un peptide unique ≥ 2 sont utilisés pour filtrer les protéines inexactes. Un $^{-10}\log P > 120$ indique que les protéines sont détectées par suffisamment de peptides fiables au niveau du spectre MS/MS. Afin d'identifier des séquences plus pertinentes, l'algorithme Spider du logiciel PEAKS Studio est utilisé pour trouver des mutations supplémentaires ou pour corriger les séquences. Cet algorithme corrige ainsi les séquences stockées dans la base de données transcriptomique avec des séquences *de novo* basées sur les spectres MS/MS, nous ayant permis d'identifier les MPT (pour modifications post-traductionnelles) et les mutations. L'intensité ionique minimale pour la mutation et les MPT est fixée à 5%, et un score ALC ≥ 90 pour les séquences *de novo*, conduisant à une faible erreur de masse des précurseurs afin d'identifier des MPT fiables et des mutations potentielles.

f. Tests comportementaux

Les tests *in-vivo* mis en place sur les abeilles domestiques *Apis mellifera* se sont limités dans notre étude à des tests de survie, après injections intracérébrales de toxines ou venins.

1. Préparation des abeilles

Les abeilles sont récupérées en entrée de ruche (provenant de notre rucher sur le terrain d'expérimentation du CNRS, Montpellier) et représentent essentiellement des butineuses. Celles-ci sont regroupées par lot de cinq, placées dans des tubes de 50 ml (Falcon®, Dutscher), et endormies par un court séjour à -18°C . Les abeilles sont ensuite minutieusement placées

dans les alcoves d'une boîte de cônes vides de 10 μ l, et sont maintenues, tête à l'extérieur, par trois morceaux de scotch fixés entre la tête et l'abdomen (Image 11).

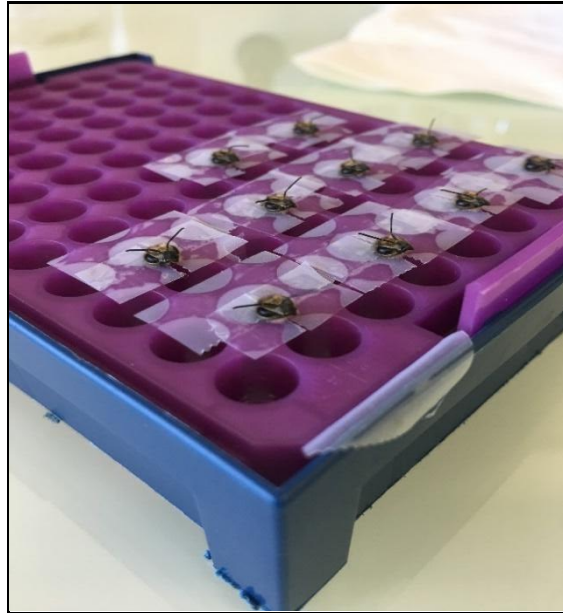


Image 11 : Positionnement des abeilles *Apis mellifera* au sein de la boîte de cônes et maintenues par du scotch.

2. Injection des abeilles

Ces expériences ont essentiellement été réalisées dans le but de tester la toxicité de la toxine U-Asilidin1-Mar1a, et la comparer à d'autres toxines de toxicité connue (Tableau 12). Le protocole d'injection est le suivant :

- Expérience 1 ; 5 lots injectés : toxine U-Asilidin1-Mar1a et quatre venins bruts d'autres arthropodes, tous à 1 mg/ml (n = 1).
- Expérience 2 ; 2 lots injectés : toxine U-Asilidin1-Mar1a à 3 et 300 μ M (n = 2).
- Expérience 3 ; 2 lots injectés : toxine U-Asilidin1-Mar1a à 30 et 300 μ M (n = 3).
- Expérience 4 ; 2 lots injectés : toxine U-Asilidin1-Mar1a (30 μ M) et ω -atracotoxine (1 mM) (n = 3).
- Expérience 5 ; 2 lots injectés : toxine U-Asilidin1-Mar1a (30 μ M) et ω -atracotoxine (100 μ M) (n = 4).

L'injection est effectuée au niveau de l'ocelle central des abeilles.

Venin/Toxine testé(e)	U-Asilidin1-Mar1a	<i>Assassin bug</i>	<i>Scolopendra cingulata</i>	<i>Hognia radiata</i>	<i>Buthus occitanus</i>	Atracotoxine
Concentration	1 mM, 300µM, 30µM, 3µM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM, 100 µM

Tableau 12 : Ensemble des venins et/ou toxines testé(e)s sur le comportement et la survie des abeilles domestiques *Apis mellifera*, par injection au niveau de l'ocelle central.

Deux types d'électrodes ont été utilisées, toutes deux étirées à l'aide d'une étireuse verticale (MODEL P-30, Sutter Instrument, USA). La première pipette, servant à percer l'ocelle a été étiré à partir d'un verre borosilicate (GB150-8P, Science Products) plus épais et résistant. La seconde pipette servant à injecter les venins/toxines, utilise le verre GC150T-10 (Harvard Apparatus). Les abeilles au sein du portoir sont alors placées sous loupe binoculaire (Stemi2000, ZEISS). L'ocelle central est percé avec la première pipette. La seconde pipette remplie d'environ 1 µL de toxine, permet d'injecter au niveau de l'ocelle percée précédemment, environ 200 nL de toxine par abeille. Un lot de cinq abeilles est injecté avec de l'eau afin d'obtenir un contrôle négatif. Les abeilles sont alors libérées et placées par lot dans des boîtes de pétri (diamètre 150 mm) avec un petit récipient contenant du miel ou un mélange eau + miel. Ces boîtes sont ensuite placées en incubateur, à environ 30°C afin de reproduire les conditions de température de la ruche.

3. Protocole de suivie

Après injection, les divers lots d'abeilles sont examinés à 10, 20, 30, 40, 50, 60, 100, 130, 160, 190 et 220 min, et leur comportement est analysé (exploration de la boîte de Pétri, nettoyage des ailes, regroupement entre elles, mort, ...). Entre chaque observation, les lots d'abeilles sont replacés au sein de l'incubateur à 30° C.

IV. Résultats expérimentaux

Avant-propos

Les canaux et récepteurs de trois types d'insectes différents ont pu être analysés : l'abeille *Apis mellifera*, insecte pouvant être qualifié de bénéfique, et deux insectes considérés comme nuisibles, le puceron *Acyrtosiphon pisum* et le varroa *Varroa destructor*. Le récepteur nicotinique du poisson zèbre *Danio rerio* a également été enregistré dans le cadre d'un projet collaboratif, en tant que modèle pour l'analyse des venins et des toxines de cônes marins piscivores.

Une première approche en TEVC manuel a souvent permis une caractérisation fine des propriétés de ces récepteurs, tandis que le HiClamp® a été utilisé lors d'approches de pharmacologie comparative où des séries de courbes doses-effets ont été réalisées sur différents lots d'ovocytes.

CHAPITRE 1 : CARACTÉRISATION DES CANAUX IONIQUES PAR ÉLECTROPHYSIOLOGIE MANUELLE ET SEMI-AUTOMATISÉE.

A. Caractérisation des canaux ioniques d'insectes

1. Choix des canaux à analyser pour la suite du projet

Chez l'abeille, dont un des projets au sein de l'équipe est de cloner l'ensemble des canaux et récepteurs synaptiques, je me suis focalisée sur les canaux (1) qui pouvaient être une cible potentielle des venins que j'avais à tester et (2) pour lesquels l'expression dans l'ovocyte de xénope avait été mise au point et était donc robuste et reproductible. A l'heure actuelle, seuls les canaux calciques Cav3 et Cav4, ainsi que les récepteurs GABA RDL, RDL+GRD et RDL+LCCH3 répondaient à ces critères. Les récepteurs nicotiques, extrêmement intéressants d'un point de vue toxicologique, n'ont pas pu être testés à cause de leur expression beaucoup trop erratique. Chez le puceron et le varroa, nous avons cloné la sous-unité RDL des récepteurs GABA. Chez le poisson zèbre, seul le récepteur nicotinique musculaire était à notre disposition (don du Dr Papke, Univ. San Diego). Enfin chez le mammifère, je me suis limité aux canaux calciques neuronaux Cav2.1, Cav2.2 et Cav2.3, ainsi qu'aux récepteurs GABA $\alpha_2\beta_2\gamma_2$.

2. Canaux ioniques dépendants du potentiel

Les cinq types de canaux calciques (trois de mammifère et deux d'abeille) ont été analysés de manière analogue par expression hétérologue dans l'ovocyte, suite à l'injection de leur ARNc (voir partie Matériel et Méthodes). J'ai réalisé des courbes courant-voltage ainsi que des courbes d'inactivation pour chaque canal à partir des protocoles décrits plus haut en milieu Bant10. Le potentiel de repos est fixé à -100 ou -110 mV dans tous les cas, potentiel pour lesquels tous les canaux se trouvent dans un état fermé de repos. Les dépolarisations conditionnantes successives ont une durée de 2.5 secondes, et un potentiel allant de -110 mV à +80 mV par incrément de +10 mV. La dépolarisation test est à une valeur de -30 mV (Cav3)

et +10 mV (autres canaux), et une durée de 100 msec (Ca_v3) et 400 msec (autres canaux) (Figure 40). Une injection de BAPTA grâce à une troisième électrode est effectuée au sein de l'ovocyte afin d'inhiber toute contamination par les courants Cl^- endogènes pouvant perturber les enregistrements électrophysiologiques.

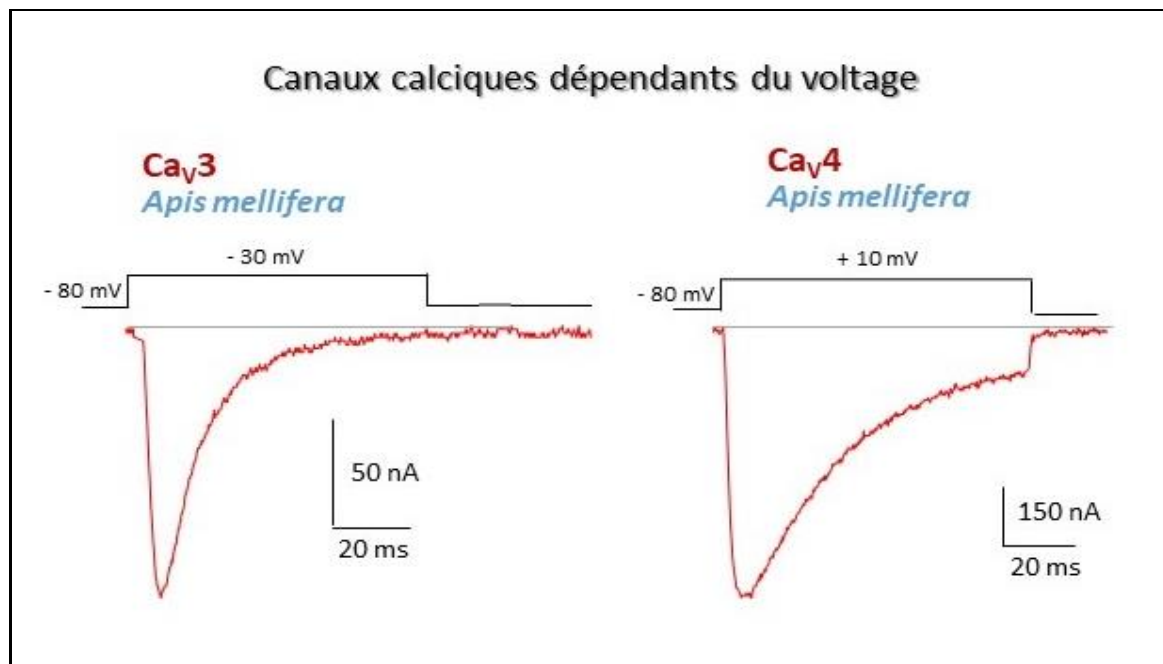


Figure 40 : Exemples de courants transients par des canaux calciques d'abeille *Apis mellifera*. Mise en évidence de courants Ba de canaux calciques dépendants du potentiel Ca_v3 et Ca_v4 (DSC1) d'abeille. Milieu de perfusion Bant10 (BaOH : 10 mM, TEAOH 20% : 12 ml, NMDG : 30 mM, CsOH : 2 mM, HEPES : 10 mM, pH à 7.2 par méthane sulfonate). Injection de BAPTA par une troisième électrode pour inhiber les courants contaminants.

i. Voltage dépendance du canal calcique Ca_v3 d'abeille

Le protocole d'enregistrement consiste ici à imposer des dépolarisations d'amplitude croissante par incréments de 10 mV toutes les 10 secondes, allant de -110 mV à +80 mV. Le potentiel de repos est fixé à une valeur de -110 mV. Plusieurs expérimentations ont été réalisées puis normalisées. Celles-ci ont été moyennées avant de faire le fit. L'amplitude de chaque courant a été mesurée puis normalisée en fonction de l'amplitude maximale enregistrée. La courbe courant-voltage (I-V) a été générée par traçage des valeurs de courant normalisées en fonction de la valeur de la dépolarisation. Celle-ci présente un pic d'amplitude de courant à

environ -30 mV, et un potentiel d'inversion (E_{rev}) autour de 25 mV. Ce potentiel correspond au changement d'un courant ionique entrant en un courant sortant, soit le potentiel de membrane auquel le flux d'ions est nul. L'ajustement de cette courbe moyenne à l'équation de la courbe I-V donnée dans la partie Matériels et Méthodes permet de déterminer le potentiel de demi-activation V_{act} (potentiel de la membrane auquel 50% des canaux sont ouverts), la pente d'activation k_{act} et la conductance normalisée. Ainsi, pour le canal Ca_v3 , $V_{act} = -48.7 \text{ mV} \pm 0.5$, et $k_{act} = -6.4 \pm 0.4$ ($n = 8$) (Figure 41.A). La courbe d'inactivation en fonction du potentiel (Figure 41.B) a été enregistrée à partir du traçage du courant maximal normalisé (I_{max}). Celle-ci correspond à une équation de Boltzmann, pour laquelle peut être déterminé le potentiel de demi-inactivation (V_{inac}), soit le potentiel de membrane auquel 50% des canaux sont inactivés. Pour le canal Ca_v3 , à bas seuil d'activation, les paramètres sont : $V_{inac} = -68 \text{ mV} \pm 0.4$, et $k_{inac} = 3.5 \pm 0.4$ ($n = 8$) (Cens et al., 2015; Gosselin-Badaroudine et al., 2016).

L'ensemble des tests effectués par la technique de double électrode et potentiel imposé montre que ce canal Ca_v3 code bien pour un canal activé par de faibles dépolarisations (environ -50 mV), avec des cinétiques d'inactivation rapide proche de celles enregistrées sur les canaux de mammifères $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ et $Ca_v3.3$. Ces données sont en accord avec les résultats mis en avant par Jeong *et al.*, révélant les paramètres de demi-activation et de demi-inactivation du canal Ca_v3 (nommé Ca- $\alpha 1T$) chez la drosophile (Jeong et al., 2015). Les résultats rapportés dans cet article se situent dans les mêmes gammes de valeur que ceux mis en évidence dans ce projet chez l'abeille domestique, confirmant que ce canal est bien de type LVA chez les insectes. Celui-ci joue également un rôle dans les mécanismes d'automaticité, de firing ou encore dans les phases précoces du PA, représentant donc une cible « intéressante » pour des toxines. L'amélioration de l'expression de ce canal au sein des ovocytes de xénopes reste en revanche faible, notamment pour des essais de cribles pharmacologiques. Des expériences sont en cours pour améliorer cela : recherche de protéines chaperones, essai de nouveaux vecteurs d'expression, et devraient permettre de favoriser une caractérisation plus complète des diverses propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques de ces canaux à bas seuil.

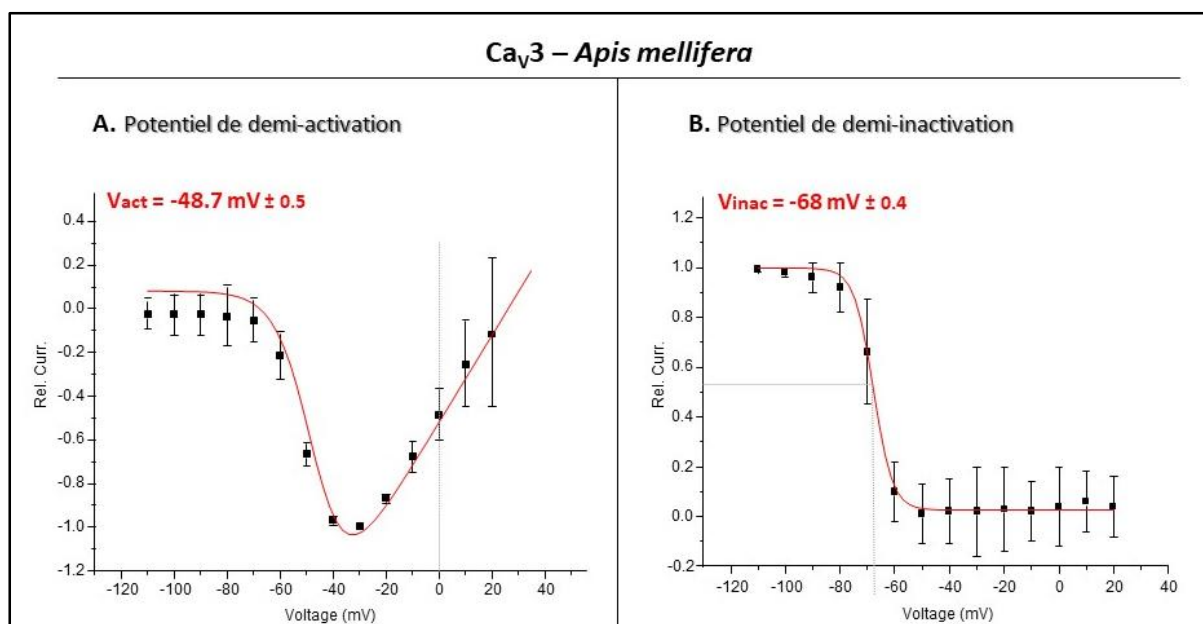


Figure 41 : Courants Ba dépendants du potentiel générés par le canal Ca_v3 d'abeille domestique *Apis mellifera* en réponse à des impulsions dépolarisantes. (A) Courbe courant-voltage normalisée (I-V) afin de mettre en évidence le potentiel de demi-activation (V_{act}). Les protocoles consistent à imposer des dépolarisations allant de -110 mV (potentiel de repos de la membrane de ces canaux à bas seuil) à +30 mV par incréments de 10 mV, toutes les 10 secondes. La courbe I-V enregistrée pour chaque ovocyte a été normalisée par rapport à son pic maximal ($n = 8$). Les paramètres d'activation mis en évidence pour ce canal Ca_v3 sont calculés à : $V_{act} = -48.7 \text{ mV} \pm 0.5$, $k_{act} = -6.4 \pm 0.4$ et $E_{rev} = 25.4 \pm 1 \text{ mV}$. (B) Courbe d'inactivation dépendante du potentiel normalisée permettant de mettre en évidence le potentiel de demi-inactivation (V_{inac}). Les protocoles de double-pulse consistent à imposer des étapes de dépolarisation successives d'une durée de 2,5 secondes, allant d'un potentiel de membrane de -110 mV à +30 mV avec des incréments de +10 mV. La dépolarisation test est de -30 mV et d'une durée de 100 msec. La courbe enregistrée pour chaque ovocyte a été normalisée par rapport au courant maximal ($n = 8$). La courbe d'inactivation dépendante du potentiel correspond à une équation de Boltzmann, avec les paramètres suivants : $V_{inac} = -68 \text{ mV} \pm 0.4$ et $k_{inac} = 3.5 \pm 0.4$ ($R = 0.03 \pm 0.01$).

Milieu de perfusion Bant10 (BaOH : 10 mM, TEAOH 20% : 12 ml, NMDG : 30 mM, CsOH : 2 mM, HEPES : 10 mM, pH à 7.2 par méthane sulfonate). Les données sont les moyennes \pm S.E. de n ovocytes.

ii. Voltage dépendance du canal calcique Ca_v4 d'abeille

Les protocoles effectués sur le canal Ca_v4 d'abeille sont identiques à ceux effectués sur le canal calcique Ca_v3. La valeur des dépolarisations successives de 400 msec de durée, va de -80 mV à +70 mV par incréments de +10 mV, toutes les 10 secondes. L'ovocyte est maintenu à un potentiel de -80 mV entre ces dépolarisations. Comme constaté sur la Figure 42, le canal calcique Ca_v4 commence à s'activer par de plus fortes dépolarisations (Gosselin-Badaroudine et al., 2016), proche de -30 mV, et la courbe courant-voltage présente un pic d'amplitude à 0

mV pour s'inverser vers +80 mV (E_{rev}). Ce potentiel d'inversion correspond au changement d'un courant ionique entrant vers un courant sortant. Une régression de cette courbe en utilisant l'équation décrite dans la partie Matériels et Méthodes permet de déterminer $V_{act} = -9.8 \text{ mV} \pm 1.4$ ($k_{act} = -4.9 \pm 1.1$) pour le canal Ca_v4 d'abeille ($n = 8$) (Figure 42.A). La courbe d'inactivation en fonction du potentiel, correspondant à une équation de Boltzmann, permet de mesurer les paramètres suivants : $V_{inac} = -39 \text{ mV} \pm 1.8$ et $k_{inac} = 12.5 \pm 1.7$ (Figure 42.B).

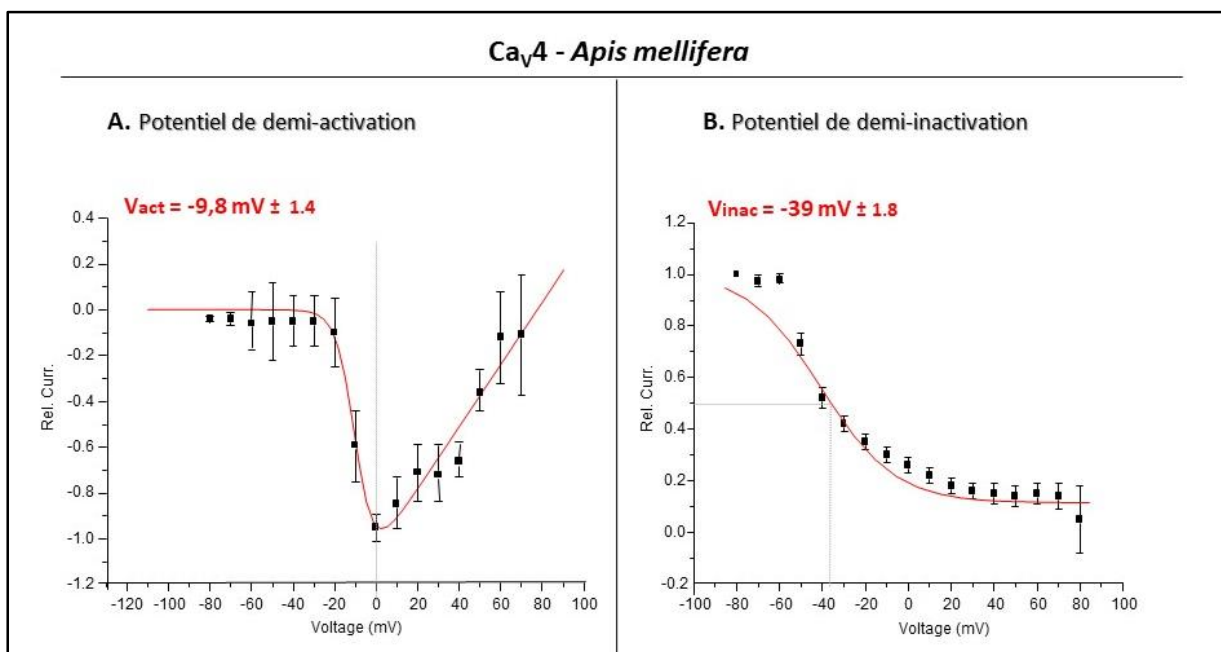


Figure 42 : Courants Ba dépendants du potentiel générés par le canal Ca_v4 d'abeille domestique *Apis mellifera* en réponse à des impulsions dépolarisantes. (A) Courbe courant-voltage normalisée (I-V) afin de mettre en évidence le potentiel de demi-activation (V_{act}). Le protocole consiste à imposer des dépolarisations allant de -80 mV à +70 mV par incréments de 10 mV, toutes les 10 secondes. La courbe I-V enregistrée pour chaque ovocyte a été normalisée par rapport à son pic de courant maximal ($n = 8$). Les paramètres d'activation mis en évidence pour ce canal Ca_v4 , $V_{act} = -9.8 \text{ mV} \pm 1.4$ ($k_{act} = -4.9 \pm 1.2$ et $E_{rev} = 78.5 \pm 4.5 \text{ mV}$). (B) Courbe d'inactivation dépendante du potentiel normalisée permettant de mettre en évidence le potentiel de demi-inactivation (V_{inac}). Les protocoles de double-pulse consistent à imposer des étapes de dépolarisation successives d'une durée de 2,5 secondes, allant d'un potentiel de membrane de -80 mV à +70 mV avec des incréments de +10 mV. La dépolarisation test est de -80 mV et d'une durée de 400 msec. La courbe enregistrée pour chaque ovocyte a été normalisée par rapport au courant maximal ($n = 8$). La courbe d'inactivation dépendante du potentiel correspond à une équation de Boltzmann, avec les paramètres suivants : $V_{inac} = -39 \text{ mV} \pm 1.8$ et $k_{inac} = 12.5 \pm 1.7 \text{ mV}$ ($R = 0.14 \pm 0.02$). Milieu de perfusion Bant10 (BaOH : 10 mM, TEAOH 20% : 12 ml, NMDG : 30 mM, CsOH : 2 mM, HEPES : 10 mM, pH à 7.2 par méthane sulfonate). Les données sont les moyennes \pm S.E. de n ovocytes.

Dans les conditions expérimentales mises en place, la solution utilisée pour l'étude de ces canaux (Bant10) ne contenant pas de Na^+ , ces canaux ne peuvent ainsi pas laisser passer ces ions. D'autres expériences faites au laboratoire, en présence au contraire de milieu contenant uniquement du Na^+ ont montrées que ces canaux ne laissaient pas passer cet ion. Enfin, une forte permabilité $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ est signe que ce canal est plus spécifique aux ions Ca^{2+} divalents plutôt qu'aux ions monovalents. La mise en évidence des potentiels d'inversion (E_{rev}) et de demi-activation pour ces canaux Ca_v3 et Ca_v4 d'abeille ont permis de discriminer deux seuils d'activation différents. Le canal Ca_v4 , référencé en premier lieu comme un canal de type sodique de par son homologie de séquence, semblerait ainsi être un canal de type calcique présentant les caractéristiques adéquates d'un canal à haut seuil d'activation.

Le lapin *Oryctolagus cuniculus* (tout comme le rat ou l'Homme), étant une espèce rencontrée communément dans les champs et cultures, celui-ci est également susceptible d'être exposé aux composés insecticides. La vérification de la spécificité d'espèce (mammifères versus insectes) de ces composés était donc intéressante. J'ai ainsi réalisée des courbes d'activation et d'inactivation sur les trois types de canaux calciques Ca_v2 ($\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v2.2$ et $\text{Ca}_v2.3$) de mammifère (lapin commun *Oryctolagus cuniculus*), disponibles au laboratoire, afin de pouvoir les comparer avec les résultats obtenus sur les canaux calciques Ca_v3 et Ca_v4 d'abeille.

iii. Voltage-dépendance des canaux Ca^{2+} de mammifères

Les canaux calciques dépendants du potentiel de mammifères sont répartis en trois groupes, chacun présentant plusieurs homologues. Les canaux calciques Ca_v2 auxquels je me suis intéressée dans cette partie, regroupent ainsi trois types de canaux : $\text{Ca}_v2.1$, dit de type P/Q (car prépondérant dans les cellules de « Purkinje » du cervelet), $\text{Ca}_v2.2$ de type N (car essentiellement « Neuronal ») et $\text{Ca}_v2.3$ de type R (car « Résistant » aux toxines qui affectent $\text{Ca}_v2.1$ et $\text{Ca}_v2.2$: ω -agatoxin-IVA (Mintz et al., 1992) et ω -conotoxin-MVIIA (Wang et al., 2016), respectivement). Ces canaux calciques s'activent tous les trois de manière relativement lente et pour des dépolarisations plus élevées que les canaux Ca_v3 (canaux à haut seuil d'activation : HVA), mais présentent des cinétiques d'inactivation différentes : lente pour les sous-unités $\text{Ca}_v2.1$ et $\text{Ca}_v2.2$ (Bleakman et al., 1995; Hans et al., 1999), mais une inactivation rapide pour le canal $\text{Ca}_v2.3$ (Zhang et al., 1993).

Chez l'espèce *Oryctolagus cuniculus*, une nomenclature « historique » particulière a été donnée avant l'identification de tous les canaux, et permet de nommer ces sous-unités : BI correspond au canal $Ca_v2.1$ (numéro d'accèsion UniProt : P27884), BII au canal $Ca_v2.3$ (UniProt : Q02343), et BIII au canal calcique $Ca_v2.2$ (UniProt : Q05152). Les résultats obtenus pour ces trois canaux sont présentés dans la Figure 43.

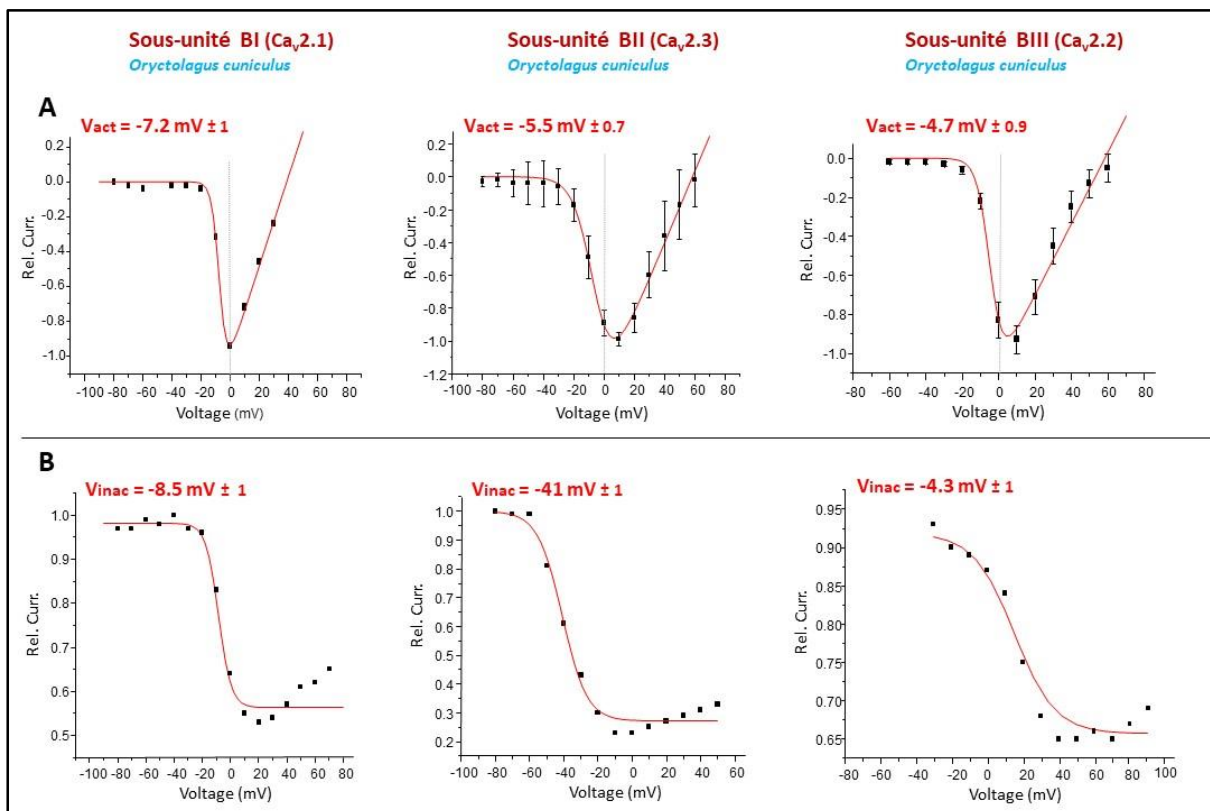


Figure 43 : Courants Ba dépendants du potentiel générés par les canaux $Ca_v2.1$ (sous-unité BI), $Ca_v2.2$ (BIII) et $Ca_v2.3$ (BII) de lapin commun *Oryctolagus cuniculus* en réponse à des impulsions dépolarisantes. (A) Courbe courant-voltage normalisée (I-V) afin de mettre en évidence le potentiel de demi-activation (V_{act}). Les protocoles consistent à imposer des incréments de potentiel allant de -80 mV à +70 mV, par incréments de 10 mV toutes les 10 secondes. La courbe enregistrée pour chaque ovocyte a été normalisée au courant maximal ($n = 3$ pour les sous-unités BI et BIII, et $n = 11$ pour BII). Les paramètres enregistrés pour ces canaux calciques de lapin, $V_{act} = -7.2$ mV \pm 1 ($k_{act} = 2.6$ \pm 0.3 et $E_{rev} = 38.8$ \pm 1.5) pour la sous-unité BI, $V_{act} = -4.7$ mV \pm 0.9 ($k_{act} = -3.5$ \pm 0.6 et $E_{rev} = 58.7$ \pm 1.1) pour BIII, et $V_{act} = -5.5$ mV \pm 0.8 ($k_{act} = -6.5$ \pm 0.5 et $E_{rev} = 58.1$ \pm 2) pour BII. (B) Courbe d'inactivation dépendante du potentiel normalisée permettant de mettre en évidence le potentiel de demi-inactivation (V_{inac}). Les protocoles de double-pulse consistent à imposer des étapes de dépolarisation successives d'une durée de 2,5 secondes, allant d'un potentiel de membrane de -80 mV à +70 mV avec des incréments de +10 mV. La dépolarisation test est de -80 mV et d'une durée de 400 msec. La courbe enregistrée pour chaque ovocyte a été normalisée par rapport au courant maximal ($n = 3$ pour les sous-unités BI et BIII, et $n = 11$ pour BII). La courbe d'inactivation dépendant du potentiel correspond à une équation de Boltzmann, permettant de mettre en évidence les paramètres suivants : $V_{inac} = -8.5$ mV \pm 1 ($k_{inac} = 4.5$ \pm 1 et $R = 0.6$ \pm 0.01) pour la sous-unité BI, $V_{inac} = -4.3$ mV \pm 1 ($k_{inac} = 16.3$ \pm 2 et $R = 0.6$ \pm 0.01) pour la sous-unité BIII ($Ca_v2.2$), et $V_{inac} = -41$ mV \pm 1 ($k_{inac} = 7.2$ \pm 0.9 et $R = 0.27$ \pm 0.01) pour la sous-unité BII ($Ca_v2.3$).

Milieu de perfusion Bant10 (BaOH : 10 mM, TEOH 20% : 12 ml, NMDG : 30 mM, CsOH : 2 mM, HEPES : 10 mM, pH à 7.2 par méthane sulfonate). Les données sont les moyennes \pm S.E. de n ovocytes.

La réalisation des courbes courant-potentiel pour ces trois types de canaux (Figure 43) permet ainsi de déterminer les différents potentiels de demi-activation : $E_{act} = -7.2 \text{ mV} \pm 1$ ($k_{inac} = 2.6 \pm 0.3$ et $n = 3$), $E_{act} = -5.5 \text{ mV} \pm 0.8$ ($k_{inac} = -6.5 \pm 0.5$ et $n = 11$), et enfin $E_{act} = -4.7 \text{ mV} \pm 0.9$ ($k_{inac} = -3.5 \pm 0.6$ et $n = 3$), pour les sous-unités BI, BII et BIII respectivement. Ces résultats montrent que ces trois canaux sont activés par de fortes dépolarisations, confirmant ainsi les données apportées par la littérature. De plus, ces trois valeurs de potentiel sont proches indiquant le même type de réponse quant à l'activation face à un stimulus électrique. Les résultats de la figure 43.B révèlent ainsi des potentiels de demi-inactivation à $-8.5 \text{ mV} \pm 1$ ($k_{inac} = 4.5 \pm 1$), et $-4.3 \text{ mV} \pm 1$ ($k_{inac} = 16.3 \pm 2$) pour les canaux $Ca_v2.1$ et $Ca_v2.2$ respectivement. En revanche, le canal $Ca_v2.3$ s'inactive par de faibles dépolarisations, $V_{inac} = -41 \text{ mV} \pm 1$ ($k_{inac} = 7.2 \pm 0.9$). En comparant l'ensemble de ces potentiels de demi-activation et demi-inactivation avec les résultats obtenus sur les sous-unités calciques d'abeille (Tableau 13), les sous-unités $Ca_v2.1$ et $Ca_v2.2$ peuvent être classées avec le canal Ca_v4 d'abeille comme canaux calciques à haut seuil. En revanche, le canal $Ca_v2.3$ diffère de ses homologues par son inactivation, survenant à des potentiels plus hyperpolarisés.

Les résultats présentés dans le Tableau 13 regroupent également les valeurs de la pente de dépolarisation (k) de la courbe de courant. D'un point de vue structural, cette valeur permet de rendre compte, de manière indirecte, du nombre de charges au sein des *voltage-sensor* devant être déplacées afin de permettre l'activation des canaux lors d'une dépolarisation. Ainsi, une valeur de pente élevée est le signe d'un nombre plus important de charges à déplacer. Dans notre étude, pour les canaux Ca_v3 et Ca_v4 , la différence enregistrée pour les valeurs de pente est faible indiquant un nombre de charges semblables devant être déplacées, sans doute positionnées sur les segments S3 et S4 des *voltage-sensor*. Les valeurs du potentiel d'inversion (E_{rev} : potentiel de membrane pour lequel le flux d'ions est nul) se situent dans des valeurs positives et indiquent le potentiel auquel le courant devient sortant. E_{rev} , correspondant au potentiel d'équilibre des ions transitants par le canal, peut être calculé soit par l'équation de Nernst (canal perméant à un seul ion), soit par l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz (canal perméant à plusieurs ions). Le seul ion entrant ne peut être que le Ca^{2+} , l'ion sortant majoritaire est sans doute le Na^+ , on peut ici déduire que la selectivité du Ca^{2+} par rapport au Na^+ est plus grande chez Ca_v3 que chez Ca_v4 , expliquant cette différence de

potentiel mesurée entre ces deux canaux. Pour l'inactivation, la fraction de courant non-activé (R pour reste) détermine la fraction de canaux résistants à l'inactivation. Pour les canaux à inactivation très lente (Ca_v2.1 en présence de Ba, ou Ca_v2.x co-exprimés avec la sous-unité Caβ_{2a} par exemple), cette valeur est non-nulle.

	Activation			Inactivation			n
	V _a (mV)	k (mV)	E _{rev} (mV)	V _{in} (mV)	k (mV)	R (mV)	
AmCa _v 3	- 48.7 ± 0.5	- 6.4 ± 0.4	25.4 ± 1.1	- 68 ± 0.4	3.5 ± 0.4	0.03 ± 0.01	8
AmCa _v 4	- 9.8 ± 1.4	- 4.9 ± 1.1	78.5 ± 4.6	- 39 ± 1.8	12.5 ± 1.7	0.14 ± 0.02	8
OcCa _v 2.1	- 7.2 ± 1	- 2.6 ± 0.6	38.8 ± 1.5	- 8.5 ± 1	4.5 ± 0.7	0.6 ± 0.01	3
OcCa _v 2.2	- 4.7 ± 0.9	- 3.5 ± 0.6	58.1 ± 2	- 4.3 ± 3	16.3 ± 2	0.6 ± 0.01	10
OcCa _v 2.3	- 5.5 ± 0.8	- 6.5 ± 0.5	58.7 ± 1.1	- 41 ± 1	7.2 ± 0.9	0.27 ± 0.01	3

Tableau 13 : Ensemble des paramètres courant-potential pour l'activation et l'inactivation, mis en évidence pour les différentes sous-unités de canaux calciques d'abeille *Apis mellifera* (Ca_v3 et Ca_v4) et de lapin *Oryctolagus cuniculus* (Ca_v2.1, Ca_v2.2 et Ca_v2.3), par la technique de double électrodes et potentiel imposé.

Am : *Apis mellifera*, Oc : *Oryctolagus cuniculus*, V_a : potentiel de demi-activation, V_{in} : potentiel d'inactivation moyenne, k : facteur de pente, E_{rev} : potentiel d'inversion, R (pour reste) : fraction de canaux résistants à l'inactivation, n : nombre d'ovocytes testés.

3. Canaux ioniques dépendants d'un ligand

Pour l'étude de cette famille de canaux, nous disposons au laboratoire de sous-unités RDL (pour *resistance to dieldrine locus*, en anglais) du récepteur GABA provenant de trois espèces d'insectes différentes (Figure 44). Je me suis appliquée à tester ces récepteurs, et mettre ainsi en évidence d'éventuelles spécificités entre les espèces. Les différentes autres sous-unités du récepteur GABA n'ont pas été, à ce jour, montrées comme formant des canaux GABA *in-vivo* et/ou jouant un rôle physiologique important. La sous-unité RDL, mimant la plupart des propriétés des récepteurs GABA natifs, est donc considéré comme un modèle de choix pour les études pharmacologiques *in-vitro* et *in-ovo* (Buckingham et al., 2006). Dans le cadre d'une étude collaborative, nous avons également étudié le récepteur nicotinique de poisson zèbre, afin d'analyser diverses toxines provenant de venin de cônes marins piscivores.



Figure 44 : Alignement de séquences pour la sous-unité RDL de l’abeille *Apis mellifera* (*Apis*), le puceron *Acyrthosiphon pisum* (*Acyrtho*) et du varroa *Varroa destructor* (*Varroa* – sous-unités RDL1, RDL2 et RDL3). Le domaine de liaison au ligand est en gris. Les boucles impliquées dans la liaison du ligand (LpA - F) sont indiquées, ainsi que les quatre domaines transmembranaires (TM, cadre bleu). La position des résidus cystéines de la famille des LGIC est indiquée par un cadre rouge. Les sites de N-glycosylation sont indiqués par un cadre noir. Les acides aminés impliqués dans la liaison du GABA au niveau des sous-unités RDL sont indiqués par un signe dièse rouge. Les acides aminés impliqués dans la liaison/résistance aux insecticides au niveau des sous-unités RDL sont encadrés en vert. Les numéros d’accession UniProt pour les sous-unités RDL sont : A0A0B5EEN9 pour l’abeille, A0A3855708 pour le puceron et A0A343W7T5, A0A343W7T6 et A0A343W7T7 pour les sous-unités RDL1, RDL2 et RDL3 de varroa, respectivement. Alignement de séquence effectué à partir du site Uniprot.

i. Récepteurs GABA

Les séquences mises en évidence (Figure 44) pour les sous-unités RDL principales de ces récepteurs chez l’abeille, le puceron et le varroa montrent de fortes similarités. Les positions des résidus cystéines, des sites de N-glycosylation au niveau des différentes boucles, ainsi que les acides-aminés impliqués dans la liaison au GABA sont identiques. La sous-unité RDL1 de varroa montre en revanche une différence au niveau des acide-aminés impliqués dans la liaison aux molécules insecticides. Ces séquences sont d’ailleurs en accord avec celles

présentées dans le papier de Del Villar & Jones, comparant les séquences RDL de puceron et de mouche (*Drosophila melanogaster*) entre autres, présentés les mêmes sites et acides-aminés d'intérêts (del Villar and Jones, 2018).

Pour ces récepteurs, les ovocytes sont maintenus à un potentiel de -60 mV (potentiel de repos pour ces récepteurs). Afin de provoquer l'activation de ces récepteurs, une solution de GABA (solution stock à 500 mM dans H₂O) à 100 μM préparée dans une solution de ND-Herg (NaCl : 96 mM, KCl : 3 mM, MgCl₂ : 2 mM, CaCl₂ : 0,5 mM, HEPES : 5 mM, pH = 7,4 par NaOH 1N) est perfusée durant 3 secondes (Figure 45). Par stimulation au GABA à 100 μM des sous-unités RDL, des amplitudes de courant supérieur à 1 μA chez le puceron et de plus de 4 μA (pour cet exemple) chez l'abeille ont pu être enregistrés. Suite à une activation rapide (en quelques millisecondes) de ces récepteurs au GABA, une désensibilisation est quelques fois observable après quelques secondes (non-visible Figure 45).

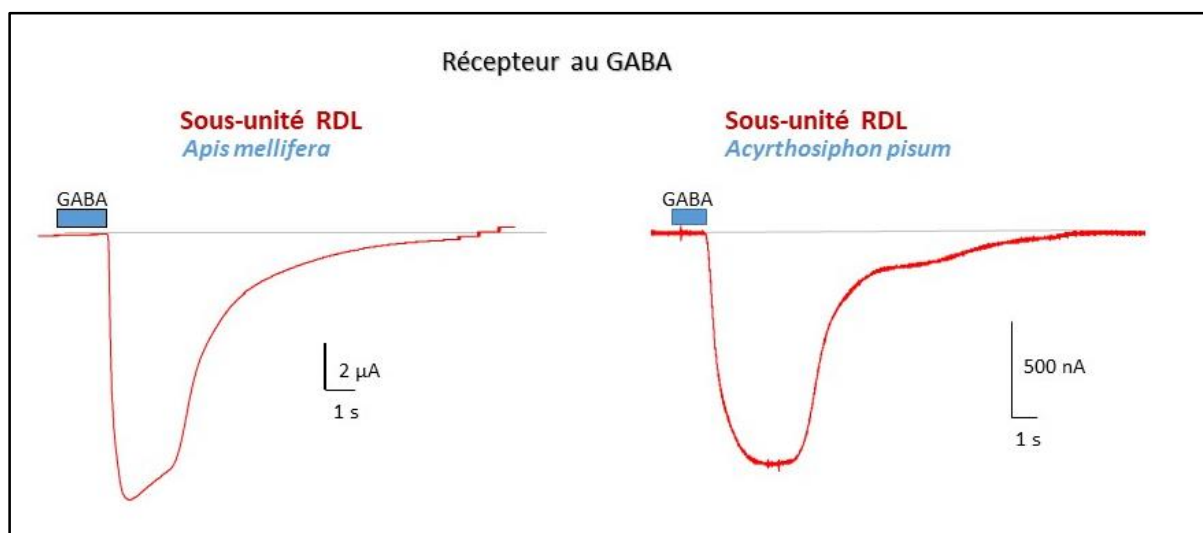


Figure 45 : Caractérisation des courants induits par la perfusion de GABA sur des ovocytes exprimant les sous-unités RDL du récepteur au GABA chez l'abeille *Apis mellifera* ou le puceron *Acyrthosiphon pisum*. Les ovocytes sont maintenus à un potentiel de -60 mV. Le GABA à 100 μM est perfusé durant 3 secondes, permettant de déclencher l'activation rapide du canal. Milieu de perfusion ND-Herg (NaCl : 96 mM, KCl : 3 mM, MgCl₂ : 2 mM, CaCl₂ : 0,5 mM, HEPES : 5 mM, pH = 7,4 par NaOH 1N).

Des courbes doses-réponses ont alors été réalisées pour chacune des sous-unités RDL des trois espèces d'insectes (abeille, puceron et varroa *Varroa destructor*). Les solutions de GABA de concentrations variables (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 50, 100 et 130 μM) ont été préparé dans du ND-Herg, et perfusées, séquentiellement, afin de déterminer la concentration en

agoniste nécessaire pour obtenir 50% de réponse (EC_{50} , concentration d'efficacité moyenne). Les ovocytes étaient maintenus à un potentiel de -60 mV.

Les EC_{50} pour le GABA obtenus pour les sous-unités RDL chez l'abeille et chez le puceron sont de $12.6 \mu\text{M} \pm 0.15$ ($n = 3$), et $21,2 \mu\text{M} \pm 0.04$ ($n = 7$), respectivement, mettant en évidence de faibles différences de réponse (Figure 46).

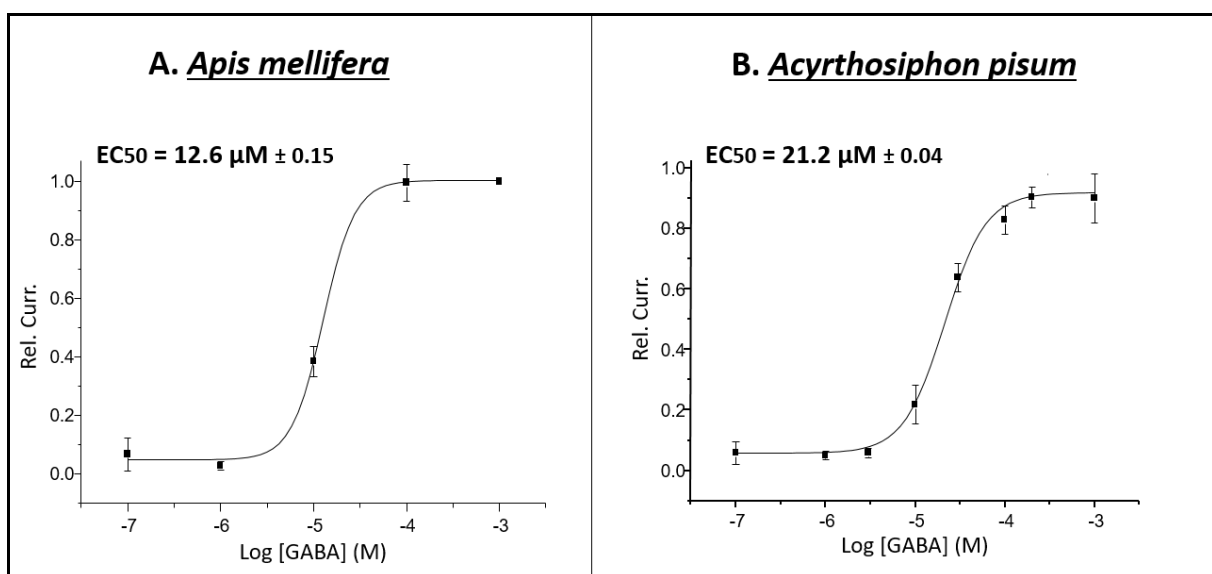


Figure 46 : Relation dose-réponse au GABA pour les sous-unités RDL d'abeille *Apis mellifera* (A) et de puceron *Acyrthosiphon pisum* (B), par la technique de double électrodes en potentiel imposé. (A) Mise en évidence de la dose-réponse GABA pour la sous-unité RDL d'abeille. Les ovocytes sont clampés à -60 mV. Les concentrations en GABA (0.1, 1, 10, 100 et 1000 μM) sont préparées dans le milieu de perfusion ND-Herg (NaCl : 96 mM, KCl : 3 mM, MgCl₂ : 2 mM, CaCl₂ : 0,5 mM, HEPES : 5 mM, pH = 7,4 par NaOH 1N). $EC_{50} = 12.6 \mu\text{M} \pm 0.15$ ($p = 2.5 \pm 3$ et $n = 3$) pour la sous-unité d'abeille. (B) Mise en évidence de la dose-réponse GABA pour la sous-unité RDL de puceron. $EC_{50} = 21.2 \mu\text{M} \pm 0,04$ ($p = 1.9 \pm 0.3$ et $n = 7$). Les données sont les moyennes \pm S.E. de n ovocytes.

B. Mise au point des techniques de criblage moyen débit HiClamp

La technique de patch-clamp automatisée par le robot HiClamp® permet une rapidité de travail non reproductible de façon manuelle. Ce robot permet également de travailler en présence de petits volumes d'échantillons, et est non-destructif des composés testés, caractéristiques essentielles dans la recherche de nouveaux composés à partir des venins seulement disponibles en faibles quantités, comme celui des araignées. Les premiers tests de dose-réponses au GABA sur les sous-unités RDL effectués avec ce robot m'ont tout d'abord permis de valider le HiClamp® comme outil de criblage. Les résultats obtenus ont en effet pu être comparé aux données mises en évidence par la technique manuelle.

1. Mise au point sur les canaux dépendants d'un ligand

A partir des ARNm de sous-unités RDL du récepteur au GABA d'abeille et de puceron, j'ai effectué la mise au point des protocoles adéquats sur le robot. Entre temps, l'équipe a pu cloner diverses sous-unités du récepteur RDL de varroa *Varroa destructor* (Ménard et al., 2018). Ces données m'ont ainsi permis de sélectionner les trois sous-unités RDL du récepteur au GABA (RDL1, RDL2 et RDL3) de cet insecte parasite. A partir des cinq sous-unités RDL provenant des trois espèces d'insectes différentes, j'ai réalisé des courbes dose-réponses au GABA, puis des courbes d'inhibition pour deux composés insecticides : le fipronil et la picrotoxine. Ces composés sont notamment connus pour leur spécificité d'action sur les récepteurs au GABA d'insectes, en revanche aucune sélectivité interspécifique n'a été rapportée.

i. Tests de dose-réponse au GABA

Sur le robot, les ovocytes sont maintenus à un potentiel de -60 mV. Ceux validant les conditions d'enregistrement préalablement programmées (courant < 0,2 μ A et courant de fuite < ou = 0.3 μ A) sont sélectionnés de façon automatique. Les concentrations de 0.001, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 et 100 μ M de GABA ont été préalablement préparées dans du

ND-Herg (NaCl : 96 mM, KCl : 3 mM, MgCl₂ : 2 mM, CaCl₂ : 0,5 mM, HEPES : 5 mM, pH = 7,4 par NaOH 1N) et distribués dans la **plaque « composés »**, ou 10 ovocytes de chaque lot sont enregistrés. Après analyse, les résultats obtenus révèlent des EC₅₀ pour le GABA de 19.9 +/- 13.8 µM (n = 10) et 10.1 +/- 4.2 µM (n = 10), pour les sous-unités RDL d'abeille et de puceron, respectivement (Figure 47.A et B). La sous-unité RDL de puceron est ici aussi sensible au GABA que la sous-unité RDL d'abeille. Cet écart entre les données obtenues par la technique manuelle et automatisée du HiClamp® est sans doute attribuable au faible nombre de réplicas réalisés en mode manuel, mais il semble en fait que ces deux valeurs soient très proches (inverse des résultats obtenus par la technique manuelle, Figure 46). Les séquences présentées Figure 44 ne montrant pas de différence au niveau des acides-aminés impliqués dans la fixation de GABA (dièse rouge) au niveau des sous-unités RDL, ceci ne peut expliquer cette différence de sensibilité entre ces deux espèces.

Pour le varroa, les résultats obtenus grâce au HiClamp® mettent en évidence une affinité au GABA différente pour chacune de ces trois sous-unités (Figure 47.C). En effet, la sous-unité RDL2 est la plus sensible à cet agoniste, avec une EC₅₀ = 14.8 +/- 1.4 µM (n = 13), tandis que ses homologues RDL3 avec une EC₅₀ = 43 +/- 10.4 µM (n = 10), et notamment RDL1 avec une EC₅₀ = 133.6 +/- 41.2 µM (n = 15) répondent pour des doses plus fortes. RDL2 donc, et contrairement aux sous-unités RDL1 et RDL3, montre une affinité pour le GABA proche des sous-unités RDL d'abeille et de puceron.

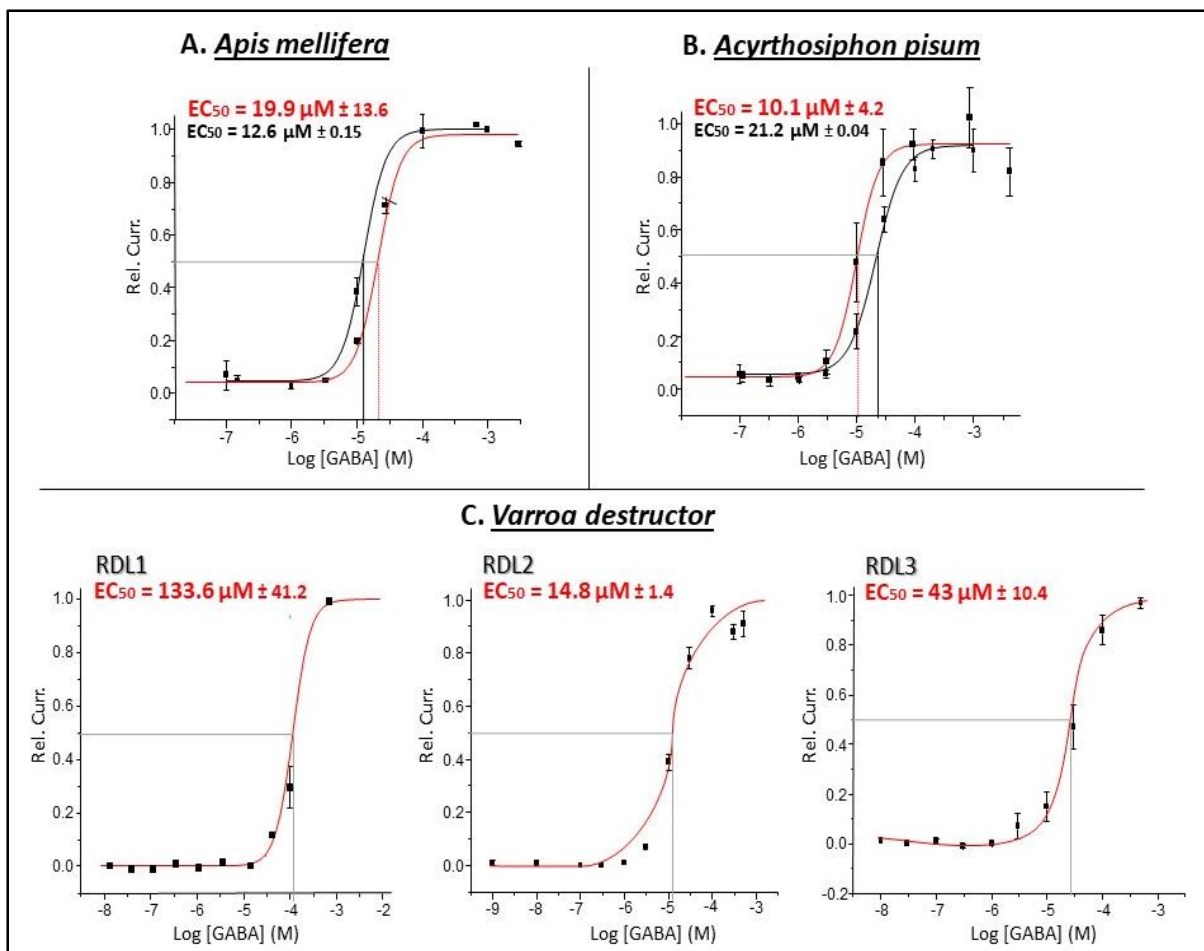


Figure 47 : Relation dose-réponse GABA pour la sous-unité RDL d'abeille *Apis mellifera* (A), de puceron *Acyrthosiphon pisum* (B) et de varroa *Varroa destructor* (C), par la technique de double électrodes en potentiel imposé automatisée (courbes rouges). Les ovocytes sont maintenus à un potentiel de -60 mV. Les concentrations en GABA (0.001, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 et 100 μM de GABA) sont préparées dans du ND-Herg (NaCl : 96 mM, KCl : 3 mM, MgCl₂ : 2 mM, CaCl₂ : 0,5 mM, HEPES : 5 mM, pH = 7,4 par NaOH 1N). (A) Chez l'abeille, $EC_{50} = 19.9 \pm 13.6 \mu\text{M}$ ($n_H = 2.3 \pm 0.2$ et $n = 10$). (B) Chez le puceron, $EC_{50} = 10.1 \pm 4.2 \mu\text{M}$ ($n_H = 2.3 \pm 0.7$ et $n = 10$). (C) Chez le varroa : EC_{50} pour RDL1 = $133 \pm 41.2 \mu\text{M}$ ($n_H = 2.3 \pm 0.2$ et $n = 15$), EC_{50} pour RDL2 = $14.8 \pm 1.4 \mu\text{M}$ ($n_H = 1.8 \pm 0.15$ et $n = 13$) et EC_{50} pour RDL3 = $43 \pm 10.4 \mu\text{M}$ ($n_H = 2.3 \pm 0.12$ et $n = 10$). Pour l'abeille (A) et le puceron (B), la courbe dose-effet ainsi que l' EC_{50} obtenus précédemment par la technique manuelle sont également représentés (courbe noire). Les données sont les moyennes +/- S.E. de n ovocytes.

ii. Sensibilité des récepteurs GABA aux insecticides

Je me suis par la suite intéressée aux différences possibles de réponse de ces diverses espèces aux insecticides ciblant les récepteurs GABA : le fipronil et la picrotoxine. Comme observé Figure 44, les acides-aminés impliqués dans la liaison aux molécules insecticides (cadre vert) semblent identiques. Seule la séquence de la sous-unité RDL1 de varroa montre une divergence par rapport aux autres séquences présentées, laissant présager une différence de réponse.

Fipronil

Pour l'ensemble des tests effectués sur le robot HiClamp®, le même protocole de tests de dose-réponse (précédemment détaillé) est utilisé. La première ligne de la plaque « composés » est préparée avec une solution de GABA à 100 μM afin d'activer les récepteurs formés des sous-unités RDL. Les lignes suivantes sont remplies des différentes concentrations en fipronil (0.001, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 et 100 μM) en présence de GABA à 100 μM . Les ovocytes sont maintenus à une valeur de -60 mV et ceux validant les conditions d'enregistrements sont sélectionnés. Les résultats présentés Figure 48 révèlent des $\text{IC}_{50} = 90 \text{ nM} \pm 0.1$ ($n = 3$) pour l'abeille, et $70 \text{ nM} \pm 0.1$ ($n = 3$) pour le puceron (Figure 48.A et B). Les sous-unités RDL de ces deux espèces montrent des sensibilités proches pour cet insecticide. En revanche, la sous-unité RDL1 de varroa semble complètement insensible au fipronil, contrairement aux sous-unités RDL2 et RDL3 qui présentent une sensibilité intermédiaire avec des $\text{IC}_{50} = 0.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ($n = 12$) et $3.6 \pm 1.7 \mu\text{M}$ ($n = 6$), respectivement (Figure 48.C). Chez cette espèce, la sous-unité RDL2 est ici plus sensible au fipronil que ses homologues 1 et 3. Ces différences de sensibilité, notamment pour la sous-unité RDL1 de varroa, peuvent s'expliquer par des changements d'acide-aminés observables au sein des séquences de ces espèces (Figure 44). En effet, plusieurs études rapportent que des modifications de certains acides aminés au sein de la séquence RDL, en particulier au niveau de la région transmembranaire 2, modifient de façon cruciale la sensibilité aux insecticides (Buckingham et al., 2017; Jones, 2018). Ainsi, des mutations dans le pore du canal (site de liaison du fipronil) peuvent engendrer des résistances aux insecticides de ces sous-unités RDL. Par cette technique automatisée, la sous-unité RDL de puceron montre la plus forte affinité pour le fipronil, mais la sous-unité d'abeille possède également une sensibilité particulièrement accrue pour ce composé insecticide. Chez le varroa, la différence de sensibilité mise en évidence entre la sous-unité RDL1 et ses homologues RDL2 et RDL3 peut en partie s'expliquer par les mutations d'acides aminés observées au niveau du site de fixation aux insecticides au sein de ces séquences (Figure 44 -cadres verts-). La sous-unité RDL1 présente en effet une modification d'acide aminés (A2'S) par rapport à ces deux homologues, présentant tout deux les mêmes acides aminés au niveau de ce site (T6'M). Enfin, ces résultats auront permis de mettre en évidence une forte toxicité de ce composé pour la sous-unité RDL du récepteur au GABA, chez l'ensemble des insectes.

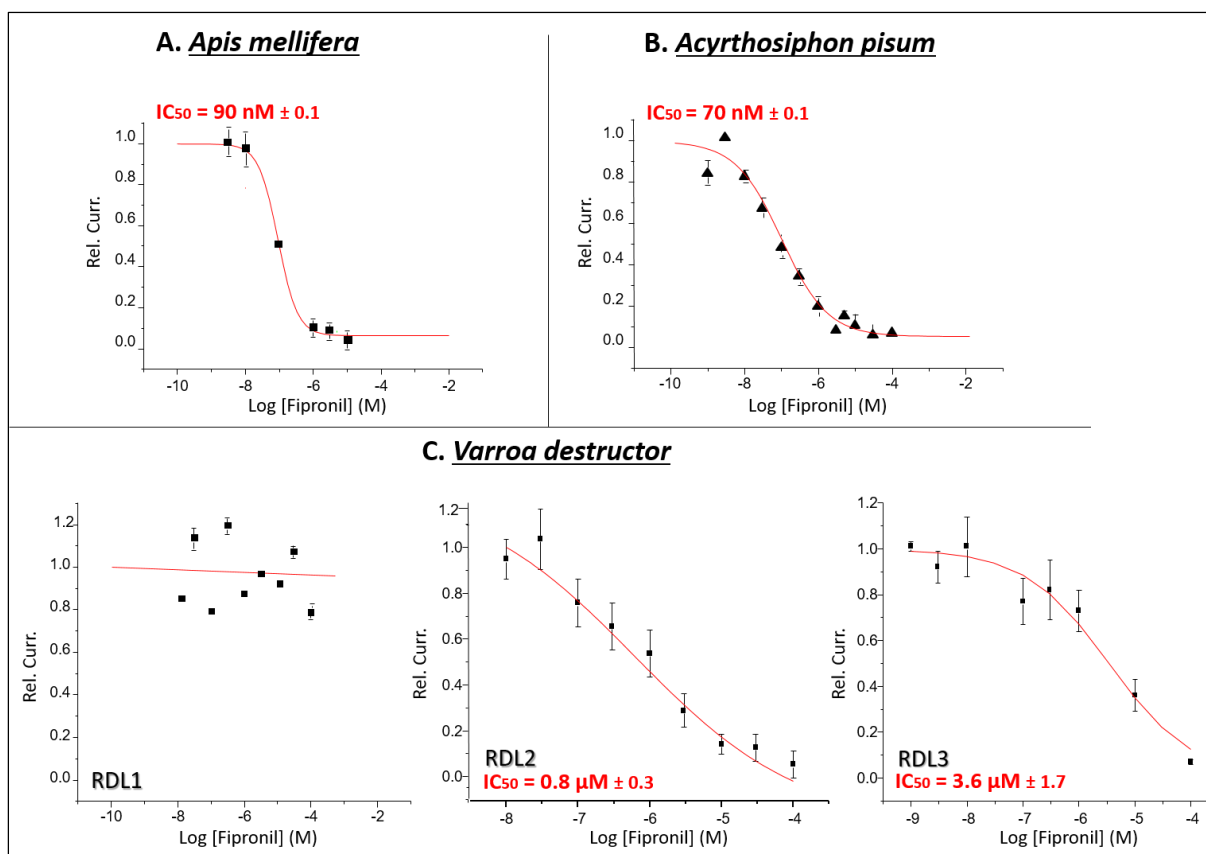


Figure 48 : Relation dose-réponse au fipronil pour les sous-unités RDL d'abeille *Apis mellifera* (A), de puceron *Acyrthosiphon pisum* (B) et de varroa *Varroa destructor* (C), par le robot HiClamp®. Les ovocytes sont maintenus à un potentiel de -60 mV. Les concentrations en fipronil (0.001, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 et 100 μM) sont préparées dans du ND-Herg (NaCl : 96 mM, KCl : 3 mM, MgCl₂ : 2 mM, CaCl₂ : 0,5 mM, HEPES : 5 mM, pH = 7,4 par NaOH 1N). (A) Chez l'abeille, IC₅₀ = 90 nM ± 0.1 (n_H = 2.3 ± 0.08 et n = 3). (B) Chez le puceron, IC₅₀ = 70 ± 0.1 nM (n_H = 2.3 ± 1 et n = 3). (C) Chez le varroa : IC₅₀ pour RDL2 = 0.8 ± 0.3 μM (n_H = 1.3 ± 0.1 et n = 12) et IC₅₀ pour RDL3 = 3.6 ± 1.7 μM (n_H = 1.1 ± 0.1 et n = 6). Absence d'effet sur la sous-unité RDL1.

Les données sont les moyennes +/- S.E. de n ovocytes.

Picrotoxine

Sur le robot HiClamp®, le protocole de test de dose-réponse, les différentes concentrations en picrotoxine, ainsi que les conditions d'enregistrement (courant < 0,2 μA et courant de fuite < ou = 0.3 μA) sont identiques aux tests précédemment effectués.

Les différents résultats présentés dans la Figure 49 révèlent que les sous-unités RDL d'abeille et de puceron ont une réponse similaire aux concentrations de picrotoxine avec des IC₅₀ à 0.5 +/- 0.5 μM (n = 3) et 0.3 +/- 0.3 μM (n = 3), respectivement (Figure 49.A et B). Chez le varroa, et comme en présence de fipronil, la sous-unité RDL1 semble insensible à la picrotoxine (Figure 49.C). En revanche, les sous-unités RDL2, et plus particulièrement RDL3, montrent une

sensibilité à la picrotoxine avec des $IC_{50} = 0.7 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ($n = 17$) et $4 \text{ nM} \pm 0.6$ ($n = 12$), respectivement. La picrotoxine montre ainsi une forte affinité pour les sous-unités RDL, mais avec une absence de sélectivité en agissant sur l'ensemble des insectes. Enfin, lorsque l'on s'intéresse aux récepteurs chez le varroa, ceux formés des sous-unités RDL3 montrent une sensibilité plus importante à la picrotoxine, avec une importante différence d' IC_{50} (facteur 150) avec ceux formés des sous-unités RDL2. Comme pour le composé fipronil, la sous-unité RDL1 montre une absence de réponse au composé picrotoxine. Ces deux composés se fixant au niveau du même site de liaison, le changement d'acide-aminé au niveau du site de fixation des insecticides (cadre vert) observé pour cette sous-unité de varroa pourrait expliquer cette différence de réponse. Enfin, pour ce type de composé insecticide agissant comme bloqueur de canal ouvert, les nombres de Hill déterminés pour l'ensemble de ces sous-unités RDL sont relativement faibles, oscillant entre 0.1 (puceron) et 0.6 (abeille et RDL2 de varroa), et devraient plutôt être de l'ordre de 1.

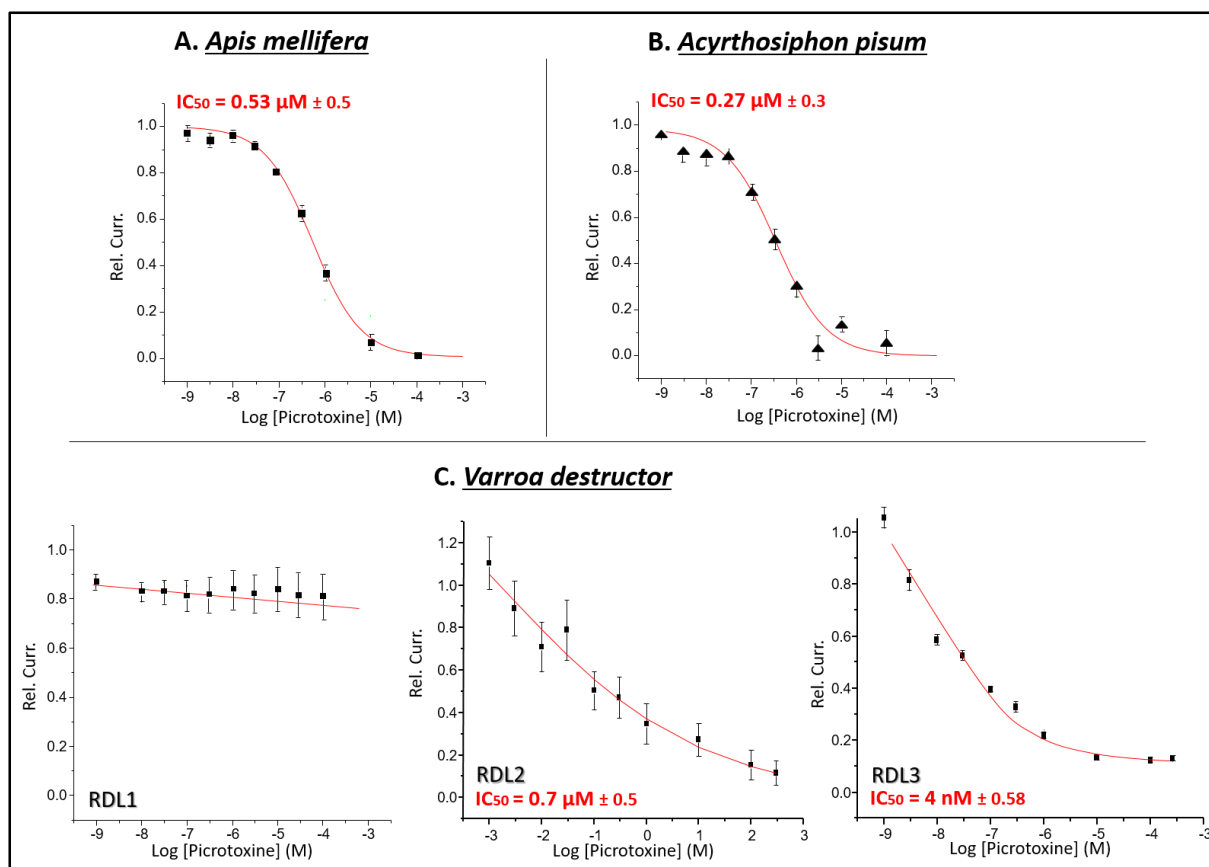


Figure 49 : Relation dose-réponse à la picrotoxine pour les sous-unités RDL d'abeille *Apis mellifera* (A), de puceron *Acyrtosiphon pisum* (B) et de varroa *Varroa destructor* (C), par le robot HiClamp®. Les ovocytes sont maintenus à un potentiel de -60 mV. Les concentrations en picrotoxine (0.001, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 et 100 μM) sont préparées dans du ND-Herg (NaCl : 96 mM, KCl : 3 mM, MgCl2 : 2 mM, CaCl2 : 0,5 mM, HEPES : 5 mM, pH = 7,4 par NaOH 1N). (A) Chez l'abeille, $IC_{50} = 0.53 \pm 0.5 \mu M$ ($n_H = 1.6 \pm 0.1$ et $n = 5$). (B) Chez le puceron, $IC_{50} = 0.27 \pm 0.3 \mu M$ ($n_H = 1.9 \pm 0.09$ et $n = 7$). (C) Chez le varroa : IC_{50} pour RDL2 = $0.7 \pm 0.5 \mu M$ ($n_H = 1.6 \pm 0.09$ et $n = 17$) et IC_{50} pour RDL3 = $4 \pm 0.6 nM$ ($n_H = 2.5 \pm 0.08$ et $n = 12$). Absence d'effet sur la sous-unité RDL1. Les sous-unités RDL de varroa montrent une sensibilité pour ce composé plus importante que celles d'abeille et de puceron (résultat inverse en présence de fipronil). Les données sont les moyennes +/- S.E. de n ovocytes.

L'ensemble des tests de dose-réponse effectué en présence de composés GABA ou insecticides (fipronil ou picrotoxine) sur les sous-unités RDL d'insectes a permis dans un premier temps de valider le HiClamp® comme outil de criblage. Les tests en présence de fipronil et picrotoxine ont permis de révéler des différences de sensibilité de ces sous-unités RDL pour ces composés insecticides. En comparant l'ensemble des résultats (Tableau 14), les sous-unités RDL d'abeille et de puceron montrent le même type de sensibilité au composé GABA, tout comme la sous-unité RDL2 de varroa, avec des EC_{50} se situant dans les mêmes gammes de valeur (entre 10 et 20 μM). En revanche, la sous-unité RDL3 de varroa et RDL1 plus particulièrement, semblent moins sensibles au composé agoniste avec des EC_{50} relevés plus importants (43 et 133 μM, respectivement). Les séquences RDL présentées Figure 44 ne

montrent pourtant pas de différence au niveau des acides aminés impliqués dans la liaison du composé agoniste (Figure 44 -dièze rouge-). Cette différence de sensibilité suggère qu'il pourrait exister d'autres acides aminés impliqués dans l'affinité du récepteur pour les agonistes, probablement localisé au niveau des boucles qui structurent la formation du site de liaison.

Pour les insecticides (fipronil et picrotoxine), la sous-unité RDL1 de varroa semble ici insensible à ces composés, contrairement à ses homologues. Cette différence pourrait notamment s'expliquer par le changement d'acides aminés impliqués dans la fixation des composés insecticides, observé au niveau de la séquence de cette sous-unité RDL1 (Figure 44 – cadres verts). En revanche, les différentes sensibilités à ces deux insecticides pour ces cinq sous-unités RDL, suivent le même type d'ordre en fonction des espèces. Ainsi pour le fipronil, la sous-unité RDL de puceron est plus sensible que la sous-unité RDL d'abeille, elle-même plus sensible que les sous-unités RDL2, RDL3 puis RDL1 de varroa. Pour la picrotoxine, le même ordre de sensibilité est observé, sauf pour la sous-unité RDL3 de varroa qui montre une IC_{50} particulièrement faible. Cette exception est ici surprenante puisque le fipronil et la picrotoxine partagent tous deux le même site de fixation au niveau du pore du canal. De plus, les acides aminés impliqués dans la fixation des insecticides au niveau de la séquence sont identiques entre les sous-unités RDL des trois espèces (hors RDL1). Cette différence de sensibilité entre ces deux insecticides pour la sous-unité RDL3 de varroa pourrait alors s'expliquer par d'autres changements d'acides aminés au niveau de la séquence du pore du canal. Sur les segments TM2 qui forment le pore et participe à la liaison de ce type d'inhibiteurs, les seuls acides aminés qui varient chez ces sous-unités sont A20' et A21' qui sont remplacé chez Vd-RDL3 (mais aussi chez Vd-RDL1) par S20' et Q21' (figure 44). Des expériences complémentaires sur des sous-unités RDL mutées à ce niveau sont nécessaire pour élucider le rôle de ces résidus.

	GABA			Fipronil			Picrotoxine		
	EC50 (μM)	n _H	n	IC50 (μM)	n _H	n	IC50 (μM)	n _H	n
AmRDL	19.9 ± 13.8	2.3 ± 0.2	10	90 nM ± 0.1	2.3 ± 0.08	3	0.5 ± 0.5	1.6 ± 0.1	5
ApRDL	10.1 ± 4.2	2.3 ± 0.7	10	70 nM ± 0.1	2.3 ± 0.1	3	0.3 ± 0.3	1.9 ± 0.09	7
VdRDL1	133.6 ± 41.2	2.3 ± 0.2	15	/	/		/	/	
VdRDL2	14.8 ± 1.4	1.8 ± 0.15	13	0.8 ± 0.3	1.3 ± 0.1	12	0.7 ± 0.5	1.6 ± 0.09	17
VdRDL3	43 ± 10.4	2.3 ± 0.12	10	3.6 ± 1.7	1.1 ± 0.1	6	4 nM ± 0.58	2.5 ± 0.08	12

Tableau 14 : Paramètres d'activation et d'inhibition pour les sous-unités RDL de récepteurs au GABA d'abeille *Apis mellifera*, de puceron *Acyrtosiphon pisum*, et de varroa *Varroa destructor* (sous-unités RDL1, RDL2 et RDL3), par le robot HiClamp®.

Am : *Apis mellifera*, Ap : *Acyrtosiphon pisum*, Vd : *Varroa destructor*, EC₅₀ : concentration d'activation moyenne, IC₅₀ : concentration d'inhibition moyenne, n_H (nombre de Hill) : facteur de coopérativité, n : nombre d'expériences.

Les résultats mis en évidence ici pour ces trois espèces d'insectes permettent entre autres d'obtenir des données pouvant être comparées entre elles ainsi qu'à d'autres espèces. La comparaison intra-espèce permet en effet d'appréhender la manière dont des récepteurs ayant des séquences différentes se comportent, nous renseignant ainsi sur les structures jouant un rôle dans cette sensibilité aux composés agonistes et antagonistes.

Pour les sous-unités RDL de varroa, les différentes EC₅₀ obtenues en présence de GABA, sont en accord avec les résultats retrouvés dans la littérature, sur poste manuel (Ménard et al., 2018). Dans ces deux conditions, la sous-unité RDL2 montre une sensibilité plus importante pour le GABA que RDL3 et notamment RDL1. En revanche, les résultats obtenus ici quant à la sensibilité au fipronil (RDL2>RDL3 et absence d'effet sur RDL1) divergent de ceux mis en évidence par le Dr Ménard (RDL3>RDL2>RDL1). Les IC₅₀ obtenues pour les sous-unités RDL2 et RDL3 par la technique automatisée se situent néanmoins dans les mêmes gammes de valeurs que celles obtenues sur poste manuel (Ménard et al., 2018), confirmant entre autre la bonne pratique de ce robot. Cela se confirme lorsque l'on compare également les résultats obtenus dans ce projet à ceux déjà publiés pour la sous-unité RDL de puceron *Acyrtosiphon pisum* par électrophysiologie classique (del Villar and Jones, 2018). Dans ce papier, l'EC₅₀ pour le GABA est présentée à 23 ± 1.7 μM tandis que l'IC₅₀ pour la molécule insecticide fipronil est calculée à 0.64 ± 0.15 μM ; les résultats obtenus par la technique automatisée sont en accord avec ces données.

Enfin, ces résultats peuvent également être confrontés à ceux obtenus sur des modèles non-étudié dans ce projet, telle que la mouche *Drosophila melanogaster*. Les travaux de Hosie *et al.*, s'intéressant à la sous-unité RDL de cette espèce, montrent que l'application de fipronil engendre une diminution de l'amplitude de la réponse au GABA dès 10 nM, et 20 μ M sont nécessaires pour induire 50% de perte de réponse (Hosie *et al.*, 1995). Ces résultats laissent ainsi supposer que les mêmes mécanismes et structures moléculaires sont impliqués dans la sensibilité au fipronil, pouvant également s'extrapoler à la picrotoxine (présentant un site de fixation identique).

Ces premiers résultats ainsi que les diverses données rapportées dans la littérature mettent en évidence l'impact des molécules insecticides (non-sélectives) sur un large panel d'insectes, et ce à de faibles concentrations.

2. Mise au point sur les canaux dépendants du potentiel

A partir de l'ARNm du canal calcique Cav4 d'abeille *Apis mellifera* (caractérisé en début de projet), je me suis intéressée à tester deux molécules : l'une touchant normalement les canaux calciques à haut seuil, le diltiazem, et l'autre appartenant de la famille des pyréthriinoïdes, la perméthrine, ciblant de façon spécifique les canaux sodiques, d'insectes et de mammifères. Il convient de noter que le canal Cav4 ayant été très récemment identifié comme canal calcique, aucune pharmacologie n'a encore été décrite, sauf celle de l'article de notre équipe, constituant ainsi une première caractérisation pharmacologique de ce canal (Gosselin-Badaroudine *et al.*, 2016). Ces deux molécules ont été choisies car celles-ci touchent soit les canaux calciques, donc des canaux de la même famille que Cav4, soit les canaux sodiques, avec lesquels le canal Cav4 a une identité de séquence relativement forte.

Les ovocytes injectés avec l'ARN d'intérêt sont maintenus à un potentiel de -80 mV, et ceux validant les conditions d'enregistrement (courant < 1 μ A et courant de fuite = 0) sont sélectionnés par le robot. Afin d'activer les canaux, le protocole programmé sur le logiciel du HiClamp® consiste à imposer des dépolarisations de 80 mV, allant de -80 mV à 0 mV. L'ovocyte est successivement testé durant cinq épisodes de 1 seconde dans le milieu BaCl10 (contenant BaCl : 10 mM, TEACl : 20 mM, NMDG : 50 mM, CsCl : 2 mM, HEPES : 10 mM, pH à 7.2 par HCl

1N) avant de se déplacer vers le premier puit de la « plaque composés ». Rapidement, nous nous sommes aperçus que le déplacement de l'ovocyte provoquait un artefact lors des enregistrements, nous avons alors décidés de préparer une ligne de puits contenant du milieu BaCl10 afin de contrebalancer l'apparition de celui-ci. Suite à l'incubation dans le puit central, l'ovocyte est déplacé automatiquement vers ce premier puit contenant le milieu BaCl10 durant 5 secondes avant un retour au niveau du puit central (5 secondes). Une seconde boucle est alors initiée : 5 épisodes de 1 seconde au niveau du puit central (soit 10 secondes au total à ce niveau) avant de se déplacer vers un nouveau puit contenant le composé insecticide, diltiazem ou perméthrine, à 10 μ M dans du BaCl10. De la même manière, cinq épisodes de dépolarisation de 1 seconde sont effectués. Enfin, l'ovocyte est replacé au niveau du puit central (5 secondes dans du BaCl10). Les résultats obtenus sur le HiClamp[®] (Figure 50) ne montrent alors aucun effet de ces deux composés sur les courants de canaux Ca_v4 d'abeille. En effet, les premières traces de courant observées (Figure 50.A) laissaient présager une inhibition du courant, mais par traçage des séquences de dépolarisation en fonction du protocole appliqué (Figure 50.B), l'inhibition observée est en fait un artefact. Celui-ci est à nouveau mis en évidence lors de l'analyse des données enregistrées en présence de diltiazem (Figure 50.C) ou perméthrine (Figure 50.D). Par cette technique automatisée, ces composés ne montrent ainsi aucun effet sur le courant des canaux calciques Ca_v4 d'abeille. Le HiClamp[®] étant un robot conçu en premier lieu pour les analyses électrophysiologiques sur récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, celui-ci semble moins adapté aux canaux dépendants du potentiel et ces données préliminaires sur Ca_v tendent à être approfondies.

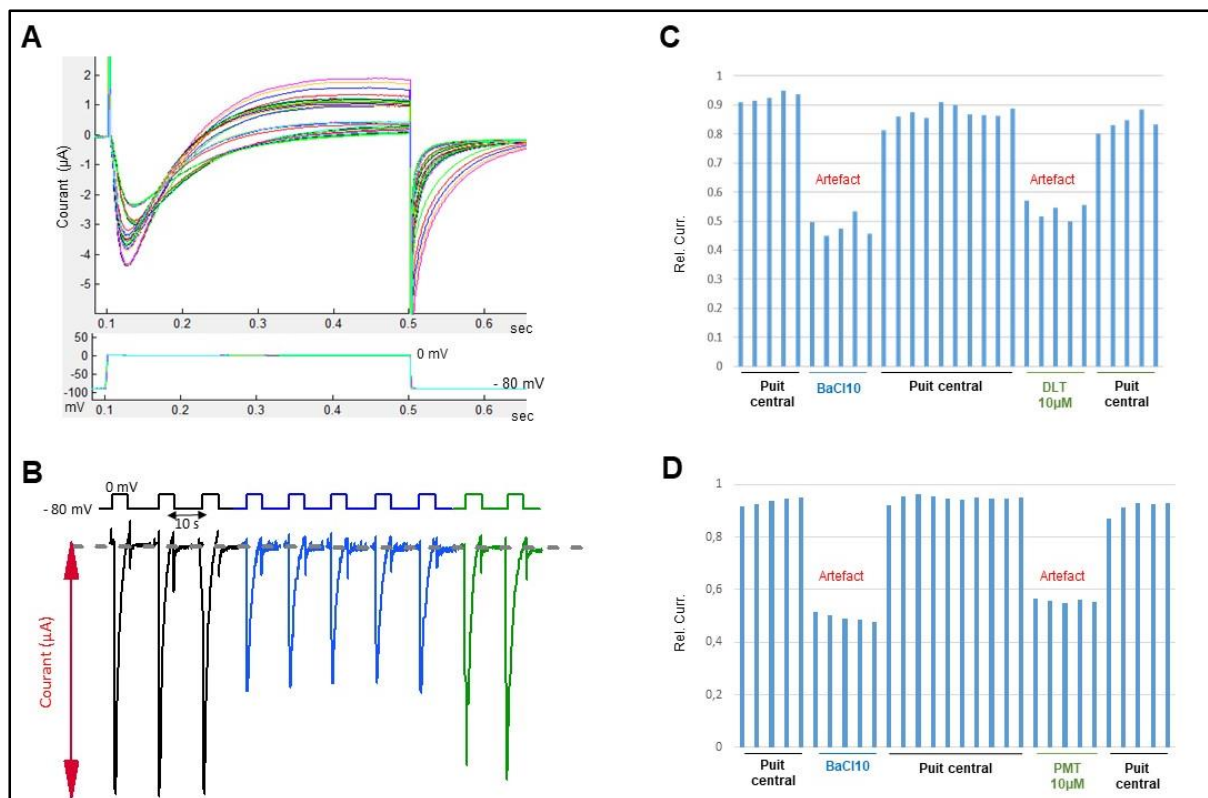


Figure 50 : Relation dose-réponse de composés insecticides (diltiazem et perméthrine) sur le canal Ca_v4 d'abeille *Apis mellifera*, par la technique automatisée de double électrodes et potentiel imposé (HiClamp®). Les ovocytes sont maintenus à un potentiel de -80 mV. Le protocole consiste à imposer des dépolarisations de 10 mV, allant de -80 mV à 0 mV afin de provoquer l'ouverture du canal. (A) Traces de courant obtenues sur le logiciel HiClamp® pour le canal calcique Ca_v4 d'abeille. (B) Protocole de test et traçage du courant en fonction du milieu testé : milieu de rinçage BaCl10 (noir), milieu BaCl10 (bleu), et composé insecticide diltiazem (vert). (C) Résultats obtenus par test du composé diltiazem à 10 μ M sur le canal Ca_v4 d'abeille. Celui-ci ne montre pas d'effet. (D) Résultats obtenus par test du composé perméthrine à 10 μ M sur le canal Ca_v4 d'abeille. Celui-ci ne montre pas d'effet.

Milieu de perfusion Bant10 (BaCl : 10 mM, TEACl : 20 mM, NMDG : 50 mM, CsCl : 2 mM, HEPES : 10 mM, pH à 7.2 par HCl 1N).

C. Venins et choix des espèces venimeuses

L'un des objectifs de ce projet de thèse était également de mettre en évidence et caractériser de nouveaux ligands peptidiques ciblant les canaux ioniques d'insectes nuisibles spécifiquement. Les canaux et récepteurs d'intérêts ayant été caractérisés, je me suis alors intéressée à l'analyse de venins de quatre espèces d'araignées. Avec un régime composé de plus de 90% d'insectes, les araignées représentent en effet le groupe le plus important d'ennemis naturels des insectes à travers le monde en terme d'espèce (Nyffeler and Birkhofer, 2017). Par leur comportement de prédation et par stratégie trophique, les venins ont évolué et se sont adaptés, fournissant aujourd'hui un large éventail de toxines peptidiques bioactives ayant des séquences et structures très diverses avec une spécificité d'action indéniable pour les canaux ioniques et récepteurs membranaires d'insectes en tout genre (King, 2004). Certaines toxines présentes au sein des venins d'araignées ont ainsi fait l'objet de recherches et diverses cibles moléculaires ont été caractérisées. Parmi celles-ci par exemple, les ω -agatoxines (du venin d'araignée *Agelenopsis aperta*) représentent des toxines modifiant l'ouverture (« gating modifier toxins », en anglais) des canaux de type Ca_v , Na_v et K^+ . D'autres toxines araignées en revanche agissent comme des activateurs de canaux, telles que les δ -atracotoxines agissant sur les canaux Na^+ (Dutertre and Lewis, 2010).

1. Choix des espèces d'araignées et extraction de venin

Suite aux tests de venins sur la mortalité des abeilles réalisés au préalable de ce projet de thèse (voir Introduction - Figure 30), diverses araignées ont été sélectionnées : *Thomisus onustus* et *Synema globosum* (famille des Thomisidae), et la *Lycosa tarantula* (famille des Lycosidae). Le projet s'est également orienté vers d'autres espèces d'araignées ou petits arthropodes car aisément retrouvés dans la région de Montpellier : l'araignée *Xysticus cristatus* (famille des Thomisidae), les scorpions *Buthus occitanus* (scorpion jaune occitan) et *Euscorpius flavicaudis* (petit scorpion à pattes noires), ainsi que le scolopendre *Scolopendra cingulata*.

Un extracteur électrique, conçu spécialement pour l'extraction de venin d'espèces de petite taille (voir chapitre Matériels et Méthodes, extraction de venin), et procuré auprès du Dr T.

Besson (Besson et al., 2016), a servi aux extractions de venin. Une pince placée aux niveau des chélicères de l'araignée (ou du telson pour les scorpions) permet de délivrer des impulsions électriques (tension = 2 à 7 V et ampérage = 0.5 à 2 A) selon le protocole préalablement programmé : « temps de travail » = 2 secondes et « temps de repos » (0 V) = 2 secondes entre chaque décharge. Les quantités de venins collectées (souvent minimes) sont diluées dans 20 µL d'eau afin de pouvoir en préserver le plus possible. Des analyses par Nano-Drop (Nanophotometer N60, Implen) sont effectuées dans le but de déterminer les concentrations en protéines des venins collectés (Tableau 15). Les quantités de protéines sont alors calculées à partir du volume dans lequel le venin a été prélevé (concentration x volume (0.02 mL)). Malheureusement, les araignées *Synema globosum*, *Thomisus onustus* et *Xysticus cristatus* (de petite taille) n'ont pas délivrées de quantités de venins suffisantes pour la suite des analyses.

	n	Concentration (mg/mL)	Quantités
<i>Lycosa tarentula</i>	6	115.6	2.3 mg
<i>Buthus occitanus</i>	14	60.1	1.2 mg
<i>Euscorpis flavicaudis</i>	5	19.3	386 µg
<i>Scolopendra cingulata</i>	2	2.05	41 µg

Tableau 15 : Ensemble des concentrations en protéines obtenues par Nano-Drop (Nanophotometer N60, Implen) à partir de l'extraction de venins de 4 espèces venimeuses. Les quantités de venins calculées (concentration x volume (0.02 mL)) et le nombre d'araignées pour chaque espèce étudiée sont également rapportés.

Les venins de *Lycosa tarantula* et *Buthus occitanus*, présentant les concentrations les plus importantes, il semblait intéressant d'obtenir une comparaison de composition des venins entre ces deux espèces venimeuses (araignée et scorpion).

2. Séparation des venins

L'HPLC permet d'obtenir des chromatogrammes traduisant la variation de la solution testée dans l'éluant en fonction du temps. Au sein des venins, les toxines peptidiques présentent généralement de hauts poids moléculaires représentés par des pics d'intensité élevés en sortie d'HPLC. Les venins de *Lycose* et *Buthus* sont dilués dans 80 μL d' H_2O + 0.1% d'acide formique, puis injectés à hauteur de 75 μL au sein de l'HPLC.

Les chromatogrammes obtenus (Figure 51) diffèrent en fonction de l'espèce étudiée. Une richesse en composés peptidiques est observable pour le venin de *Lycose* (Figure 51.A), tandis que des pics en nombre et en intensité moins importants sont identifiés dans le venin de scorpion (Figure 51.B). Ces résultats confirment les données apportées par la littérature (Gao et al., 2013; Zhang et al., 2015b) : les venins contiennent de nombreuses toxines peptidiques mais en nombre variable selon l'espèce, dont les pics représentatifs montrent la plus haute intensité (par rapport aux autres constituants).

Le venin de *Lycose* montrant une composition riche en toxines, celui-ci est sélectionné pour les tests de caractérisation sur les canaux ioniques d'insecte.

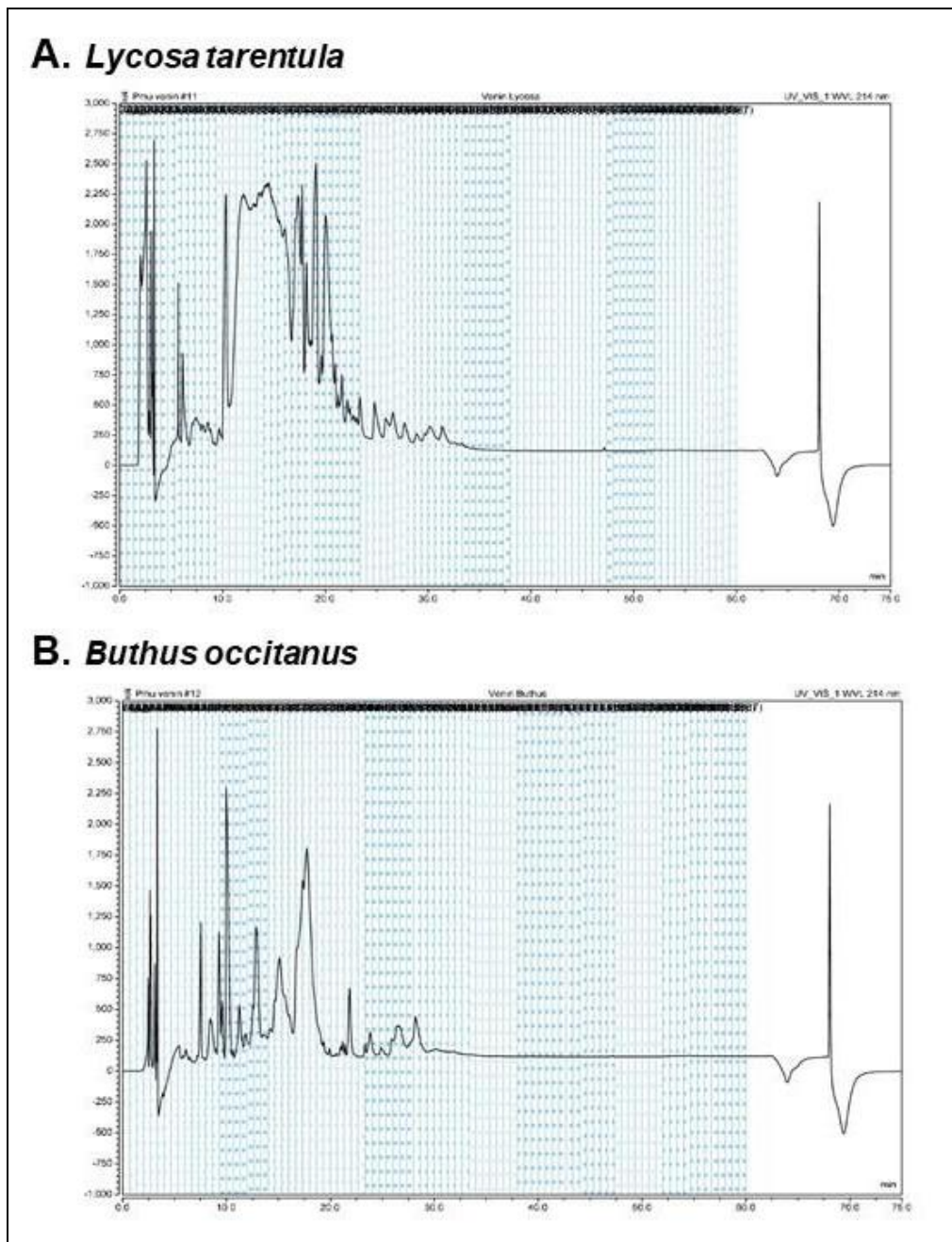


Figure 51 : Chromatogrammes obtenus en sortie d'HPLC pour les venins de l'araignée *Lycosa tarantula* (A) et du scorpion *Buthus occitanus* (B). HPLC réalisée par instrument Dionex U3000 (ThermoScientific) et séparation effectuée en utilisant une colonne Syncronis C18 250 x 4,6 mm (ThermoScientific), opérée à un débit de 1 ml/min. Phase mobile représentée par l'eau (solvant A) et l'acétonitrile (solvant B) contenant tous deux 0,1% d'acide formique (v/v). Gradient d'élution (75 min) : 0 % de B et augmentation linéaire jusqu'à 80 % pendant 60 min, augmentant à 100 % de B en 5 min, retour à l'état initial en 10 min. Absorbance UV comprise entre 214 et 280 nm. Les venins bruts sont injectés à hauteur de 75 µL, bruts ou dilués avec une solution H₂O + 0,1% d'acide formique, fonction des quantités de venins obtenues.

3. Extraction des ARN messagers

Les araignées n'ayant pas survécues aux tests électriques d'extraction de venin ont été congelées, et d'autres ont été sacrifiées car leur état ne semblait pas approprié pour la suite du projet (notamment suite aux pontes affaiblissant l'animal). Nous avons choisi de procéder ainsi car la période de l'année durant laquelle ces tests ont été effectués ne nous permettait alors pas de collecter de nouvelles araignées, et nous ne souhaitons pas perdre celles déjà collectées. Les glandes à venin sont placées dans du tampon de lyse (pour dégradation des membranes) et effectuer les purifications de l'ARNm. Celles-ci sont alors reprises dans de l'eau dont la quantité a été déterminée au préalable, en fonction du nombre d'araignées : 20 µL pour les araignées en faible nombre, *Synema globosum* (n = 4), *Xysticus cristatus* (n = 6) et *Lycosa tarantula* (n = 6), et 40 µL pour l'araignée *Thomisus onustus* (n = 14). Les ARNm ont été mis en évidence suivant le kit d'extraction ARNm (Magnetic mRNA isolation kit, Biolabs). Les concentrations en ARN sont mesurées par Nano-Drop (Nanophotometer N60, Implen) et permettent de calculer les quantités d'ARNm (représentant environ 2% de l'ARN total calculé) récupérées à partir des glandes à venin (Tableau 16).

	Concentration (mg/mL)	Quantités (µg)	n
<i>Lycosa tarentula</i>	22.63	453	6
<i>Synema globosum</i>	1.19	24	4
<i>Thomisus onustus</i>	17.11	684	14
<i>Xysticus cristatus</i>	10.5	210	6

Tableau 16 : Ensemble des concentrations en ARNm obtenues par Nano-Drop à partir de l'extraction des glandes à venins, les quantités en ARNm calculées, et le nombre d'araignées pour chaque espèce étudiée. Les quantités d'ARNm au sein des venins ont été calculées en fonction de la concentration obtenue par Nano-Drop (Nanophotometer N60, Implen) et les quantités d'eau (en µL) dans lesquelles les ARNm ont été repris : *Synema globosum*, *Xysticus cristatus* et *Lycosa tarantula* = 20 µL, *Thomisus onustus* = 40 µL.

D. Caractérisation fonctionnelle des venins

Un premier projet collaboratif a été mis en place par mon collègue Julien Giribaldi (IBMM, Montpellier), ayant mis en évidence une toxine issue du venin de prédation de cône marin *Conus catus*, nommée CIA et trois analogues cycliques (Giribaldi et al., 2018). Mon rôle dans ce projet était de caractériser une éventuelle cible de cette α -conotoxine et ses analogues sur le récepteur ACh de poisson zèbre *Danio rerio*. Un second projet a été établi par l'équipe du Dr Björn Marcus von Reumont (Institute for Biology, University of Leipzig, Talstr. 33, 04103 Leipzig, Germany), qui a isolé une nouvelle toxine du venin d'*Asilidae diptera*, U-Asilidin1-Mar1a. Des tests *in-vitro* sur les canaux ioniques d'insecte et mammifère, puis *in-vivo* sur abeilles vigiles ont été entrepris afin d'évaluer les effets de cette toxine peptidique.

1. Caractérisation *in-vitro* (HiClamp)

i. **Test des toxines CIA et analogues cycliques sur récepteurs ACh de poisson zèbre**

Cette analyse sur le robot HiClamp® consistait à mettre en évidence l'IC₅₀ de la toxine CIA et ses trois analogues (CIA-2, CIA-3 et CIA-4) sur le récepteur nicotinique musculaire ACh ($\alpha\beta\delta\gamma$) de poisson zèbre ; ARN obtenu grâce à un don du Dr Papke (Univ. San Diego). Cette toxine CIA cible en effet les récepteurs nicotiniques de type musculaire, tandis que son homologue CIB cible les récepteurs de type neuronaux (Cartier et al., 1996; Jacobsen et al., 1999). Les trois analogues présentent chacun deux, trois ou quatre acides aminés supplémentaires au niveau de leur séquence, ainsi qu'une conformation cyclique par rapport à la toxine native.

Sur le robot, les ovocytes sont maintenus à un potentiel de -60 mV, et ceux validant les conditions d'enregistrement (courant < 0.2 μ A, et courant de fuite < ou = 0.3 μ A) sont sélectionnés. Ceux-ci sont déplacés dans le puit contenant l'ACh à 100 μ M (incubation de 10 secondes), puis dans le second puit contenant la toxine CIA ou ses analogues à différentes concentrations (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 et 100 μ M) avec une incubation de 5 secondes. Ces quatre toxines présentent des courbes d'inhibition (Figure 52) ainsi que des IC₅₀ quasi-identiques, autour de 0.7 μ M +/- 0.2 (Tableau 17), traduisant une forte affinité et similarité d'action de ces toxines pour les récepteurs nACh de poisson zèbre.

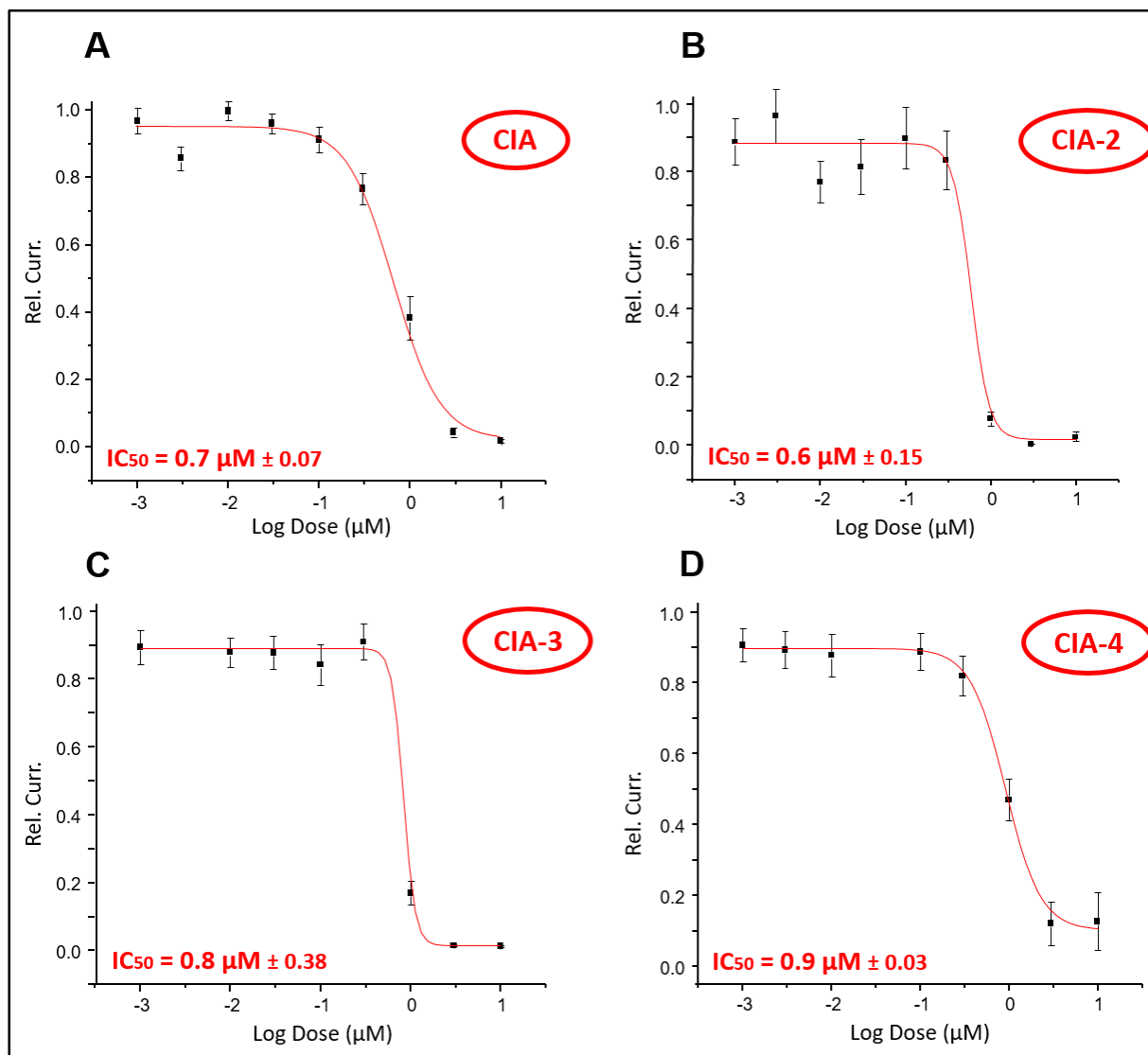


Figure 52 : Relation dose-réponse à la toxine CIA (A), et ses analogues cycliques CIA-2 (B), CIA-3 (C) et CIA-4 (D) sur le récepteur ACh musculaire de poisson zèbre, par la technique automatisée de potentiel imposé en double électrodes (HiClamp®). Les ovocytes sont maintenus à un potentiel de -60 mV. Les concentrations en toxine (0.001 à 100 μM) sont préparées dans du ND-Herg (NaCl : 96 mM, KCl : 3 mM, MgCl₂ : 2 mM, CaCl₂ : 0,5 mM, HEPES : 5 mM, pH = 7,4 par NaOH 1N). (A) Pour la toxine native CIA, IC₅₀ = 0.7 ± 0.07 μM (n_H = 1.6 +/- 0.4 et n = 15). (B) CIA-2 : IC₅₀ = 0.6 ± 0.15 μM (n_H = 1.7 +/- 0.3 et n = 12). (C) CIA-3 : IC₅₀ = 0.8 ± 0.38 μM (n_H = 1.4 +/- 5.5 et n = 26). (D) CIA-4 : IC₅₀ = 0.9 ± 0.03 μM (n_H = 1.2 +/- 0.4 et n = 15). Les données sont les moyennes +/- S.E. de n ovocytes.

	IC ₅₀ (μM)	n _H (μM)	n
CIA	0.7 ± 0.07	1.6 ± 0.4	15
CIA-2	0.6 ± 0.15	1.7 ± 0.3	12
CIA-3	0.8 ± 0.38	1.4 ± 0.5	26
CIA-4	0.9 ± 0.03	1.2 ± 0.4	15

Tableau 17 : Ensemble des IC₅₀ obtenu par tests des toxines CIA et ses trois analogues cycliques (CIA-2, CIA-3 et CIA-4) sur les courants ioniques exprimés par le récepteur nicotinique musculaire à l'ACh de poisson zèbre *Danio rerio*.
IC₅₀ : concentration d'inhibition moyenne, n_H : nombre de Hill et n : nombre d'expérience réalisé.

ii. Test de la toxine U-Asilidin1-Mar1a - Sur canaux Cav3 et Cav4 et récepteur GABA (sous-unité RDL) d'abeille *Apis mellifera*, et canaux Cav2 de lapin *Oryctolagus cuniculus*

L'équipe du Dr Von Reumont a montré récemment que cette neurotoxine peptidique de type ICK, U-Asilidin1-Mar1a, est impliquée dans l'immobilisation de proie. Cette étude collaborative consistait à tester l'action de la toxine sur des canaux ioniques potentiellement impliqués dans l'excitabilité neuronale et jouant un rôle dans le processus de prédation : les canaux calciques Cav3 et Cav4 et récepteurs au GABA (sous-unité RDL) d'abeille, mais également les canaux calciques Cav2.1, Cav2.2 et Cav2.3 de mammifère caractérisés en début de projet, à défaut d'expression des canaux Cav2 d'abeille.

Comme pour les tests effectués précédemment, les protocoles utilisés sont identiques. Les canaux dépendants du potentiel sont tous maintenus sur poste manuel à un potentiel de -100 mV, puis des dépolarisations successives allant soit de -80 mV à -30 mV pour le canal Cav3 d'abeille (bas seuil d'activation), soit de -80 mV à +10 mV pour le canal Cav4 à haut seuil, sont appliquées. Des perfusions de la toxine U-Asilidin1-Mar1a ou ses analogues, préparés à une concentration de 1 μM dans du Bant10, sont délivrées de manière automatique. Pour le récepteur au GABA, dont les tests sont effectués sur le robot HiClamp®, les ovocytes sont maintenus à un potentiel de -60 mV, puis déplacés vers le premier puit contenant du GABA à 100 μM (préparé dans du ND-Herg) pendant 10 secondes. Les ovocytes sont alors déplacés et incubés 5 secondes dans le second puit contenant la toxine U-Asilidin1-Mar1a ou ses

analogues, préalablement préparés à une concentration de 1 μM dans du GABA à 100 μM . Les résultats obtenus révèlent l'absence d'effet de la toxine U-Asilidin1-Mar1a sur l'ensemble des courants des canaux et récepteur testés (Figure 53).

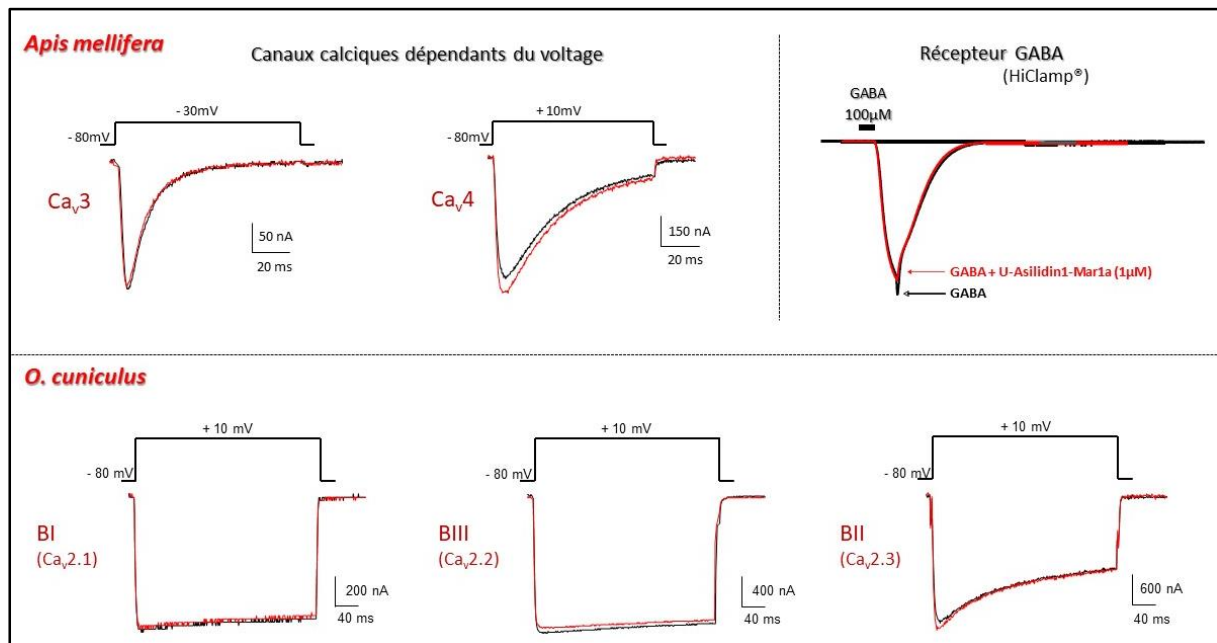


Figure 53 : Test de la toxine U-Asilidin1-Mar1a isolée du venin de l'insecte prédateur *Asilidae diptera* sur les canaux calciques Ca_v3 et Ca_v4 et le récepteur GABA (sous-unité RDL) d'abeille *Apis mellifera* et de canaux calciques $\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v2.2$ et $\text{Ca}_v2.3$ de lapin *Oryctolagus cuniculus*. Résultats obtenus par la technique de double électrodes et potentiel imposé manuelle et automatisée via le HiClamp® (récepteur GABA abeille). Les canaux dépendants du potentiel sont tous maintenus à un potentiel de -100 mV, puis des incréments allant de -80 mV à -30 mV pour le canal Ca_v3 d'abeille (bas seuil d'activation) ou de -80 mV à + 10 mV pour le canal Ca_v4 à haut seuil, sont injectés. Pour le récepteur au GABA, les ovocytes sont maintenus à un potentiel de -60 mV, puis déplacés vers le premier puits contenant du GABA à 100 μM (préparé dans du ND-Herg) pendant 10 secondes. Les ovocytes sont incubés 5 secondes dans un second puits contenant la toxine U-Asilidin1-Mar1a ou ses analogues, préalablement préparés à une concentration de 1 μM dans du GABA à 100 μM . Aucune différence significative n'est observée pour l'ensemble de ces tests.

2. Caractérisation *in-vivo*

Pour cette expérimentation comportementale, la toxine d'intérêt U-Asilidin1-Mar1a est injecté dans des abeilles vigiles. D'autres venins et toxines sont également injectés dans un but comparatif afin d'évaluer au mieux les effets de cette toxine d'intérêt. Les diverses expériences sont :

- Expérience 1 (n = 1) : injection de la toxine U-Asilidin1-Mar1a VS quatre venins bruts d'autres arthropodes (*Buthus occitanus*, *Hognia radiata*, *Scolopendra cingulata*, Assassin bug), à 1 mg/ml
- Expérience 2 (n = 3) : injection de la toxine d'intérêt à 3 μ M et 300 μ M
- Expérience 3 (n = 3) : injection de la toxine d'intérêt à 30 μ M et 300 μ M
- Expérience 4 (n = 3) : injection de la toxine d'intérêt à 30 μ M VS ω -atracotoxine à 1 mM
- Expérience 5 (n = 4) : injection de la toxine d'intérêt à 30 μ M VS ω -atracotoxine à 100 μ M.

Les venins ou toxines sont injectés au niveau de l'ocelle centrale de cinq abeilles (environ 200 μ L/abeille), à l'aide d'une électrode en verre. Les abeilles injectées sont placées par lot dans un incubateur (30°C) en présence de miel, ou d'un mélange eau et miel. Pour chaque expérience réalisée, le comportement et la survie des abeilles en fonction du temps sont évalués (observations personnelles) et des relevés comportementaux sont ainsi effectués toutes les dix minutes durant une heure, puis toutes les 30 minutes durant trois heures. Les observations du comportement des abeilles permettent d'identifier divers problèmes moteurs, tels qu'un défaut au niveau des ailes (battements), du comportement (abeille tournant sur elle-même), du rostre (constamment externe). Les effets sont comparés au comportement des abeilles contrôles, injectées avec de l'eau, et sont différenciés selon trois états : état normal (identique aux abeilles contrôles), critique (problèmes moteurs, comportement inapproprié ...) ou mourant (abeille totalement inactive).

L'expérience 1, avec injection d'autres venins bruts, est réalisée dans le but d'obtenir une première comparaison de toxicité. Dû aux quantités insuffisantes de venins en notre possession, cette expérience est réalisée une seule fois mais révèle déjà une forte toxicité de la toxine d'intérêt (Image 12). Celle-ci montre en effet une rapidité d'action en induisant un état critique seulement 10 minutes après injection, sur au moins une abeille (les premiers autres venins agissant à partir de 30 minutes).

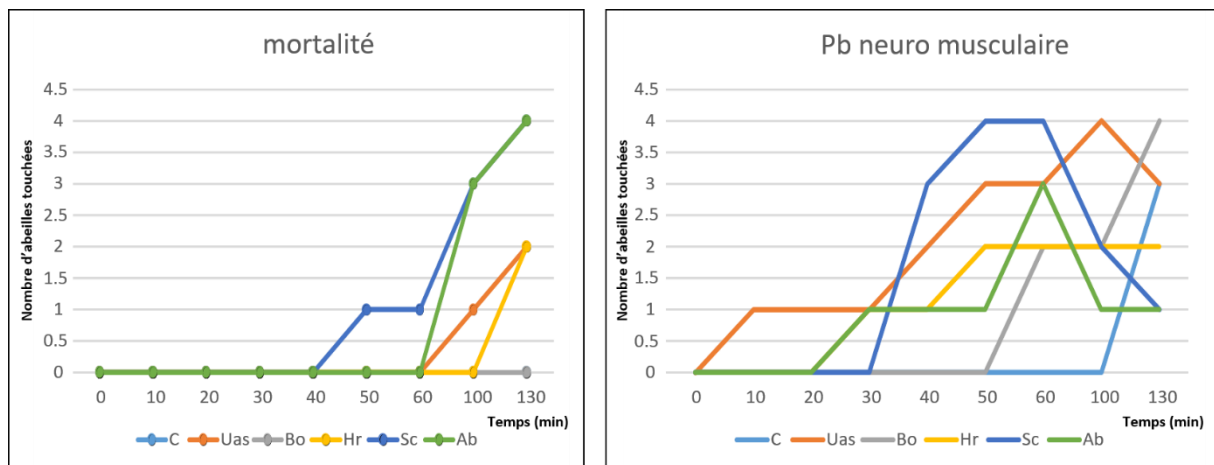


Image 12 : Graphiques de mortalité et problèmes neuro-musculaires obtenus à partir des observations personnelles effectuées lors des tests de venins et toxines par injection au niveau de l'ocelle des abeilles *Apis mellifera*, en fonction du temps (0 à 130 minutes). Injection d'environ 200 nL de venin par abeille à 1 mg/mL, sur cinq abeilles par condition testée. C = contrôle (H₂O) (bleu cian), Uas = U-Asilidin1-Mar1a (orange), Bo = *Buthus occitanus* (gris), Hr = *Hognia radiata* (jaune), Sc = *Scolopendra cingulata* (bleu marine), Ab = Assassin Bug (vert).

Une dernière observation est alors effectuée le lendemain, soit 24 heures après l'injection de venin. Les observations personnelles relient une mortalité plus importante (d'au moins une abeille) pour l'ensemble des venins testés, mais pas pour la condition contrôle. Des données allant de 130 minutes à 24 heures, manquent ici et doivent être approfondies afin d'observer les abeilles pouvant récupérer ou non.

Pour les expériences suivantes, les abeilles sont injectées avec la toxine d'intérêt à différentes concentrations afin de déterminer la dose létale 50 (DL₅₀, concentration amenant à 50% de mortalité). Enfin, la toxine à 30 µM est sélectionnée pour des tests comparatifs en présence de la ω-atracotoxine (toxine d'araignée bloquant les canaux calciques d'insectes (Chong et al., 2007)) à différentes concentrations sont réalisés. La concentration à 1 mM étant rapidement létale pour les abeilles, seuls les résultats de l'Expérience 5 (toxine d'intérêt à 30 µM VS ω-atracotoxine à 100 µM) sont publiés dans l'article découlant de cette collaboration (Drukewitz et al., 2018).

Chacune des deux toxines est testée sur au minima quatre lots de cinq abeilles provenant de la même ruche et durant la même semaine. Les résultats (Figure 54) présentent le pourcentage d'abeilles affectées (présentant des problèmes moteurs pouvant aller à la mort) en fonction de la toxine testée. Par rapport aux abeilles contrôles, le pourcentage d'abeilles affectées avec la toxine d'intérêt U-Asilidin1-Mar1a à 30 µM ou la ω-atracotoxine à 100 µM, est significativement différent avec une hausse d'environ 60%, et de plus de 90% d'abeilles

affectées, respectivement. En revanche, aucune différence significative n'est mise en évidence entre les deux toxines.

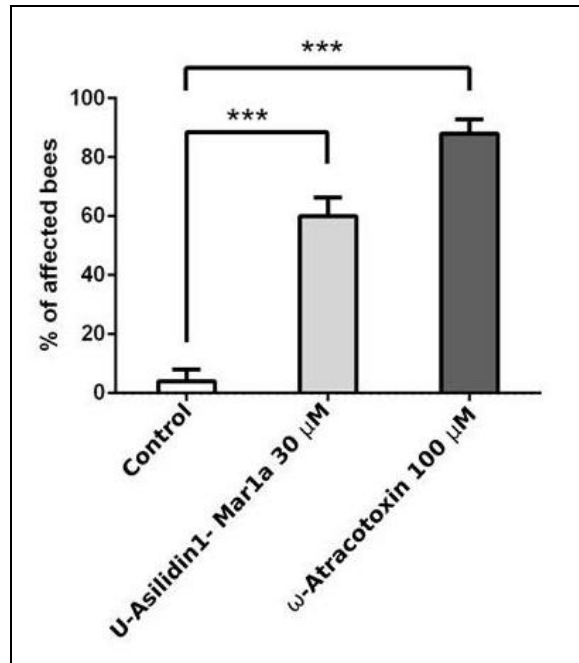


Figure 54 : Résultats obtenus en présence de la toxine U-Asilidin1-Mar1a à 30 µM et ω-atracotoxine à 100 µM par injection au niveau de l'ocelle des abeilles *Apis mellifera*. Injection d'environ 200 nL de venin par abeille à 1 mg/mL, sur cinq abeille par condition testée. La toxine d'intérêt montre une différence significative par rapport aux abeilles contrôles (injectées avec de l'eau), avec un pourcentage d'abeilles affectées de plus de 60%. Aucune différence significative n'est révélée par rapport aux abeilles injectées avec la ω-atracotoxine à 100 µM.

La toxine U-Asilidin1-Mar1a affecte ainsi les abeilles de façon rapide avec des effets délétères évidents (mouvements lents, perte d'orientation, paralysie, mort), suggérant une toxicité neuronale et/ou musculaire chez les insectes.

Ces résultats ont été publiés dans le journal *Toxins*, le 5 janvier 2018 (Drukewitz et al., 2018).

E. Conclusion

La famille des canaux ioniques est constituée dans son intégralité de diverses sous-unités codées par environ 100 gènes. Parmi plus de 25 gènes testés au laboratoire, les premiers tests électrophysiologiques (sur poste manuel) ont tout d'abord permis de caractériser trois sous-unités d'intérêt : Ca_v3 et Ca_v4 pour l'abeille *Apis mellifera*, et la sous-unité RDL du récepteur GABA chez l'abeille, le puceron *Acyrtosiphon pisum* et le varroa *Varroa destructor* (Cens et al., 2015; Gosselin-Badaroudine et al., 2016; Jones and Sattelle, 2006; Ménard et al., 2018; del Villar and Jones, 2018). La mise en évidence des potentiels de demi-activation (V_{act}) et demi-inactivation (V_{inac}) a révélé une différence de cinétique pour les canaux Ca_v3 et Ca_v4 d'abeille, s'activant à bas et haut seuil, respectivement. Le canal Ca_v3 présente encore un rôle méconnu à l'heure actuelle, avec une pharmacologie peu référencée, tandis que son homologue Ca_v4 se montre être un canal « hybride » présentant une séquence de type Na_v (Gosselin-Badaroudine et al., 2015, 2016). En effet, bien que celui-ci ait été discriminé en premier lieu comme canal sodique, les résultats obtenus dans ce projet, ainsi que ceux publiés dans la littérature permettent de confirmer que le canal Ca_v4 est de type calcique (Gosselin-Badaroudine et al., 2016). Les analyses effectuées sur les canaux de mammifères ont mis en avant une homogénéité de réponse entre certains canaux ioniques de vertébrés et invertébrés. Cette proportion de sous-unités caractérisée reste en revanche minime pour les essais de venins envisagés, et cette étude est ici incomplète et mérite d'être développée. L'utilisation du robot HiClamp® a servi ensuite à effectuer cette même technique de double électrode et potentiel imposé mais de manière automatisée. Les premiers tests de dose-réponse sur les sous-unités RDL d'abeille et de puceron ont révélés une différence de réponse d'un facteur deux entre les techniques, manuelle et automatisée. Ces résultats se situant dans les mêmes gammes de valeur (entre 10 et 20 μM), ceux-ci nous ont permis de confondre le robot HiClamp® comme outil de criblage recevable pour les tests suivants. Les expériences réalisées en présence de composés insecticides (fipronil et picrotoxine) sont en accord avec les données de la littérature (Ménard et al., 2018; del Villar and Jones, 2018), révélant le caractère particulièrement affin de ces composés, avec une absence de différence inter-espèces sur les récepteurs cibles. Cependant, les tests effectués sur les canaux Ca_v3 et Ca_v4 d'abeille ont montrés que l'utilisation de ce robot reste limitée aux canaux dépendants d'un ligand et ne peut être utilisé avec les canaux dépendants du potentiel due à l'apparition

systematique d'un artefact, comme vu dans cette étude. Dès lors, les analyses effectuées n'ont pas permis de confirmer les effets et la toxicité de ces composés insecticides sur ce type de canaux. Ces premières analyses sur les canaux ioniques d'insectes pollinisateurs et nuisibles (caractérisation et tests de dose-réponse en présence de composés insecticides) développées durant ce projet de thèse, et l'utilisation d'un robot automatisé, représentent un premier pas dans la recherche de composés plus sélectifs. Il est également à noter que certaines sous-unités de canaux ou récepteurs ont montrées une expression difficile dans les systèmes d'expression hétérologue, rappelant la nécessité d'utiliser des protéines chaperonnes adaptées (Halevi et al., 2002, 2003; Lansdell et al., 2005; Millar, 2009; Rousset et al., 2015). Le récepteur ACh notamment, n'a pu être étudié durant ce projet de par son expression faible au sein des ovocytes de xénope, avec des courants particulièrement petits (de l'ordre de 200 μ A). La combinaison de canaux ioniques en présence de ces protéines permettra notamment d'obtenir une meilleure expression et ainsi envisager des études plus approfondies dans la caractérisation de molécules sélectives de ceux-ci.

Les premiers tests de venins effectués sur le robot HiClamp[®] pour des projets collaboratifs, ont permis dans un premier temps de mettre en évidence la concentration d'inhibition moyenne (IC_{50}) de la conotoxine U-Asilidin1-Mar1a et ses trois analogues cycliques, dévoilant une forte affinité et une similarité d'action sur le récepteur ACh musculaire de poisson zèbre (Giribaldi et al., 2018). Les tests suivants effectués *in-vivo* en présence de la toxine U-Asilidin1-Mar1a et différents autres venins ont révélés une forte toxicité de cette toxine d'intérêt. Les tests électrophysiologiques effectués sur les canaux calciques (Ca_v3 et Ca_v4) et récepteur GABA (sous-unité RDL) d'abeille, ainsi que sur les sous-unités Ca_v2 de mammifère, ont alors montrés une absence d'effet de cette toxine sur ces divers canaux ioniques d'invertébrés et vertébrés. Ces résultats suggèrent que de nouvelles familles de peptides peuvent également abriter des activités neurotoxiques, sur des canaux et/ou récepteurs non étudiés ici. Les venins d'asilides (peu étudiés jusqu'alors) apparaissent donc comme une potentielle nouvelle source d'outils moléculaires ainsi que de susceptibles molécules précurseurs, pour le développement de produits thérapeutiques et agrochimiques. Les résultats obtenus lors de ce projet de thèse, parfois publiés depuis (Drukewitz et al., 2018), constituent une base pour de futures études dans la compréhension des mécanismes d'action des toxines des arthropodes au niveau des canaux ioniques d'insectes, mais également à exploiter cette source de potentielles molécules efficaces.

CHAPITRE 2 : ANALYSES PROTEOMIQUE ET TRANSCRIPTOMIQUE DU VENIN DE *LYCOSA TARANTULA*.

A partir des extractions de venin brut et d'ARNm de *Lycosa tarantula* (voir Résultats, chapitre 1 -Tableaux 15 et 16-), des études de protéomique et transcriptomique ont été entreprises. La protéomique est l'étude du protéome (ensemble des protéines d'un organisme, tissu, cellule, compartiment cellulaire...), tandis que la transcriptomique s'intéresse à l'ensemble des ARNm issu de la transcription du génome (transcriptome). Le Dr Dominique KOUA (contrat post-doctoral, IBMM, Montpellier) a ainsi mis en place un logiciel bioinformatique d'analyse transcriptomique (non-accessible au public) nommé VenUM. Ce site permet notamment d'effectuer de nombreux paramètres dédiés à l'analyse des venins, tels que la recherche ou l'alignement de séquences, à partir de données déjà connues sur des espèces venimeuses. Cet outil d'analyses multiples rend alors l'étude des venins plus aisée, en facilitant la discrimination de peptides et acides aminés d'intérêts. De nombreux alignements de séquence ont ainsi pu être mis en évidence à partir du venin de *Lycosa tarantula*, et les constituants de ce venin ont également été discriminés afin de pouvoir les regrouper par famille.

L'ensemble des différentes analyses et résultats obtenus est rassemblé dans l'article ci-après, soumis au journal *Toxins* en mai 2020.

Proteotranscriptomic insights into the composition of *Lycosa tarantula* venom

Dominique Koua^{1#}, Rosanna Mary^{2#}, Anicet Ebou¹, Celia Barrachina³, Khadija El Koulali⁴, Guillaume Cazals², Pierre Charnet² and Sebastien Dutertre^{2*}

¹ Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny, BP 1093 Yamoussoukro, Cote d'Ivoire

² Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, Univ Montpellier, CNRS, 34095 Montpellier, France

³ MGX, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

⁴ BioCampus Montpellier, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

#Joint first authors

*Corresponding author

Abstract

Spider venoms represent an original source of novel compounds with therapeutic and agrochemical potential. Whereas most of the research efforts have focused on large mygalomorph spiders, araneomorph spiders are equally promising but require more sensitive and sophisticated approaches given their more limited size and reduced venom yield. Belonging to the latter group, the genus *Lycosa* (“wolf spiders”) contains many species widely distributed throughout the world. These spiders are ambush predators that do not build webs but instead rely strongly on their venom for prey capture. *Lycosa tarantula* is one of the largest species of wolf spider, but its venom composition is unknown. Using a combination of RNA sequencing of the venom glands and venom proteomics, we provide the first overview of the peptides and proteins produced by this iconic Mediterranean spider. Beside the typical small disulfide rich neurotoxins, several families of proteins were also identified, including CRISP and Hyaluronidases. Proteomic analysis of the electrically stimulated venom validated 33 of these transcriptomic sequences, including 9 putative neurotoxins and 8 venom proteins. Interestingly, LC-MS venom profiles of manual versus electric stimulation, as well as female versus male, showed some marked differences in mass distribution. Finally, we also present some preliminary data on the biological activity of *L. tarantula* crude venom.

Keywords: spider, toxins, proteomics, transcriptomics, electrophysiology, France.

1. Introduction

Animal venoms consist of a complex mixture of bioactives, including small molecules, peptides and proteins (Klint *et al.*, 2012; Saez *et al.*, 2010; Vetter *et al.*, 2011). These natural libraries of compounds have evolved to target specific ion channels and receptors, and they are now actively being mined to discover new pharmacological probes but also potential drug and eco-friendly agrochemical candidates (Prashanth *et al.*, 2014). Among the venomous arthropods, spiders represent one of the most speciose invertebrate group, with more 48,000 species described to date (Saez *et al.*, 2010). Spiders can be found in very diverse environments, having adapted to nearly all ground level niches, up to high in the canopy as well as under water (dos Santos *et al.*, 2009). One of the reason for the evolutionary success of spiders comes from their ability to produce complex venom to protect themselves from predators (defense), and to facilitate prey capture (predation) (Casewell *et al.*, 2013; King, 2004). Spiders are broadly divided into the mygalomorphs (“ancient spiders”) and the araneomorphs (“modern spiders”), the latter containing the vast majority of described species, (with approximately 39000 species or >90 % of all spiders).

Whereas many araneomorph spiders have evolved web-building skills to facilitate prey capture, some remain active hunters and rely on speed and fast acting venom to subdue their prey. From the latter group, the wolf spiders (Lycosidae) are widely distributed across the globe, with more than 2300 described species (Piacentini and Ramírez, 2019). *Lycosa tarantula* is one of the largest representative of the Lycosidae family in the Mediterranean basin (Planas *et al.*, 2013), reaching a body length of 30 mm. It lives in burrows up to 40 cm deep, which ends with a “turret” made of twigs, plant debris and small pebbles agglomerated with silk (Figure 1), from which the spider will ambush passing prey. It is found in southern Europe, including France, but also Italy, where this legendary spider was wrongly held responsible for the “tarantism”. A bite from this “tarantula” was supposed to cause a state of lethargy that may lead to death, and affected victims had to dance the “tarantella” if they were to survive (Corral-Corral and Corral-Corral, 2016). It was later suggested that the true culprit was likely the local black widow (*Latrodectus tredecimguttatus*). Remarkably, although locally common in Mediterranean regions and relatively large, the venom of *L. tarantula* is still mostly unknown. Despite being considered harmless to humans, early experiments from naturalist Jean-Henri Fabre demonstrated that its venom can have deleterious effects on small vertebrates (Fabre, 1882). Indeed, a young sparrow and a mole bitten by an adult *L. tarantula* would both succumb to the effect of its venom in less than 48 h, suggesting that this species should be treated with respect.

Lycosa tarantula

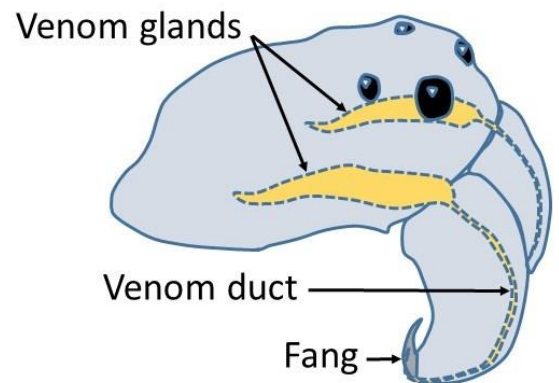


Figure 1. Adult female *Lycosa tarantula* specimen (top left), typical burrow entrance (top right) and localization of the venom glands (bottom panels).

Accordingly, the venom of other large Lycosidae such as *L. singoriensis* was shown to affect vertebrate's physiology, including the contraction of a frog's heart and the rat vas deferens (Liu *et al.*, 2009). However, the class of toxins responsible for these biological effect are unknown, and the full toxin repertoire produced by a *Lycosa* spider remains unclear. Although the venom gland transcriptomes of *L. singoriensis* (Zhang *et al.*, 2010) and *L. vittata* (Zhang *et al.*, 2015a) have been obtained via traditional Sanger sequencing, the high throughput next generation sequencing technologies have been applied to only one species to date, namely *Pardosa pseudoannulata* (Huang *et al.*, 2018). Yet, combination of venom gland transcriptomics and venom proteomic analysis has not been reported for any Lycosidae. Thus, we provide here our in-depth analysis of the venom composition of *L. tarantula* using an integrated proteotranscriptomic approach. Bioinformatic-based identification of putative toxin-like and protein sequences coupled to LC-MS/MS proteomic analysis of the electrically-stimulated venom provide an important resource for a better understanding of the biology of *L. tarantula* and for the mining of novel pharmacological compounds of interest.

2. Material and Methods

2.1. Spiders, venom collection and venom gland dissection

Twelve specimens, including 2 mature males and 10 adult females of *Lycosa tarantula* were collected in the scrublands around Montpellier, France. These spiders (except males, caught wandering in open areas) were lured out of their burrow using a small stick wiggling around the entrance and caught into plastic jars. Specimens were then individually isolated in small boxes and maintained in the laboratory at room temperature. They were watered twice a week and fed once a week with commercially available mealworms.

To collect the venom from these specimens, two methods were used. First, a “manual stimulation” was applied similar to that described by Liu ZH *et al.* (Liu *et al.*, 2009), where each spider was presented with a piece of soft tubing (0.5 cm in diameter) and aggravated with tweezers to trigger a bite. Venom drops deposited on the tube were recovered using a pipette and diluted in distilled water. Electrostimulation was also carried out on several specimens ($n > 7$) using an electric venom extractor based on the Arduino® Mega 2560 board, specifically designed for the extraction of venom from arthropods and other small size animals (Besson *et al.*, 2016). Spiders were not fed for at least a week prior to the milking session. Specimens were anesthetized before milking (with 5% CO₂). Chelicerae were stimulated by electrical impulses (3 to 7 V and approximately 0.5 to 2 A) discharged in a 2 seconds "working time" and 2 seconds of "rest time" steps. Released venom was collected from the tip of the fangs using a pipette and transferred to a 1,5 ml microcentrifuge tube containing approximately 20 µl of distilled water. Protein concentration of the venom samples were assessed using a nanophotometer N60 (Implen GmbH, München, Germany). Venom collected from individual spiders was pooled, freeze-dried and stored at -20 °C for subsequent use (proteomic characterization and electrophysiology).

To obtain the amount of mRNA required for the transcriptome sequencing, the venom glands of 6 anaesthetized spiders were dissected on ice and placed in a 1.5 ml microcentrifuge tube containing 500 µL of Lysis Buffer. Next, the mRNA was extracted using a commercial kit (Magnetic mRNA isolation kit, Biolabs) following the manufacturer’s instructions. After extraction, the mRNA concentration was measured using a nanophotometer N60 (Implen GmbH, München, Germany).

2.2. Library preparation and Illumina sequencing

RNA-Seq libraries were constructed with the Truseq stranded mRNA sample preparation (Low throughput protocol) kit from Illumina (San Diego, California, U.S.A.). Depending on the samples, 100 or 200 ng of mRNA was used for the construction of the libraries. Next, the mRNA is fragmented into small pieces using divalent cations under elevated temperature. The cleaved RNA fragments are copied into first strand cDNA using SuperScript II reverse transcriptase, Actinomycin D and random hexamer primers. The second strand cDNA was synthesized by replacing dTTP with dUTP. These cDNA

fragments have the addition of a single 'A' base and subsequent ligation of the adapter. The products are then purified and enriched with 15 cycles of PCR. The final cDNA libraries were validated with a Fragment Analyzer (Agilent Santa Clara, CA) and quantified with a KAPA qPCR kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA).

The transcriptome of *L. tarantula* was sequenced as part of a larger project comprising 15 other venom gland transcriptomes. On 3 sequencing lanes of V2 flowcells, the 16 libraries were pooled in equal proportions, denatured with NaOH and diluted to 18 pM before clustering. Cluster formation, primer hybridization and single-end read, 125 cycles sequencing were performed on cBot and HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA) respectively.

Image analysis and base calling were performed using the HiSeq Control Software and Real-Time Analysis component. Demultiplexing was performed using Illumina's sequencing analysis software. The quality of the data was assessed using FastQC from the Babraham Institute and the Illumina software SAV (Sequence Analysis Viewer). Potential contaminants were investigated with the FastQ Screen software from the Babraham Institute.

2.3. Bioinformatics sequence analysis (DK)

Data issued from the sequencing platform were trimmed using the trinity trimmomatic tool with default parameters. Reads were assembled using the trinity software (version 2.1.1), and assembled reads were then annotated using the following procedure. An in-house database composed of all spiders toxins from Arachnoserver, UniprotKB/SwissProt and Venomzone were created using makeblastdb of BLAST+ package after redundancy removal using CD-HIT (Fu *et al.*, 2012; Li and Godzik, 2006) at the threshold of 1,00. Contigs were submitted to a first BLAST step against this database to provide an annotated subset of the transcriptome. The annotated contigs were then BLASTed against the whole Swissprot/Uniprot database to confirm the exactitude of the recorded hits (BlastP against UniProtKB with e-threshold = 0.0001; matrix BLOSUM-62, non-filtering and gapped; UniProtKB/SwissProt 2019_03). Next, hits were classified into toxins family using Ekenda classifiers and hmmcompete (Koua and Kuhn-Nentwig, 2017). Signal Peptide and propeptide were predicted using respectively SignalP (Almagro Armenteros *et al.*, 2019) and SpiderP (Pineda *et al.*, 2018).

A final manual validation step was performed: sequence alignments using MAFFT (Katoh and Standley, 2013), variant identification, cleavage site prediction. All obtained contigs as well as their corresponding reads referring to venom gland-specific proteins, (putative) neurotoxins, and peptides, were further analyzed on the nucleotide level to detect transcript isoforms. Nucleotide sequence variants that obviously resulted from sequencing errors/frame shifts were excluded.

2.4. Proteomics (SD)

2.4.1. Liquid chromatography coupled mass spectrometry (LC-MS)

RP-UPLC was operated on an Acquity H-Class ultrahigh performance liquid chromatography (UPLC) system (Waters, Corp., Milford, MA, United States) fitted with a UV detector (PDA detector) under the control of Waters MassLynx software (version 4.1). Separation of the *L. tarantula* venom (~600 µg) was achieved using a Kinetex C₁₈ 100 Å column (2.1 x 150 mm, 3 µm) fitted with a pre-column. Elution was carried out using a gradient of 0-80% B (0.1% formic acid in ACN) in 80 min. Samples eluting from the UPLC were introduced into the mass spectrometer at a flow rate of 500 µl/min. Acquisitions were carried out over the range 50 Da to 1800 Da m/z every 0.1 second on a Synapt-G2-S high-definition MS system (Waters, Corp., Milford, MA, United States). To obtain the molecular masses of the venom components eluting between 0 and 40 min, each peak from the total ion current (TIC) chromatogram was analysed with Waters Mass Lynx software (version 4.1).

2.4.2. Shotgun proteomics (LC-MS/MS)

Prior to shotgun proteomics, venom protein extracts are denatured, reduced and alkylated. Briefly, each sample (~50 µg) was dissolved in 89 µL of triethylammonium bicarbonate (TEABC) 100 mM. One microliter of DTT 1 M was added and incubation was performed for 30 min at 60 °C. A volume of 10 µL of IAA 0.5 M was added (incubation for 30 min in the dark). Enzymatic digestion was performed by addition of 2 µg trypsin (Gold, Promega, Madison USA) in TEABC 100 mM and incubation overnight at 30 °C. After completing the digestion step, peptides were purified and concentrated using OMIX Tips C18 reverse-phase resin (Agilent Technologies Inc.) according to the manufacturer's specifications. Peptides were dehydrated in a vacuum centrifuge.

Samples were then subjected to nano-flow liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (NanoLC-MS/MS). Samples were resuspended in 20 µL formic acid (0.1%, buffer A) and 1 µL was loaded onto an analytical 25 cm reversed-phase column (75 mm inner diameter, Acclaim Pepmap 100® C18, Thermo Fisher Scientific) and separated with an Ultimate 3000 RSLC system (Thermo Fisher Scientific) coupled to a Q Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific) *via* a nano-electrospray source, using a 123-min gradient of 6 to 40% of buffer B (80% ACN, 0.1% formic acid) and a flow rate of 300 nl/min. MS/MS analyses were performed in a data-dependent mode. Full scans (375 – 1,500 m/z) were acquired in the Orbitrap mass analyzer with a 60,000 resolution at 200 m/z. For the full scans, 3 x 10⁶ ions were accumulated within a maximum injection time of 60 ms and detected in the Orbitrap analyzer. The twelve most intense ions with charge states ≥ 2 were sequentially isolated to a target value of 1 x 10⁵ with a maximum injection time of 45 ms and fragmented by HCD (Higher-energy collisional dissociation) in the collision cell (normalized collision energy of 28%) and detected in the Orbitrap analyzer at 30,000 resolution.

2.4.3. Bioinformatic integration of proteomic and transcriptomic data

PEAKS Studio 8.5 (Bioinformatics solutions, Waterloo, ON, Canada) a *de novo* assisted database software was used to match MS/MS spectra obtained from proteomic analysis of *L. tarantula* venom to our personalized database resulting from the assembled venom gland transcriptome translated into the six reading frames. Carbamidomethylation was set as fixed modification, while oxidation (M) was set as variable modifications, with maximum missed cleavages at 3 for trypsin digestion. Parent mass and fragment mass error tolerance were set at 5 ppm and 0.015 Da, respectively. False discovery rate (FDR) of 1% and unique peptide ≥ 2 were used for filtering out inaccurate proteins. A $-10\lg P > 120$ indicates that the detected proteins by enough reliable peptides MS/MS spectra. In order to identify more relevant sequences, the Spider algorithm from PEAKS Studio software was used to find additional mutations or to correct the sequences. This algorithm corrects the sequences stored in transcriptomic database with *de novo* sequences based on MS/MS spectra, which allowed us to identify PTM's and mutations. Minimum ion intensity for mutation and PTM's was set to 5%, and ALC score ≥ 90 for *de novo* sequences leading to low precursor mass error in order to identify reliable PTM's and potential mutations.

2.5. Electrophysiology

Ovaries were surgically removed from *Xenopus laevis* female, anaesthetised using a 0.2% MS222 solution (Sigma, France). After a first mechanical dissociation and extensive washing using the OR-2 solution (containing in mM: NaCl, 100; MgCl₂, 2; KCl, 2; HEPES, 10), oocytes were isolated by approximately 2 hours enzymatic dissociation using 1 mg/ml collagenase IA (Sigma) dissolved in OR-2. Oocytes were then washed several times with OR-2 and selected in the survival medium (containing in mM: NaCl, 96; MgCl₂, 2; KCl, 2; CaCl₂, 1.8; HEPES, 10; pyruvic acid, 2.5; gentamycin, 50 ~tg/ml; neutralised at pH 7.2 using NaOH).

Oocytes injection was performed in the equatorial region by employing a home-made pneumatic injectory. *Xenopus* oocytes were microinjected with RNA corresponding to the AmCaV4 channel (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) of domestic honeybee, *Apis mellifera*. About 40 oocytes were injected with 1 μl of solution, and these injected oocytes were incubated at 18°C in OR2 solution for at least 24 h for 2-7 days at 19°C under gentle agitation before recording. The survival medium was renewed daily.

Whole cell Ca²⁺ currents were recorded under two electrode voltage-clamp by employing the GeneClamp 500 amplifier (Axon Inst., Burlingame, CA). Current and voltage electrodes were filled with a solution containing: KCl 3M; KOH. The bath-clamp headstage was connected to the bath using two agar bridges filled with 2 % agar in 3M KCl, and the extracellular solution (physiological solution) was BANT10 (BaOH : 10 mM, TEAOH 20% : 12 ml, NMDG : 30 mM ,CsOH : 2 mM, HEPES : 10 mM, pH = 7.2 with methane sulfonate). Injection of BAPTA (in mM: BAPTA-free acid (Sigma), 100; CsOH, 10; HEPES, 10; pH 7.2) into oocytes was performed using a third microelectrode (in order to

eliminate any Ca²⁺-activated Cl current). Under these conditions uncontaminated Ca²⁺ currents can be recorded. Ca²⁺ currents were elicited by series of depolarising steps of 400 ms duration from a holding potential of - 100 mV, to 10 mV every 10 seconds. Voltage-protocol and ionic currents were generated and recorded using the Clampex software (pClamp, ver 7.0, Axon Inst). Venom solution to be tested were prepared just prior to the experiment by adding the desired concentration in the BANT10 physiological solution. The different concentrations of venom (0.01, 0.1, and 1 μ M) were then applied manually in a static bath using a pipette delivering a dose from about 20 μ L.

The effect of administered venom was measured when steady state was reached (after about 1 to 2 min, i.e. 6-12 depolarisations) as a percentage of inhibition of the pic Ca²⁺ current amplitude recorded during a depolarizing pulse ranging of - 100 to 10 mV. IC₅₀ values were calculated from a nonlinear fit of the Hill equation to the data. Data are presented as means \pm S.E.M. from at least three oocytes.

3. Results

3.1. Major venom peptide and protein families retrieved from the venom gland transcriptome

To gain an unprecedented insight into the venom repertoire of *L. tarantula*, high throughput sequencing technology was employed to decipher the venom gland transcriptome. From the 28,793,065 raw Illumina reads obtained, and after the various preprocessing steps, a total of 389,316 contigs were assembled. To retrieve the venom related sequences, a blast search was carried out using procedure described in the method section. This automatic procedure allowed to retrieve and to annotate a total of 18 putative sequences from 10 structural families including both venom proteins and neurotoxin-like typical peptides (including cysteine-rich, neurotoxin-like and linear peptides) (Figure 2).

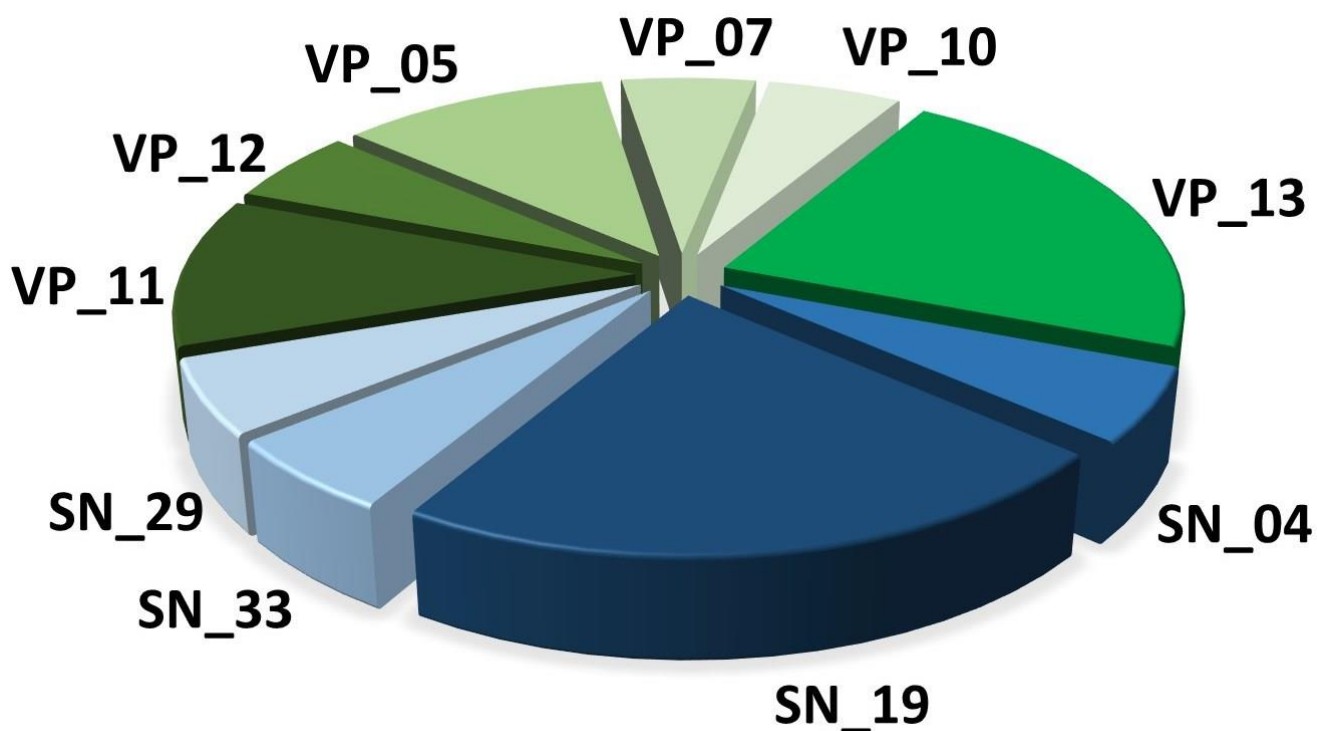


Figure 2. Representation of the 10 families of toxins and venom proteins from the venom gland transcriptome of *L. tarantula*.

Among the 10 distinct structural families of venom related sequences were 4 families of spider neurotoxins (SN) and 6 families of venom proteins (VP) (Table 1). Although classified into venom proteins, VP-11 and VP-12 families contains short and disulfide rich peptides. Therefore, we included these two families in the next section on the description of disulfide rich peptide toxins.

Table 1. Classification of putatives neurotoxins and venom proteins.

Family name	Family description	Number of contigs
SN_04	Omega-agatoxin superfamily	1
SN_19	Spider toxin CsTx superfamily	4
SN_33	CsTx-26	1
SN_29	Omega-lycotoxin family	1
VP_11	Spider WAP family	2

VP_12	Venom Kunitz-type family	1
VP_05	Hyaluronidase	2
VP_07	Angiotensine-converting Enzyme	1
VP_10	Venom Serine protease	1
VP_13	Cysteine rich secretory protein	4

3.1.1. Disulfide rich peptide toxins

In this section, the disulfide rich peptide toxins found in the transcriptome of *Lycosa tarantula* have been classified and named according to the nomenclature proposed by King *et al.* (King *et al.*, 2008a). The best matching sequence from BLAST search is aligned with each of the retrieved *L. tarantula* sequence for comparison.

- Family SN_04

One sequence (U1-lycotoxin Lt04a) exhibits high identity (93%) with U2-lycotoxin-Ls1b from the related *Lycosa singoriensis* (Fig 3). Both signal peptides (1-18) are identical, whereas the propeptide contains 5 substitutions that are mostly conservative (e.g. E>D or V>L). The predicted mature toxin (cleavage after residue 42) contains 8 cysteine residues arranged in a CX₆CXCX₆CXCX₁₁CXCX₁₃C pattern and shows only 2 substitutions compared to U2-lycotoxin-Ls1b, namely F72>L and a charge inversion K80>E. The biological activity of these toxins is unknown.

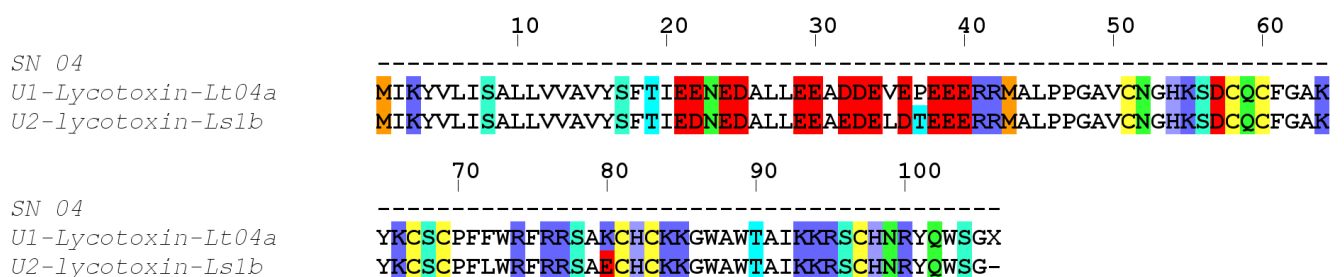


Figure 3. Sequence alignment between *L. tarantula* SN_04 sequence and the closest BLAST match. The letter X indicates a stop codon, confirming the precursor is complete.

- Family SN_19

Four sequences grouped into SN_19 family show high identity with several lycotoxins from *Lycosa singoriensis*. One sequence (U2-lycotoxin Lt19a) displays 86% identity to U3-lycotoxin-Ls1a, a second sequence (U2-lycotoxin Lt19d) 91% identity to U4-lycotoxin-Ls1a, a third sequence (U2-lycotoxin Lt19b) 92% identity to U1-lycotoxin-Ls1b and a fourth sequence (U2-lycotoxin Lt19c) 83% identity to U5-lycotoxin-Ls1a (Fig 4). Signal peptides and propeptides show various degrees of conservation, but the predicted mature toxins all contains 8 cysteine residues arranged in the same cysteine motif $CX_6CX_6CCX_8CXCX_{10-13}CXC$, justifying the grouping into one family. Interestingly, a rather long linear peptide is present at the C-terminal of all sequences. These peptides show the typical features of the cytolytic, antimicrobial peptides (AMPs) described in Lycosidae, namely an amphipathic distribution of hydrophobic and charged residues, and may be cleaved off during the maturation process.

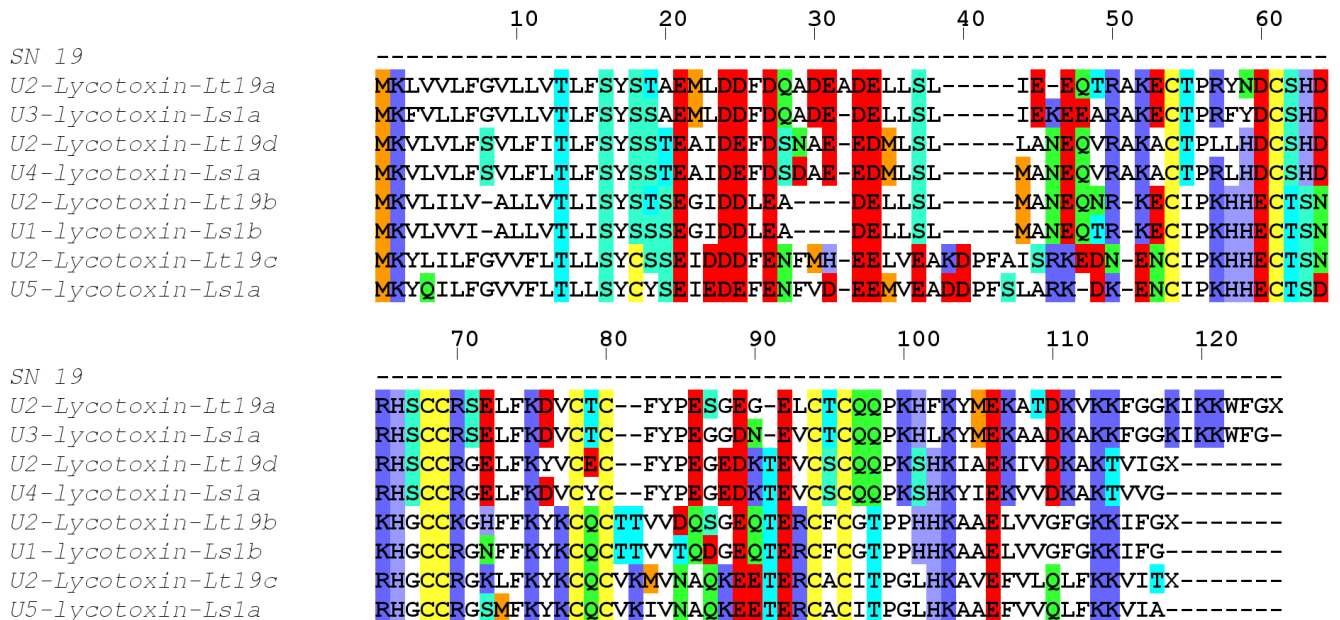


Figure 4. Sequence alignment between *L. tarantula* SN_19 sequences and the closest BLAST matches.

- Family SN_29

One sequence (U3-lycotoxin Lt29a) exhibited high identity (85%) with omega-lycotoxin-Gsp2671a from *Lycosa kazakhstanicus* (Fig 5). The signal peptides (1-17) and propeptides are highly similar and contain only few substitutions. The predicted mature toxin (cleavage after residue 40) contains 8 cysteine residues arranged in a $CX_6CX_6CCX_4CXCX_{15}CXC$ pattern and displays 7 substitutions

compared to omega-lycotoxin-Gsp2671a. Omega-lycotoxin-Gsp2671a was shown to specifically modulate P-type Ca²⁺ channels (Pluzhnikov K, Toxicon, 2007).

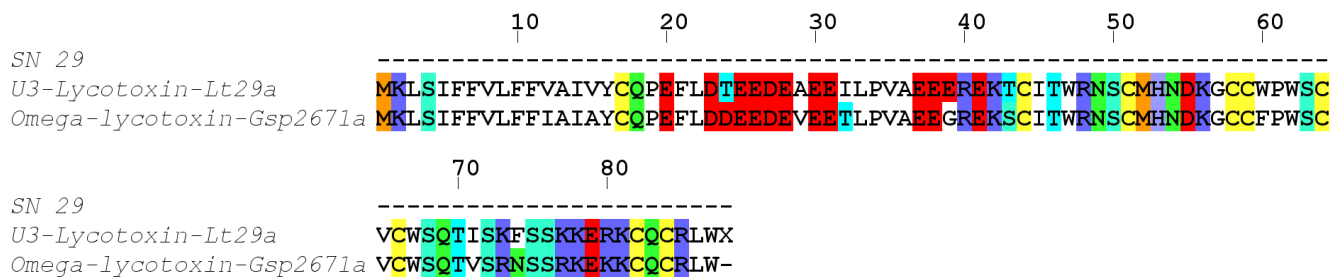


Figure 5. Sequence alignment between *L. tarantula* SN_29 sequence and the closest BLAST match.

- Family SN_33

One sequence (U4-lycotoxin Lt33a) exhibited high identity (71%) with toxin 26 from the American wandering spider (*Cupiennius salei*) (Fig 6). Despite both species being more distantly related, the signal peptides (1-25) are remarkably similar. After a relatively short propeptide, the predicted mature toxin (cleavage after residue 37) contains 8 cysteine residues arranged in a CX₆CX₄CCX₄CXCX₆CXC pattern.

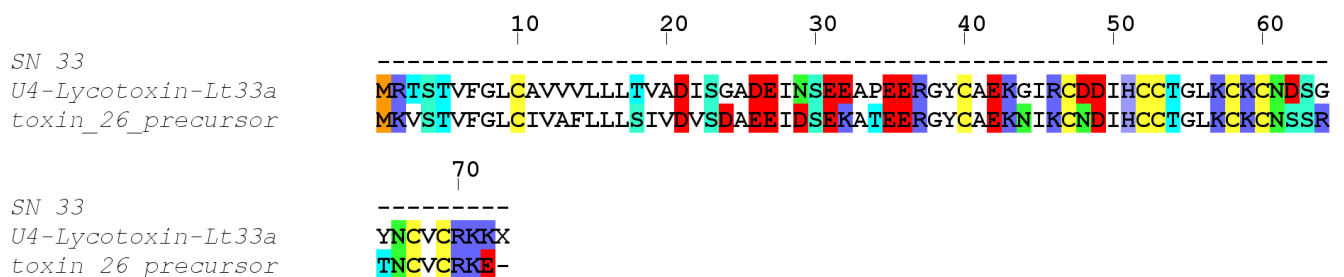


Figure 6. Sequence alignment between *L. tarantula* SN_33 sequence and the closest BLAST match.

- Family VP_12

One sequence (U6-lycotoxin Lt12a) shows only limited identity (45%) to Kunitz-type kappaPI-theraphotoxin-Hs1e from the Chinese bird spider (*Haplopelma schmidtii*) (Fig 7). Despite a low sequence identity for the signal and propeptide regions, the 6 cysteine residues of the mature toxin are conserved and arranged in a motif CX₈CX₁₃CX₇CX₁₂CX₃C.

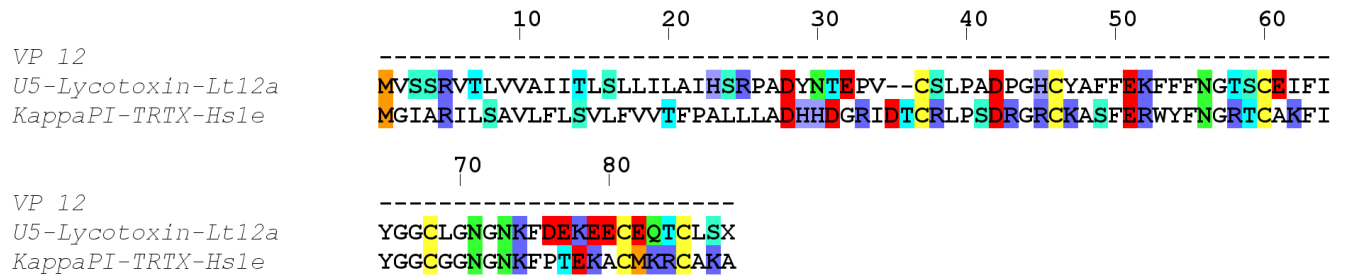


Figure 7. Sequence alignment between *L. tarantula* VP_12 sequence and the closest BLAST match.

- Family VP_11

Two uncomplete sequences (U6-lycotoxin Lt11a and U6-lycotoxin Lt11b) exhibit high identity with U15-lycotoxin-Ls1a (81%) and with U20-lycotoxin-Ls1c (83%) from *Lycosa singoriensis* (Fig 8). Both signal peptides (1-20) are moderately conserved and no propeptide is predicted. The mature toxins (cleavage after residue 20) contain 10 cysteine residues arranged in a CX₇CX₈CCX₄CX₅CCX₃CX₃CX₁₇C pattern.

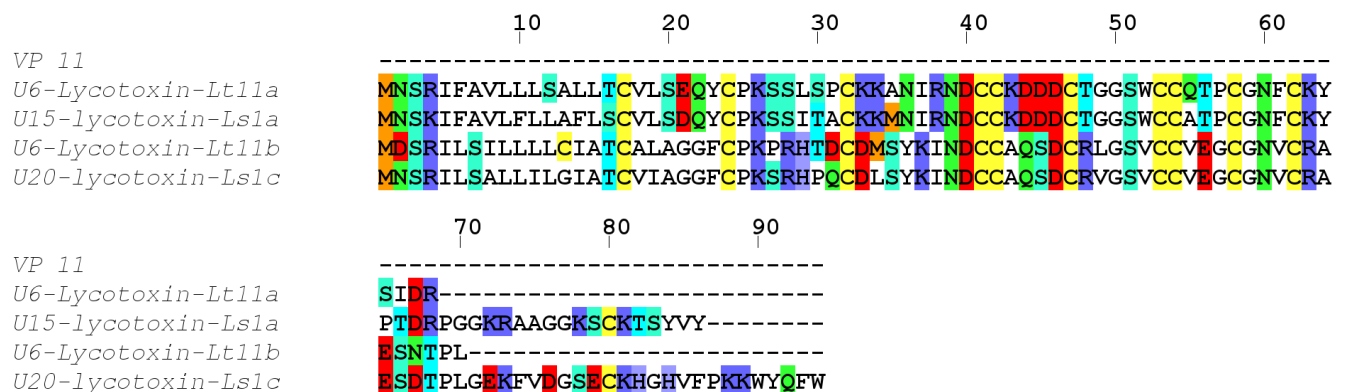


Figure 8. Sequence alignment between *L. tarantula* VP_11 sequences and the closest BLAST matches.

3.1.2. Venom proteins

In addition to the classic disulfide rich peptides, several sequences retrieved from *L. tarantula* venom gland transcriptome showed similarity with known venom proteins. These include hyaluronidase, angiotensine-converting enzyme, venom serine protease and cysteine rich secretory protein (table 1). The two partial hyaluronidase sequences identified shows 80-81% sequence identity to *Cupiennius*

salei hyaluronidase. One complete sequence matched (52%) a putative angiotensin converting enzyme precursor from *Carcinus maenas*. One partial sequence shows high sequence identity (97%) to a putative PQM protease precursor from *L. hispanica*, a sister species to *L. tarantula*. Finally, four partial sequences show similarity to cysteine rich secretory proteins. From these, three sequences display high sequence identity to *L. singoriensis*' venom allergen 5 proteins (81-91%), and one sequence shows moderate homology (62%) to a cysteine rich secretory protein 1 isoform a1 from *Cupiennius salei*.

3.2. Mass spectrometry analyses of *L. tarantula* venom

To gain further insights into the venom composition of *L. tarantula*, various mass spectrometry analyses were carried out, including comparative LC-MS of the electrically stimulated venom and the manually collected venom from male and female specimens. In addition, a full proteomic (LC-MS/MS) analysis was performed on the electrically stimulated venom in order to validate some transcriptomic sequences.

3.2.1. LC-MS of the electrically stimulated venom

The venom from several specimens of *L. tarantula* was collected via electrostimulation and pooled. Approximately 600 µg of venom was analyzed by LC-MS over 80 minutes. The overall TIC profile shows the highest complexity between 5 and 25 minutes (corresponding to 5-25 % acetonitrile), where most of the ions were detected (Fig 9). The calculated monoisotopic masses for the dominant ions in each peak are reported on Fig 9, and the distribution shows a majority of masses <3 kDa, and then between 5 to 9 kDa (Fig 11). Interestingly, the top 5 most intense peaks correspond to small molecular weight compounds, between 1500-2500 Da (2260.16 Da, 1660.96 Da, 2274.2 Da, 2213.34 Da and 2001.12 Da).

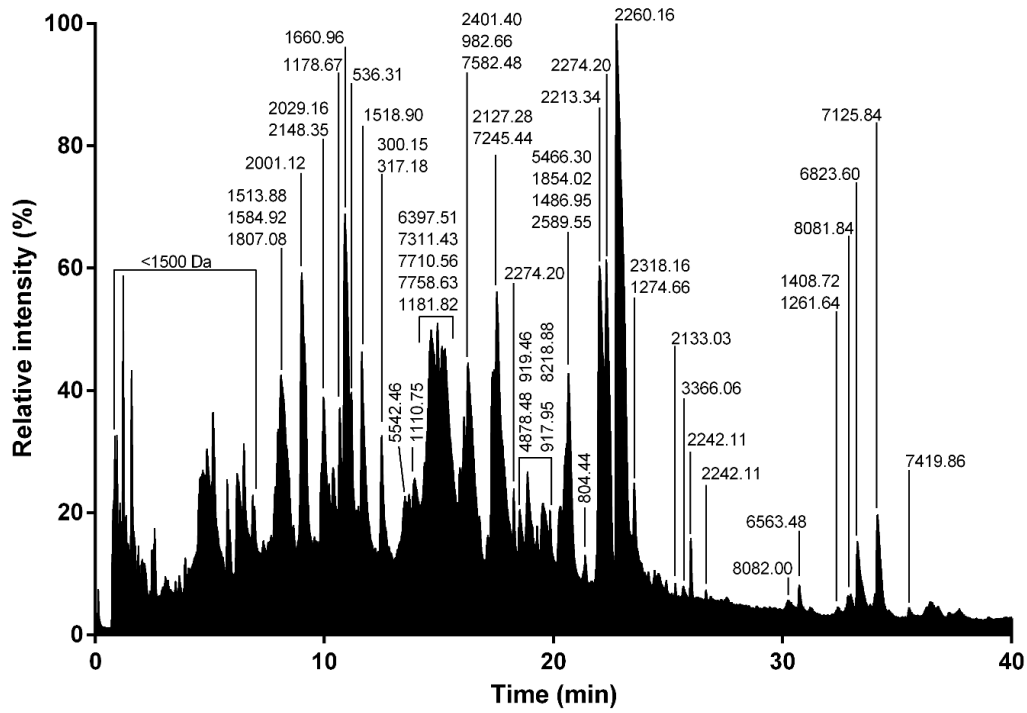


Figure 9: Total ion current trace of electrically stimulated (ES) *L. tarantula* venom. Major masses determined for each peak are indicated.

3.2.2. LC-MS of manually stimulated female vs male venom

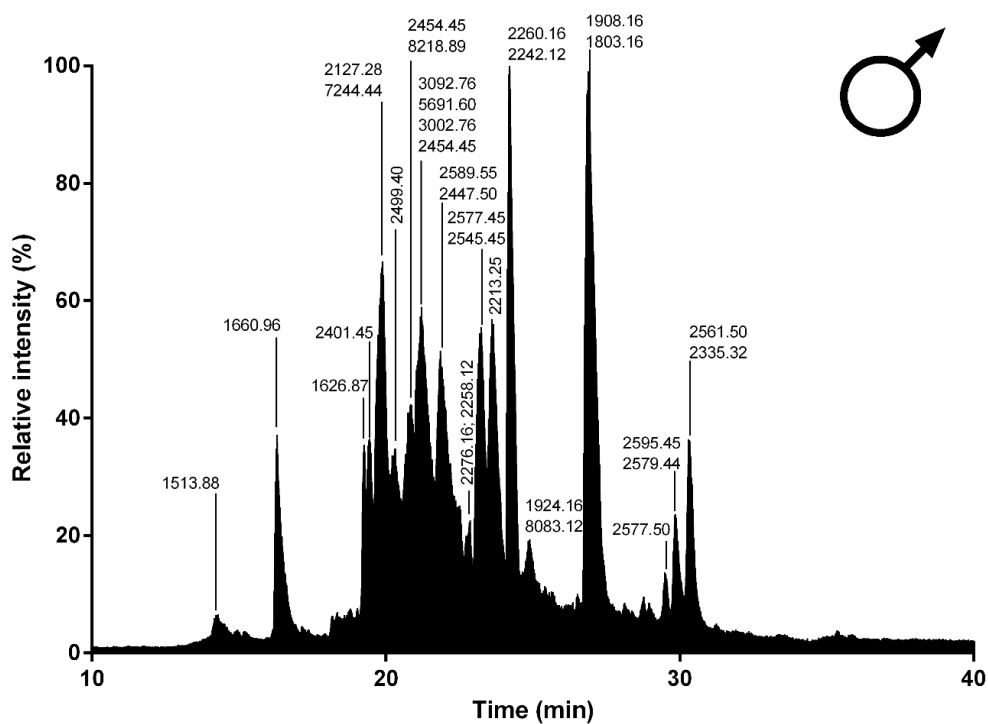
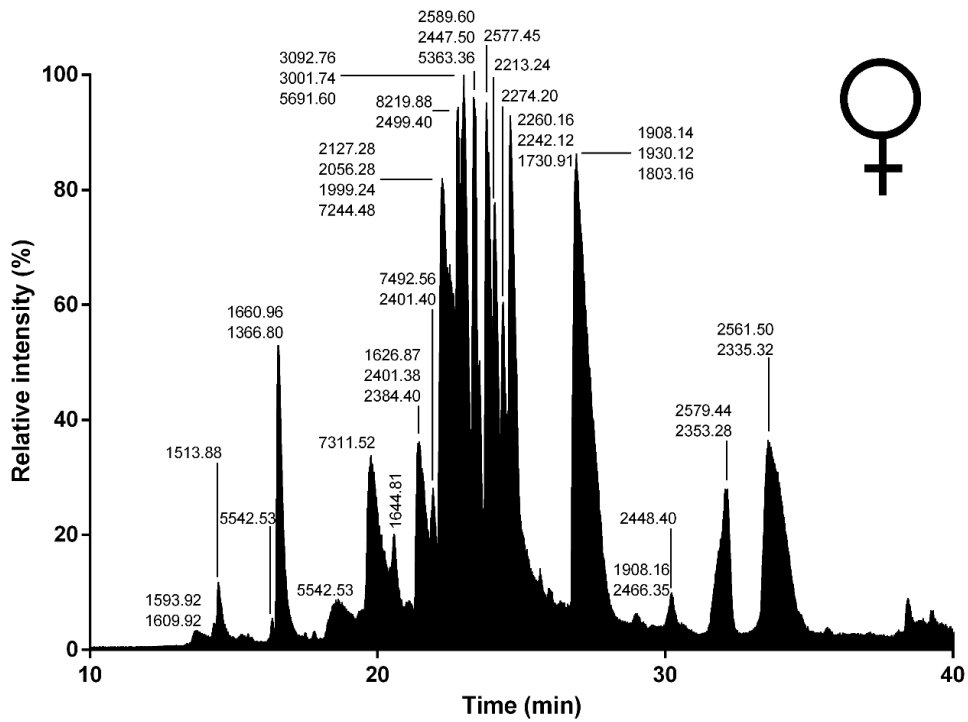


Figure 10: Total ion current traces of female and male *L. tarantula* venom. Representative traces of a single specimen (female, top panel and male, bottom panel). Major masses calculated for each peak are indicated.

Although more convenient and producing higher yields, electrostimulation can damage secretory cells, resulting in the collected venom being “contaminated” with unwanted cellular proteins. Therefore, in an attempt to collect venom reflecting a more natural composition, we used a manual stimulation, where the spiders are aggravated and induced to bite into a plastic tubing. The resulting defensive venom droplets recovered from both male and female specimens were analyzed using LC/MS. The most striking difference with the electrically stimulated venom profile lies in the reduced complexity, especially in the early eluting compounds (no distinguishable peaks < 10 min). Whereas the overall female vs male profiles show obvious similarities in terms of complexity and peak intensities, the underlying differences appear more evident when considering the calculated masses and their overlap. Indeed, although the mass distribution show a similar pattern, more than 50% of the masses detected in female venom were unique and not found in the male venom (Fig. 11). Interestingly, in both venoms, one of the most intense ion corresponds to a mass of 1908.14 Da (together with 1803.16 Da), which appears remarkably absent from the electrically stimulated venom.

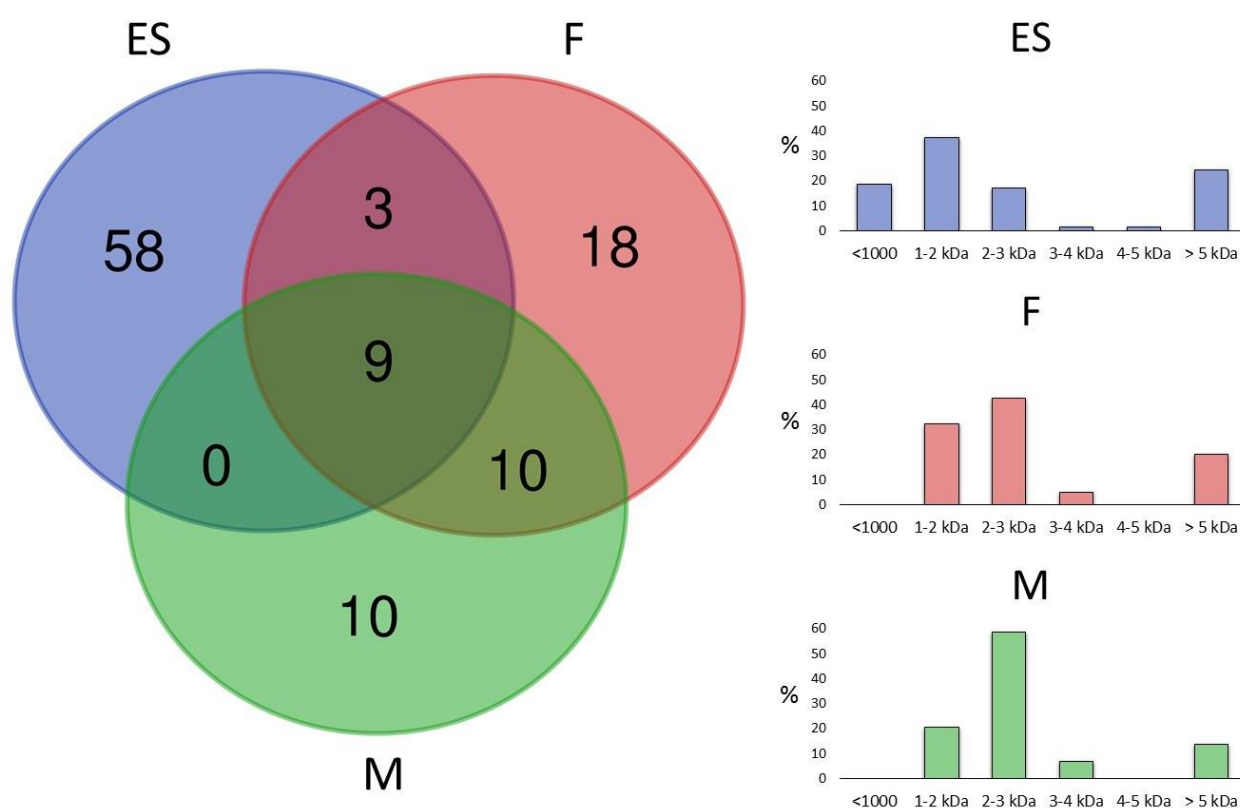


Figure 11: Venn diagram and mass distribution of electrically stimulated (ES), female (F) and male (M) *L. tarantula* venom. Left panel shows the overlap of masses between venom samples. Right panels show the mass distributions for each venom sample.

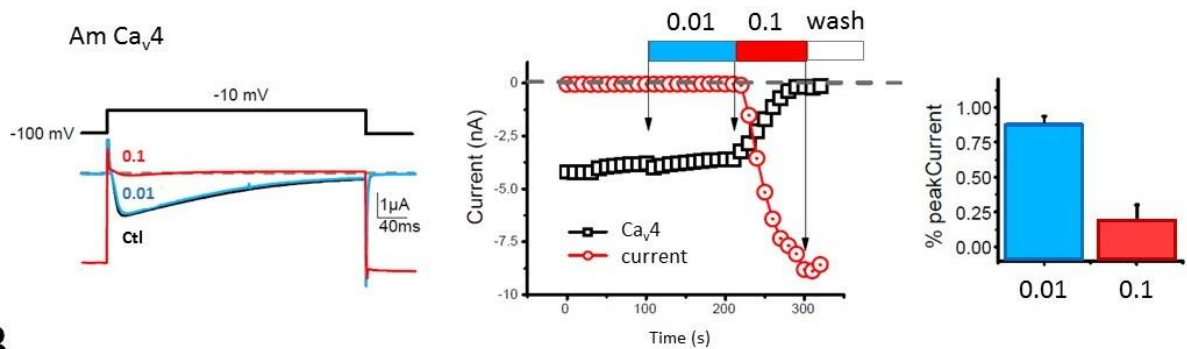
3.2.3. Proteomic analysis of the electrically stimulated venom

With the aim of identifying a maximum of the peptides and proteins present in the venom of *L. tarantula*, shotgun proteomics on a high resolution mass spectrometer was performed on the more complex electrically stimulated venom. After reduction, alkylation and trypsin digestion of the venom sample, the resulting peptides were fragmented, leading to the acquisition of 15,224 MS and 89,834 MS/MS scans, and further analyzed using PEAKS software. The search database was composed of our translated transcriptome, and a false discovery rate of 1% was applied. The results were filtrated in PEAKS Studio using stringent parameters, including Peptide -10lgP ≥ 24.6 , Protein -10lgP ≥ 20 , Proteins unique peptides ≥ 2 and De novo ALC Score $\geq 80\%$. Under these conditions, 33 proteins were identified (Table S1). Among the validated sequences, the short neurotoxin-like peptides are well represented, with 9 out the 10 sequences retrieved from the venom gland transcriptome that are validated. Overall, all disulfide rich peptide families were confirmed, except for the family VP_12 (Kunitz type U5-lycotoxin-Lt12a). Next, the venom proteins are also well represented in the venom, with 8 sequences validated, including all 4 CRISP (Venom allergen 5), 2 hyaluronidases, a putative PQM protease and a putative angiotensin converting enzyme. Finally, some ubiquitous cellular proteins were identified, namely several heat shock proteins, cytochrome, elongation factor, arginine kinase, glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase, actin as well as several sequences producing no significant match to known proteins.

3.3. Electrophysiology assay of bioactive peptides from *L. tarantula* venom (RM)

The biological activity of crude (electrically stimulated) *Lycosa tarantula* venom was investigated using a two-electrode voltage clamp method on honeybee Ca_v4 (DSC1) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. Upon application of 0.01 mg/ml diluted venom, no significant effect is observed, but at 0.1 mg/ml, the increase in the leak current is so strong that the oocyte cannot be properly clamped anymore, and thus value of the holding potential and the depolarization cannot be maintained, preventing the adequate measurement of the Ca current (Fig 12A). Suspecting that the venom strongly permeabilizes the oocyte membrane, the venom was also tested on non-injected oocyte. Indeed, application of 25 μ l of venom (1 mg/ml) produces a similar increase in holding potential, indicating that this effect is independent of the expression of Ca_v4. However, a significant difference between injected and non-injected oocytes appears upon washing of the venom. Whereas non-injected oocytes “recover” from the leak (holding potential back to baseline), the oocytes injected with honeybee Cav4 remain unable to restore their holding potential. These results suggest that *L. tarantula* venom may contain specific blockers of honeybee Ca_v4.

A



B

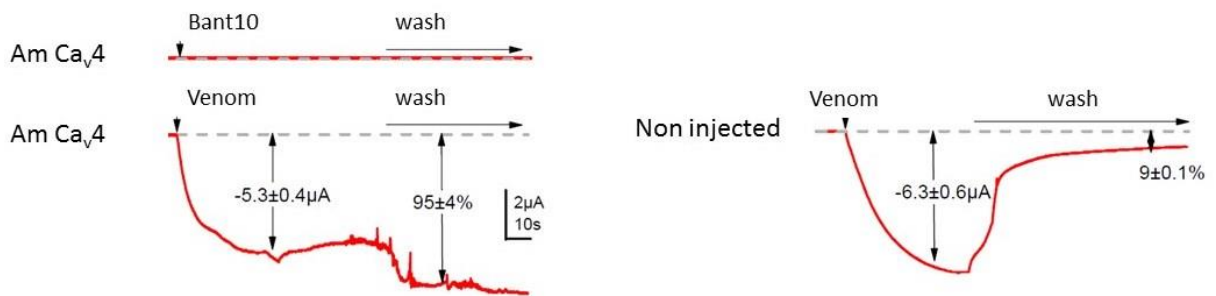


Figure 12: Biological effect of *L. tarantula* venom on *Apis mellifera* Cav₄ channel expressed in oocytes. A) Left panel shows the effect of *L. tarantula* venom on oocytes expressing the Cav₄ Ca²⁺ channel. Note the lack of effect at the 0.01 mg/ml dilution, and the strong increase in the holding current at the 0.1 mg/ml dilution. Middle panel represents the time course of the Ca²⁺ current and holding current amplitudes measured during the protocol shown in the left panel. On the right panel is shown the averaged effect on the peak Ca²⁺ current amplitude measured at the steady state or just before the wash. B) Effect of *L. tarantula* venom on Cav₄-expressing (left) or non-injected oocytes (right) recorded on the holding current without any channel stimulation (constant holding potential of -100 Mv). Top left panel shows the holding current recorded continuously without depolarisation in the Bant10 solution. The perfusion is stopped at the vertical arrowhead, a puff of 25 μl of Bant10 is applied in the recording chamber, without any effect, and the perfusion is started again at the horizontal arrow. Bottom left panel displays the same protocol applied but using 25 μl of the *L. tarantula* venom at 1 mg/ml instead of Bant10 solution. Note the big increase in the holding current and the lack of reversibility during the wash. Right panel shows the same protocol with a puff of *L. tarantula* venom at 1 mg/ml but applied to non-injected oocytes, with a similar increase in the holding current, indicating that this effect of the venom on the oocyte is independent of the expression of Cav₄.

4. Discussion

Spider venoms consist of complex mixtures of biologically active compounds that are for the most part gene encoded polypeptides and proteins. Therefore, combining venom gland transcriptomics with venom proteomics is a powerful method to accelerate the identification of full precursors and mature toxins for a better understanding of spider biology, venom-ecology relationships and for the mining of useful pharmaceutical and agrochemical molecules. In this work, we used such proteotranscriptomics strategy to provide the first insights into the venom of one of the largest Lycosidae spider found in the Mediterranean region, *Lycosa tarantula*. Automated bioinformatics analyses of the venom gland transcriptome revealed 18 venom-related sequences classified into 10 structural families. The disulfide rich neurotoxin-like peptides comprised 10 sequences from 6 families, whereas the venom proteins were grouped into 4 distinct classes. Besides these sequences, proteomics investigations also revealed the presence of common cellular proteins, confirming that electrically stimulated venom includes contaminants. Indeed, the manually stimulated venom from both male and female specimens showed a less complex LC-MS profile and a different mass distribution compared to electrically stimulated venom. Interestingly, more than 50% of the masses detected in female venom were unique and not found in the male's venom, indicating significant intraspecific variations due to gender. Such intraspecific variations between male and female has already been reported in several species of spiders (Binford *et al.*, 2016; Herzig and Hodgson, 2009; Rash *et al.*, 2000).

Whereas the biological activity of the neurotoxin-like peptides remains to be elucidated, our preliminary investigation of the crude venom on honeybee Ca_v4 ion channel indicated the possible presence of selective blockers. However, further deconvolution of the crude venom will be necessary to uncover the peptides responsible for this activity, since the cytolytic activity present in the venom prevented accurate electrical measurement. Indeed, application of the crude venom to injected and non-injected oocytes induced a strong leak current, consistent with the cytolytic activity described for several other Lycosidae venoms. The molecular entities responsible for this cytolytic activity are known as antimicrobial peptides (AMPs), which are usually small, highly positively charged linear peptides adopting an amphipathic secondary structure in lipid membrane. Several such AMPs have been isolated and sequenced from Lycosidae venom (Melo-Braga *et al.*, 2020). Often, only the mature peptide sequences are available, not the full precursors, raising the question about the molecular origin of these AMPs. Interestingly, in the recently published high throughput sequencing of the venom gland of the Lycosidae *Pardosa pseudoannulata*, there is no mention of AMPs. However, a closer inspection of the reported sequences reveals that family A resembles the “ICK + α -helix” modular toxin described from a Zodariidae spider, *Lachesana tarabaevi*. In these modular toxins, the C-terminal fragment was shown to possess membrane-binding activity consistent with a cytolytic effect (Kuzmenkov *et al.*, 2013). These AMPs are often major components of the venom in Lycosidae, as seen with LyeTx I, a peptide isolated from *Lycosa erythrognatha* (Santos *et al.*, 2010). In our transcriptome, family SN_19 also displays the

same architecture, with a N-terminal ICK motif and a C-terminal AMP-like sequence, and LC-MS of the venom shows a major contribution of peptides in the 1500-2500 Da range. Interestingly, the C-terminal peptide (QQPKSHKIAEKIVDKAKTVI) of U2-lycotoxin Lt19a has a mass (2260.32 Da) that corresponds to the major peak present in the venom (see Fig. 9). The C-terminal peptides of the other SN_19 family sequences are also in the same mass range of 2000-2500 Da. Further work, including HPLC fractionation and purification steps, will be necessary to confirm this hypothesis.

Compared to the transcriptomes of other Lycosidae, such as *Lycosa singoriensis* or *Lycosa vittata*, our *Lycosa tarantula* transcriptome revealed a similar number of structural families, but fewer paralogs for each family (Zhang *et al.*, 2015a, 2010). However, it should be noted that in these studies, many of the reported paralogs were actually often single substitution sequence variants, and several of these substitutions were located in the propeptide, therefore producing identical mature toxin. We suspect that the assembly step of our Illumina reads eliminated the majority of these minor substitution variants that were otherwise picked up by the traditional Sanger sequencing technology used in these studies. However, we cannot exclude that additional neurotoxin-like sequences were missed. For instance, interrogation of the PEAKS “de novo” peptides that did not match any sequence from our transcriptome revealed a number of fragments that show high similarity to known neurotoxins, such as YPESGEGELCTCQQPK (75% U3-lycotoxin-Ls1h, *Lycosa singoriensis*), CTPLLHDCSHDR (92% U4-lycotoxin-Ls1b, *Lycosa singoriensis*), GCGFLDFNYPGDGR (93% Venom allergen 5, *Lycosa singoriensis*) and CCWPWSCVCWSQTLS (87% Omega-lycotoxin-Gsp2671e, *Alopecosa marikovskiyi*).

These unmatched yet high quality proteomic sequences may arise from the different specimens used for venom gland transcriptomics and venom proteomics.

In summary, we have reported here the first proteotranscriptomics analysis of *Lycosa tarantula* venom, including 18 sequences of short neurotoxin-like peptides and venom proteins from 10 structural families.

Future works should focus on the synthesis and pharmacological characterization of some of the neurotoxin-like peptides, as well as the cytolytic activity of some C-terminal fragments. Our data contribute to a treasure trove for the mining of useful pharmacological compounds.

Supplementary material

Table S1. Transcriptomic sequences validated by shotgun proteomics applied to the electrically stimulated venom of *L. tarantula*.

Acknowledgements

The authors acknowledge the support from a grant of the French National Research Agency (ANR-16-CE34-0002 to SD) and access to the cluster MUSE for computation time. MGX acknowledges financial support from France Génomique National infrastructure, funded as part of “Investissement d’avenir” program managed French National Research Agency (ANR-10-INBS-09). Mass spectrometry experiments were carried out using facilities of the Functional Proteomics Platform of Montpellier.

References

1. Saez, N.J.; Senff, S.; Jensen, J.E.; Er, S.Y.; Herzig, V.; Rash, L.D.; King, G.F. Spider-venom peptides as therapeutics. *Toxins (Basel)* **2010**, *2*, 2851-2871. doi: 10.3390/toxins2122851.
2. Klint, J.; Senff, S.; Rupasinghe, D.; Yan Er, S.; Herzig, V.; Nicholson, G.; King, G. Spider-venom peptides that target voltage-gated sodium channels: Pharmacological tools and potential therapeutic leads. *Toxicon* **2012**, *60*, 478-491. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.04.337.
3. Vetter, I.; Davis, J.; Rash, L.; Anagi, R.; Mobli, M.; Alewood, P.; Lewis, R.; King, R. Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. *Amino Acids* **2011**, *40*, 15-28. doi: 10.1007/s00726-010-0516-4.
4. Prashanth, J.R.; Brust, A.; Jin, A.-H.; Alewood, P.F.; Dutertre, S.; Lewis, R.J. Cone snails venomics: from novel biology to novel therapeutics. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 1659-1675.
5. Dos Santos, L.D.; Dias, N.B.; Roberto, J.; Pinto, A.S.; Palma, M.S. Brown recluse spider venom: proteomic analysis and proposal of a putative mechanism of action. *Protein Pept. Lett.* **2009**, *16*, 933-943.
6. Casewell, N.R.; Wüster, W.; Vonk, F.J.; Harrison, R.A.; Fry, B.G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends Ecol. Evol.* **2013**, *28*, 219-229.
7. King, G.F. The wonderful world of spiders: preface to the special *Toxicon* issue on spider venoms. *Toxicon* **2004**, *43*, 471-475.
8. Ferreira, L.A.; Alves, W.E.; Lucas, M.S.; Habermehl, G.G. Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide (BPP-S) isolated from *Scaptocosa raptoria* venom. *Toxicon* **1996**, *34*, 599-603.
9. Ferreira, L.A.; Lucas, S.M.; Alves, E.W.; Hermann, V.V.; Reichl, A.P.; Habermehl, G.; Zingali, R.B. Isolation, characterization and biological properties of two kinin-like peptides (peptide-S and peptide-r) from *Scaptocosa raptoria* venom. *Toxicon* **1998**, *36*, 31-39.
10. Zhang, Y.; Chen, J.; Tang, X.; Wang, F.; Jiang, L.; Xiong, X.; Wang, M.; Rong, M.; Liu, Z.; Liang, S. Transcriptome analysis of the venom glands of the Chinese wolf spider *Lycosa singoriensis*. *Zoology* **2010**, *113*, 10-18.
11. Zhang, F.; Liu, C.; Tan, H.; Wang, H.; Jiang, Y.; Liang, S.; Zhang, F.; Liu, Z. A survey of the venom of the spider *Lycosa vittata* by biochemical, pharmacological and transcriptomic analyses. *Toxicon* **2015**, *107*, 335-343.

12. Vassilevski, A.A.; Kozlov, S.A.; Grishin, E.V. Molecular diversity of spider venom. *Biochemistry (Moscow)*, **2009**, *74*, 1505-1534. doi:10.1134/S0006297909130069.
13. World Spider Catalog. Available online: <http://wsc.nmbe.ch> (accessed on July 09, 2019).
14. Besson, T.; Debayle, D.; Diochot, S.; Salinas, M.; Lingueglia, E. Lox cost venom extractor based on Arduino board for electrical venom extraction from arthropods and other small animals. *Toxicon* **2016**, *118*, 156-161.
15. Camacho, C.; Coulouris G.; Avagyan V.; Ma N.; Papadopoulos J.; Bealer K.; Madden T.L. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **2009**, *10*, 421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421.
16. Li W.; Godzik A. CD-HIT: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1658-1659. doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158.
17. Fu L.; Niu B.; Zhu Z.; Wu S.; Li W. CD-HIT: accelerated for clustering the next generation sequencing data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 3150-3152. doi: 10.1093/bioinformatics/bts565.
18. Koua, D.; Kuhn-Nentwig, L. Spider neurotoxins, short linear cationic peptides and venom protein classification improved by an automated competition between exhaustive profile HMM classifiers. *Toxins* **2017**, *9*, 245. doi:10.3390/toxins9080245.
19. Armenteros, J.J.A; Tsirigos, K.D.; Sønderby, C.K.; Petersen, T.N.; Winther, O.; Brunak, S.; Von Heijne, G.; Nielsen, H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology* **2019**, *37*, 420–423.
20. Pineda, S.S.; Chaumeil, P-A.; Kunert, A.; Kass, Q.; Thang, M.W.C.; Le, L.; Nuhn, M.; Herzig, V.; Saez, N.J.; Cristofori-Armstrong, B.; Anangi, R.; Senff, S.; Gorse, D.; King, G.F. ArachnoServer 3.0: an online resource for automated discovery, analysis and annotation of spider toxins. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 1074–1076. doi: 10.1093/bioinformatics/btx661.
21. Katoh, K.; Standley, D.M.; MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol* **2013**, *30*, 772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010.
22. King G.F.; Gentz M.C.; Escoubas P.; Nicholson G.M. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon* **2008**, *52*, 264–276. doi:10.1016/j.toxicon.2008.05.020.
23. Oldrati V.; Koua D.; Allard P.-M.; Hulo N.; Arrell M.; Nentwig W.; Lisacek F.; Wolfender J.-L.; Kuhn-Nentwig L.; Stöcklin, R. Peptidomic and transcriptomic profiling of four distinct spider venoms. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0172966. doi: 10.1371/journal.pone.0172966.

Supplementary material

Table S1. Transcriptomic sequences validated by shotgun proteomics applied to the electrically stimulated venom of *L. tarantula*.

ID	Family	Contig ID	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	#Spec	
	1 VP_13_01	LYCTA_DN13149_c0_g1_i2_5	458.58		93	94	59	1259
U2-Lycotoxin-Lt19a	SN_19_01	LYCTA_DN36115_c0_g1_i1_6	457.46		55	111	109	1000
U2-Lycotoxin-Lt19d	SN_19_05	LYCTA_DN36115_c0_g3_i1_4	432.86		56	105	103	1201
	4 VP_10_00	LYCTA_DN43259_c0_g1_i1_4	417.97		54	60	60	394
U3-Lycotoxin-Lt29a	SN_29_00	LYCTA_DN31591_c0_g1_i2_3	390.03		46	69	69	1407
	6 VP_13_01	LYCTA_DN38966_c8_g1_i1_6	379.93		71	81	81	795
U2-Lycotoxin-Lt19b	SN_19_03	LYCTA_DN36115_c0_g2_i1_6	370.63		53	94	94	1351
	8	LYCTA_DN39051_c0_g1_i1_4	358.35		58	130	3	1940
U2-Lycotoxin-Lt19c	SN_19_03	LYCTA_DN42079_c0_g1_i1_5	329.36		54	65	65	806
	10	LYCTA_DN41713_c0_g1_i1_4	328.93		55	44	44	344
	11	LYCTA_DN39051_c0_g1_i7_5	321.68		62	96	5	1555
	12 VP_13_01	LYCTA_DN13149_c0_g1_i1_4	321.39		83	39	3	517
U6-Lycotoxin-Lt11a	VP_11_01	LYCTA_DN39789_c0_g1_i1_6	278.60		60	18	18	104
U1-Lycotoxin-Lt04a	SN_04_01	LYCTA_DN44041_c0_g1_i1_4	267.94		49	37	37	1065
	15 VP_13_01	LYCTA_DN45782_c0_g1_i1_5	248.81		74	27	27	323
	16 VP_05_00	LYCTA_DN41188_c0_g1_i1_6	232.06		80	17	17	144
U6-Lycotoxin-Lt11b	VP_11_02	LYCTA_DN45625_c0_g1_i1_5	224.23		53	13	13	93
	18 VP_05_00	LYCTA_DN45752_c0_g1_i1_4	210.84		74	13	13	111
	19	LYCTA_DN38688_c0_g4_i2_4	203.65		39	19	3	38
U4-Lycotoxin-Lt33a	SN_33_00	LYCTA_DN12175_c0_g1_i1_6	195.22		22	11	11	104
	21	LYCTA_DN37134_c0_g1_i1_4	151.19		17	7	7	11
	22	LYCTA_DN39004_c0_g1_i3_5	150.66		12	4	4	5
	23 VP_07_00	LYCTA_DN38008_c0_g1_i3_6	143.02		4	6	6	11
	24	LYCTA_DN34819_c0_g1_i1_6	135.82		14	8	7	11
	25	LYCTA_DN35847_c0_g1_i1_5	131.05		10	6	6	7
	26	LYCTA_DN39051_c0_g1_i9_6	119.81		7	5	5	12
	27	LYCTA_DN39051_c0_g1_i4_5	123.22		6	5	5	12
	28	LYCTA_DN39224_c0_g1_i1_5	116.10		9	7	6	11
	29	LYCTA_DN24953_c0_g2_i1_4	111.08		7	5	4	9
	30	LYCTA_DN9873_c0_g1_i1_4	108.52		5	5	4	8
	31	LYCTA_DN26678_c0_g1_i1_5	105.73		22	4	4	5
	32	LYCTA_DN21508_c0_g1_i1_6	102.98		7	4	4	6
	33	LYCTA_DN30150_c0_g1_i1_6	96.86		9	6	6	6

PTM
Carbamidomethylation; Amidation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); Deamidation (NQ); 40 more
Carbamidomethylation; Amidation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); Deamidation (NQ); 67 more
Carbamidomethylation; Oxidation (M); Amidation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); 72 more
Carbamidomethylation; Oxidation (M); Amidation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); 31 more
Carbamidomethylation; Oxidation (M); Amidation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); 50 more
Carbamidomethylation; Oxidation (M); Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); Deamidation (NQ); 37 more
Carbamidomethylation; Amidation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); Deamidation (NQ); 72 more
Oxidation (M); Amidation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); Deamidation (NQ); 48 more
Carbamidomethylation; Oxidation (M); Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); Deamidation (NQ); 36 more
Carbamidomethylation; Oxidation (M); Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); Deamidation (NQ); 24 more
Oxidation (M); Amidation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); Deamidation (NQ); 42 more
Carbamidomethylation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); Deamidation (NQ); Dethiomethyl; 24 more
Carbamidomethylation; Amidation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Deamidation (NQ); Methyl ester; 11 more
Carbamidomethylation; Oxidation (M); Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); Deamidation (NQ); 33 more
Carbamidomethylation; Amidation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); Deamidation (NQ); 21 more
Carbamidomethylation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Deamidation (NQ); Dethiomethyl; Dehydration; 7 more
Carbamidomethylation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Deamidation (NQ); Dethiomethyl; Ammonia-loss (N); 13 more
Carbamidomethylation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Deamidation (NQ); Sodium adduct; Methyl ester; 8 more
Carbamidomethylation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Dethiomethyl; Carbamylation; Phosphorylation (STY); 3 more
Carbamidomethylation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Deamidation (NQ); Ammonia-loss (N); Sodium adduct; 11 more
Carbamidomethylation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Deamidation (NQ); Hydroxylation; Methyl ester
Carbamidomethylation; Methyl ester; Mutation
Carbamidomethylation; Amidation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Deamidation (NQ); Dehydration; Dihydroxy
Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Deamidation (NQ); Phosphorylation (STY); Acetylation (K); Oxidation (HW); Amidation of lysines or N-terminal amines with methyl acetimidate
Carbamidomethylation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Phosphorylation (STY)
Carbamidomethylation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); Methyl ester; Pyro-glu from Q; Mutation
Carbamidomethylation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); Methyl ester; Pyro-glu from Q; Mutation
Carbamidomethylation; Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Methyl ester; Dehydration; Carboxylation (E); 2 more
Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); Phosphorylation (STY)
Oxidation (M); Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Acetylation (N-term); Sulfation; Mutation
Carbamidomethylation; Oxidation (M); Phosphorylation (STY); Carboxylation (DKW); Mutation
Phosphorylation (STY); Dihydroxy
Carbamidomethylation (DHKE X@N-term); Phosphorylation (STY); Acetylation (K); Propargylamine

Avg. Mass	Sequence homology (% identity)
24261	Venom allergen 5 (<i>Lycosa singoriensis</i>) - 130/143(91%)
16327	U3-lycotoxin-Ls1a (<i>Lycosa singoriensis</i>) - 100/116(86%)
17379	U4-lycotoxin-Ls1a (<i>Lycosa singoriensis</i>) - 99/109(91%)
17889	putative PQM protease precursor [<i>Lycosa hispanica</i>] - 136/140(97%)
14037	Omega-lycotoxin-Gsp2671a (<i>Alopecosa marikovskiyi</i>) - 74/87(85%)
22074	Venom allergen 5 (<i>Lycosa singoriensis</i>) - 167/185(90%)
18622	U1-lycotoxin-Ls1b (<i>Lycosa singoriensis</i>) - 98/106(92%)
50341	No significant match
21383	U5-lycotoxin-Ls1a (<i>Lycosa singoriensis</i>) - 95/115(83%)
23114	hypothetical protein X975_08481, partial [<i>Stegodyphus mimosarum</i>] - 97/162(60%)
27559	No significant match
17320	Venom allergen 5 (<i>Lycosa singoriensis</i>) - 43/53(81%)
7935	U15-lycotoxin-Ls1a (<i>Lycosa singoriensis</i>) - 55/68(81%)
14590	U2-lycotoxin-Ls1b (<i>Lycosa singoriensis</i>) - 98/105(93%)
7643	cysteine-rich secretory protein 1 isoform a1 [<i>Cupiennius salei</i>] - 29/47(62%)
10526	hyaluronidase precursor [<i>Cupiennius salei</i>] - 73/91(80%)
8877	U20-lycotoxin-Ls1c (<i>Lycosa singoriensis</i>) - 86/80(81%)
9189	hyaluronidase precursor [<i>Cupiennius salei</i>] - 61/75(81%)
69344	actin, clone 403-like [<i>Parasteatoda tepidariorum</i>] - 374/376(99%)
16547	toxin 26 precursor [<i>Cupiennius salei</i>] - 51/72(71%)
48941	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 [<i>Araneus ventricosus</i>] - 289/333(87%)
54829	Arginine kinase, partial [<i>Stegodyphus mimosarum</i>] - 297/358(83%)
90556	TPA: putative angiotensin converting enzyme precursor, partial [<i>Carcinus maenas</i>] - 317/609(52%)
83417	heat shock 70 kDa protein cognate 4 [<i>Biomphalaria glabrata</i>] - X581/650(89%)
65146	ATP synthase subunit beta, mitochondrial [<i>Limulus polyphemus</i>] - 460/523(88%)
50215	No significant match
61483	No significant match
80396	heat shock protein 70-p4 [<i>Oxycera pardalina</i>] - 491/640(77%)
86586	heat shock protein 68 [<i>Drosophila kikkawai</i>] - 472/647(73%)
119686	heat shock 70 kDa protein cognate 3-like [<i>Limulus polyphemus</i>] - 563/666(85%)
26984	cytochrome c-2 [<i>Pogonomyrmex barbatus</i>] - 85/107(79%)
67839	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial [<i>Portunus trituberculatus</i>] - 473/553(86%)
68435	elongation factor 1-alpha [<i>Spodoptera litura</i>] - 415/462(90%)

SEQUENCES :

ID_1

LWAKTWRIGCGFLDFNYPGNRRYTQIVCNYPKGSVEGEEVYKGGSVCCSPANTCCGDACKTHNLKSHYDGLC
KVIDENLPPEGNVPHKKTGNEVFYCGFNDESDCSHTVEGVDRWIRNVTTGGNWLNTYLGNYGYTVLKFNQPIISKS
GKLCLAIRTRSGPMEAGQPYRYQLSGLLEEEGKFSTSLIFPPADDNVKHRFHTDYFQPSEFPKNRG

ID_U2-Lycotoxin-Lt19a

LNLEEVLTEXHLEVSSLPATMKLVVLFVLLVTLFSYSTAEMLDDFDQADEADELLSLIEEQTRAKECTPRYNDCSHDR
HSCCRSELFKDVCTCFYPESGEGELCTCQQPKHFKYMEKATDKVKKFGGKIKKWFVGXGNSVVCNG

ID_U2-Lycotoxin-Lt19d

LSSRGIEHXLEIFQPITMKVLVLFVLFITLFSYSSTEAIDEFDSNAEEDMLSLLANEQVRAKACTPLLHDCSHDRHSCCR
GELFKYVCECFYPEGEDKTEVCSCQQPKSHKIAEKIVDKAKTVIGXGDTVSVFVTEMFNKXIRKFLATSKKKK

ID_4

GSLXLHPLXFKVPIFVLNMQLIFAVFLILLTGYTSGKLYTVKDCGKASVPQGRIVDGEVSKRGKYPWMVSIHQWYWK
KLRPICGGTILNENWIVTAAHCFDQPIKESDYEVVGLFSLTKTNEPTVQHRKSSKIIIQCQYNETRAEDIAALLKTSTPI

ID_U2-Lycotoxin-Lt29a

WKHLXISSISICQVXRMKLSIFFVLFVVAIVYCQPEFLDTEEDEAEIIPVAEEEREKTCITWRNSCMHNDKGCCWPW
SCVCWSQTISKFSKKERKQCRLWXMXXYGMHCLFYFA

ID_6

AMSAPVGSPLFLALCALLMLIVVQSAYCPDPYKRYSQEHSYCVGVCCSCPXYRRGVSPWLKQELVRLHNNLRSKV
AGGKSYGVDHLPRATNMLEMVWDELAEVAQRWSDKCERTSDCEDCRRVGRFGVGQIIFEDGKMDGEDIENE
FFSRFQGLQSRKEQVARFTAGTNPKTAQILGAKTWLFSSRRRH

ID_U2-Lycotoxin-Lt19b

LLPXEILTEXHLEVSSQITMKVLILVALLVTLISYSTSEGIDDEADLELLSLMANEQNRKECIPKHHECTSNKHGCCGKH
FFKYKQCTTVVDQSGEQTERFCGTPPHHKAELVVGFGKIFGXXKNCISIGICEDTLFDVNEPLWLSLSYFVKRXQKX
QKKLCX

ID_8

ELAASCNSSASYXAVXKTAVKTITGIYFGRNMNYTIIAFLLLVALTCSTARSVDASEENAQEIREEIPSSNEDASFSLSVN
VDEEARNKWSKFKELLEKYAAKTMGREESLSGNEETRGKLAALVAKLKAYAAKYMGREESFSGDEEREVDWMKIL
QNMNDNAAKNKGREESLSANDDEEERLIWIPALKFLATELAMHHLSKMGRNEEISGSLSANDEEARIWFSLMKF
AGKHLAKHQLSKMGRNEQTPEFSADDDEEARIWWTAMKFFGKQLAKHQLSKMGRNEQTPEFSADDDEEARI
WWTAMKFFGKQLAKHQLSKMGRNEQTDEKARAAWLSALKHLVKHVTKEQLKKYGRNEEISGIISANDDEEARN
WFKLFKSAAKFMAKQKLKQHLGSEXNLLLYLFKQIEIXVXIFXVKIRNKLNFKPVFCCPCW

ID_U2-Lycotoxin-Lt19c

FLSEYPLRSFTMKYLILFGVVFLTLLSYCSSEIDDDFENFMHEELVEAKDPFAISRKEDNENCIPKHHECTSNRHGCCRG
KLFKYKQCQVKMVNAQKEETERCACITPGLHKAVEFVLQLFKVKVITXAPYDDLLETHLLIVKIILYELKKNRMLXKCHS
KQIMFYFSLESCINXINTLKFQ

ID_10

FFFFVESPTVDAGEHRGFFPSLXSKLIFHGSLIQMRMSGVLLGIIAASLANGQEGEIIVPDNKTQCINDMVQWC
NNMKYPQQGAGISMLSITYEDISAYYRVLCASDSGDTNCTRNKIPWFSCTPDHVLTQYKQVLTYNMSSGVDDDDICS
TADRAFNDLFIQNLSDNTTLKEEVQKGFEEAFFDEIAAMEEQIDLLQKCLNS

ID_11

ALIGRALRHIELLLYVFLFKQKTAYEIRNCDWMKILQNMNDNAAKNKGREESLSGNEETRGKLAALVAKLKAYAAK
YMGREESFSGDEEREVDWMKILQNMNDNAAKNKGREESLSANDDEEERLIWIPALKFLATELAMHHLSKMGRNE
EISGSLSANDEEARIWFSLMKFAGKHLAKHQLSKMGRNEQTDEKARAAWLSALKYLVKHATKEQLEKYGRNEDIS
GRPSAVPEEEERAG

ID_12

MIXTLRHEQFARSVDASIFFFKQKTAYEIFYCGFNDESDCSHTVEGVDRWIRNVTTGGNWLNTYLGNYGYTVLKF
NQPIISKSGKLCLAIRTRSGPMEAGQPYRYQLSGLLEEEGKFSTSLIFPPADDNVKHRFHTDYFQPSEFPKNRG

ID_U2-Lycotoxin-Lt11a

AICKMNSRIFAVLLLSALLTCVLSSEQYCPKSSLSLSPCKKANIRNDCKDDCTGGSWCCQTPCGNFCKYSIDR

ID_U2-Lycotoxin-Lt04a

ISSARTHGLXQXKDNLMIKYVLISALLVVAVYSFTIEENEDALLEEADDEVEPEEERRMALPPGAVCNGHKSQCQCF
GAKYKCSPPFFWRFRSSAKCHCKKGAWTAIKKRSCHNRYQWSGXRTTR

ID_15

FLKNRGAKLTLNFSVSGEPKQYFEIDSIVALEKDCPKKTITEGTGFITSRXKTSSTSRCISFNKVNDX

ID_16

GIIFLYLLAIVSGFEIYWNVPTGQCIHNYKLSFIQLLRTYGIQVNDGDKFQGNRFTIFYEGQLGLYPRILKSGKMENGGI
PQRGDLEQHLAK

ID_U2-Lycotoxin-Lt11b

HCLLFSTSDQVANMDSRILSILLLLCIATCALAGGFCKPRHTDCDMSYKINDCCAQSDCRLGSCVCEGCGNVCRA
ESNTPL

ID_18

LHQYIIDILGPAAEKVAWRSNLCSKKICNNQGRCTFPEDDDAKAWKLFTDDTLFPYAGNITCRCSQNYTGRFCQQT
GPI

ID_19

TGKAHLERGXXQSARCWSRGFDFNFXKGLSGVELSWVLINQRTWKVVTGRTSLPFSFAFKXVHWIVLVYXHLRNTLKL
CLPPXHXKLNMCDDDEVAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPISVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDDEAQS
KRGILTLYKPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPPEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNTPAMYVAI
QAVLSLYASGRRTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKVLTERGYSFTTTAEREIVRDIKEKL
CYVALDFEQEMATAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESCGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLY
ANTVLSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWISKQEYDESGPSIVHR
KCFXKCLELDLIKVFDRAGSGHFFFLFNFMMEKEALIXSTHSSRDRLTGKKGGEVSCNTXISFYFLXKVVACACYLXR
PXGECXHRSDYNEGLISCSYLFITKLXRLKILDFKIPFNLEEYLKMSFFKYFLQLCILXFVIEFSIKYVPSL

ID_U2-Lycotoxin-Lt33a

RIQSTASNLIMRTSTVFGLCAVVVLLLVADISGADEINSEEAPEERGYCAEKGIRCDIHCCTGLKCKCNDSGYNCVC
RKKXALHSTERISSFLNINVFLLPTNSEKCNSSCINLMLFYFVIQKLIHKFNKEEXIFLRGXK

ID_21

VVLTLRSLIIHXVLFPGKHPNLFNMSKIGINGFGRIGRLVLRALDKGAEVVAVNDPFDVNYMVYMFKYDSTHGRY
KGDVHEEGMLLVNNGHKIHIFQEMKPTAIPWSKAGAEEVVESTGVFTTIEKASTHFEGGAKKVVISAPSADAPMYV
MGVNHESYDPSQKVSNASCTTNCLAPLAKVIHDNFEIIEGLMTTVHATTATQKTVDGPSAKLWRDGRGAAQNIIP
ASTGAAKAVGKVIPDLNGLTGMAFRVPTADVSVVLDLTCRIKKEATYDEIKA AVKSAAESDHWKILGYTEDEVVSS
DFLGDSSHSTFDAKAGISLNKTFVKLISWYDNEFGYSCRVIDLIKYMQRDXKMIYLLLVSYKXIMPMSLNKHCNVK
LSLVICVQITFTIFFLSLIYKKTINNWLQKIIENCFKMGNPLXVVIPSPAVHXNKMYTC

ID_22

QKESKMVDADTTAKLEEGFKKLQDAADCKSLVKKHLTKVFDKLGKKTAMGATLLDICQSGFANLDSGVGVYAPD
AESYTMFADLFPNIIIEYHGGFKSTDKHPPKNFGDVNSLGNLDPEGGFIISTRVRCGRSLQGYPFNPLTEAQYKEM
EEKISSTLSSMTGELKGTYYPLTGMSKEVQQKLIDDHFLFKEGDRFLQTANACRYWPTGRGIYHNDNKTFLVWCNE
EDHLRIISMQMGDLGQVYRRLVSAVDEIEKKMPFSHDDRLGFLTCPTNLGTTVRASVHIKLPKLAQRDSLEKIAS
KFNLQVRGTRGEHTESEGGVYDISNKRMRGLTEYEAVKEMNDGILEMIKMEKAASXTNTVTXVRGKXXSIPXXMLK
KTKQIVXYLAYNSFFCXLKXAKFCNTYPXHKFLKHAXYIFEGLAILYXWSIEFLLTLLRCKATTXKXKFXKSFVKFYDF
SNRNLHFTHVIKHCQV

ID_23

VTGXEHLASSSVIHHVLGSGVPVAGNTAGKVAKFPICXFSXXHXXPSNSXSXKENRFTILXLFHIMEVFYVLLLSALT
SANGVKLYGNITNEEEAKYFLLRYDIQMTELCRNLQYANWLYATNINNITQENMINSALQANYIKNIWPNVTAF
WPQFKDKNLQRQMKFISTIDIAALPLQDLKLLKVRAGMSSVYSTTTICDYKDPEKCDLRDQDLTKILATSENYDEL
LHVWKEWHEKVGRPMRKYFPIYVSLTNKAAKLNFGNDTGEMWLSAYESDFTTEIKNIWLQIKPLYQQIHAYVRRK

LINQYRDVIREDGPIPAHVGLNMWAQNWQHIERFAKPPNKSIPDATKEMLRQNYTVQKMFEMGEEFFTSGLGLP
MPEYFWTSSMFERPIGREVICHASAWDFCAHDDVRIKMCTVVNNEDFITVHHEMGHIQYYLQYGHLPIMYRDGA
NPGFHEAIGDTLALSAGSSKHLNKLRLLPNYIDDYGSKINSLFAMAASKIMFLPFSYVTDLWRWKIFKGEITEKNYNSE
WWKLRKEYQGIEPAVSRSEIDFDPGAKYHIANGVEYLRYFVSHIQFQFHKALCLEAGQYEEENPDKPLHECDIYGSK
EAGTLMRKMLMMGSSKPWPEAMSVITKGATNKMDAGPMLEYFKPLEEFLKEENRKNNEFIGWRDSSLPESTESH
STVTNPTIKDSKATDPTIKDSKTTDPTIKLTTNKDSTVSSSTVSSCSRLIPFYILT WILSSLLIFLKXYFILFYTSLCVIELLXTF
CLIXILLNS

ID_24

QEXVVPKSIPTAGAFVAILINRXLXTIILREVGSXSSRFINIYIFIYXSLFIIYIXRLIKMATKAPAVGIDLGTTSYSCVGVFQ
HGKVEIANDQGNRTTSPSYVAFTETERLIGDAAKNQVAMNPQNTVFDKRLIGRKFEDPSVQSDMKHWPFTVISE
GDKPKIRVDYKGEAKTFYPEEISSMVLTKMKETAAYLGKVTNAVVTVPAYFNDSQRQATKDSGTIAGLNVLRIINE
PTAAAIAYGLDKKVGGERNVLIFDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNHVQEFKRKHKKD
LTSNKRALRRLRTACERAKRTLSSSTQASIEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELNADLFRSTLDPVEKALRDAKLDKSLVHDI
VLVGGSTRIPKIQKLLQDFNKGKELNKSINPDEAVAYGAAVQAAILHGDKSEAVQDLLLLDVTPLSLGIETAGGVMTV
LIKRNNTIPTKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNLLGKFELTGIPPAPRGVQIEVTFDIDANGILNVSA
VDKSTGKENKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYVDDEKQRDRISEKNALESYAFNMKSTVEDEKLKDKISEADKK
TITDKCNEIHKWLDNSQLADKEEFEHKHKELEQVCNPIVTKLYQSGGVPPGGFPAGAGGAAGGQSGGGSGPTIEE
VDXKKLNLTKTIPLKFEVHVSFSLIYXLXFYFCKXNIKKSFMKKKKK

ID_25

LIAPGRTRVTMLNVLSRACSSVLRTAKPAVSSNILSQTQLKLIPALCTSHSKYATQPAPKAAAGASGRIVAVIGAVVD
VQFDDNLPPILNALEVQGRKPRLVLEVAQHLGESTVRTIAMDGTGLVVRGQVCVDTNSPIKIPVGPETLGRINNVIGE
PIDERGPVTTKSYSSIHQEAPEFVEMSVAQEILVTGIKVVDLLAPYAKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELINNVAKAHG
GYSVFAGVGERTREGNDLYHEMIESGVISLKDATSKVALVYGMNEPPGARARVALTGLTVAEYFRDQEGQDVLFF
IDNIFRFTQAGSEVSALLGRIPSAVGYPQLATDMGTMQERITTTKKSITSVQAIYVPADDLTD PAPATTF AHL DAT
TVLSRGIAELGIYPAVDPLDSTSRIMDPNVVQGEHYDVARGVQKILQDYKSLQDIIAILGMDSEDDKLTVARARKI
QRFLSQPFQVAEFTGSAGKLVPLEETIKGFKMILNGELDHLPEVAFYVMVGPIEEVQAKAQKLAEEQXKGDISNCH
YRIVNVHSNHXISCSLIVELKIVEXFSXIAKLYVVFAEILVRTFLLRIKKIVKREKKK

ID_26

RXSGVPSGTLNYCFMFFCSSRRRHTRYGTVTGXXFFKIXTTMLQKIREERKACLGMKKQGVNWQLLLQNXRHML
RNTWEERKASLGMKKGRLTGXKFFKIXTTMLQKIREERKASLQMMMKKKDXSGYRHXNFQXQNWRCITFQRWE
EMKKYLEVCRQMTMKKQEFGLSXXNLQENTSQNISFQRWEEMNRHLKASLQMTMRKLEFGGRQXNFLENLQ
NISFQRWEEMNRHLKASLQMTMRKLEFGGRQXNFLENLQNISFQRWEEMNRMLMRKQGRPGYQHXXNIXLNTSR
KNSLRSMEEMKRYLESSLQMMMRRKQGRGLSYSNLQQNSWRNKSXNNILGVNKIFYFSTLNRSLKSEFSKKKKQ
KKKXLXIYILLSMWWKFFKQGICIRSGAVQSNLSKKFLNCXNNFILIYNI

ID_27

ALIGRALRHIELLLLYVFLFKQKTAYEITVXLEFRRMLFRSAASXSSASXYAVXNTAVKTITGIYFVETXIIPQLLSCCWX
HXHAPQHGLMHLKFKFKFKVKKYLHQTRMHPSVSLLMWMMKRRGINGQNLKNFLKNMLQKPWEERKACLGMK
KQGVNWQLLLQNXRHMLQNTWEERKASLGMKKGRLTGXKFFKIXTTMLQKIREERKASLQMMMKKKDXSGYRH
XNFQXQNWRCITFQRWEEMKKYLEVCRQMTMKKQEFGLSXXNLQENTSQNISFQRWEEMNRHLKASLQMTM
RKLEFGGRQXNFLENLQNISFQRWEEMNRHLKASLQMTMRKLEFGGRQXNFLENLQNISFQRWEEMNRML
RKQGRPGYQHXXNIXLNTSRKNSLRSMEEMKRYLESSLQMMMRRKQGRGLSYSNLQQNSWRNKSXNNILGVNKIF
YFSTLNRSLKSEFSKKKKQKKKXLXIYILLSMWWKFFKQGICIRSGAVQSNLSKKFLNCXNNFILIYNI

ID_28

RERAVITXXTRSERQQQFSTDYFLADNNXLYFTYYYYDXXTLITMKTPAIGIDLGTTSYSCVGVFQHGKVEIANDQG
NRTTSPSYVAFTDTERLVGDGAKQVAMNPQNTVFDKRLIGRQYDDPKIQEDLKQWPFRRVNVGGPKIQVEFK
GENKTFAPPEISSMVLTKMKETAESYIGGKVSDAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGAIAGLNILRIINEPTAAALAYGLD
KHLTGEKNVLIYDLGGGTFDVSULTIDEGSMFEVRATAGDTHLGGEDFDNRMVNHFAEEFRRKYKKDVRTNPRALR
RLRTACERAKRTLSSSTEASIEIDALYEGIDFYTKITRARFEELCADLFRSTLSPVEQALRDSKLDKGSIHDIVLVGGSTRIP

KIQKLLKDFNKGKELNQSINPDEAVAYGAAVQAAVLSGDESRNLQDVLLVDVAPLSLGIETAGGVMTKIIERNTRIPT
KANQTFTTYSDNQPGVTVQVFEGERALTKDNNLLGRFELTGIPPAPRGVPKVEVTFDIDANGILNVTAKEETTGRST
NITIKNDQGDRLSKAEIDRMVEEAQKYAEDEKERQRIGSRNALEGYVFLSKQSVGDMDESRLPRKDKDIVLSECDR
VLKWIDNNALASKEEFEHQKELQRICNPIITRVYQGTNNNSNNQNTHTTNAQGPTEIEVDXTLXIYCIAIVIYNFLFY
NYNVKIDFIXDCKYCTY

ID_29

EQKKKRKDLFLFLIFXNFTTMKPAIGIDLGTTYSCVGFQYQKVEIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDGAQGQ
VAMNPENTVFDARLIGRQYDDPKIQEDLKHWPFRVNVVGGPKIQVEFKGGKLLFTPEEISSMVLTKMKETAFAF
IGEKVTDVVVTPAYFNDSQRQATKNAGSIAGLNILRIINEPTAAALAYGLDKHLTGERNVLIFDLGGGTDFVSVLNID
EGSIFEVKATAGDTHLGGEDFDSRLVNYFADEFQRKFKKDLRRNPRAVRRRLRTAAERAKRTLSSTSIEIDALFEG
MDFYTKISRARFEELCSDLFRSTLGPVEQALRDAKLEKSSVHDIVLVGGSTRIPRVQKLLKDFNKGKELNLSINPDEAV
AYGAAVQAAVLTGDQSRSLQDVLLVDVAPLSLGIETVGGVMTRLIERNRIPTSAKNFTTYSENQTSVAIQVFEGE
RALTKDNNLLGTFHNLGIPPAPRGVPKIQVTFDIDANGILNVTALDECTGRANHITISNGARLSKAEIERMVHEAEKY
SKEDEDQRQRVASRNALESYVFLKRSIIEIGDSRVPSKERDVVLRVRECDRVLRWIDNNAFASKYEYIEIELRELQKKNPI
IANLYQGTNGNNYRNGYNTDSYNSNSSSQEPIIEEVEXLIHDQVLSKCLCIYXCSLFLVMXILIFTYDIXRFSFSPKQCL
NFKXQCNNSSFLLLQXYHNIILICNIYGRWLIWIESKXAALIXIENLSILFXTCDLANIKE

ID_30

DTIVYRRCXLLKSLEFSFLAHLNYSIKSVRFDTRCILVRKXNXTILXYLVITTTYSWGLALINEMRSYLLFLIALVLPNAI
KTKKSSDDDKDNFGTVIGIDLGTTYSCVGVFKNGRVEIANDQGNRTTPSYVAFTPEGERLIGDAAKNQLTTPENT
VFDARLIGREWNPVQHDIKYFPFKVKEKNSKPHIEVKTSQGTKEFAPEEISAMVLTMKMKEIAEAYLGKKVTHAV
VTVPAYFNDAQRQATKDAGTIAGLNMRIINEPTAAAIAYGLDKKDGKNILVFDLGGGTDFVSLTIDNGVFEVVA
TNGDTHLGGEDFDQRMMEHFIKLYKKGKDIRSDNRAVQKLRREVEKAKRALSSNHQVRIEIESFYEGDDFSETLT
RAKFEELNMDLFRSTMKPVQKVEDADLQKDKIDEIVLVGGSTRIPKIQQLVKEFFNGKEPSRGINPDEAVAYGAAV
QAGVLGGEEDTGDLVLLDNPLTMGIETVGGVMTKLIPRNTVIPTKKSQIFSTASDNQHTVTIQVYGERPMTKDN
HLLGKFDLTGIPPAPRGVQIEVTFEIDVNGILRVSADKGTGNKEKITITNDQNRLTPEDIERMINDAEKFADEDRLK
KDRVEARNELESYAYS LKNQINEKDKLGGKLSSEDEKIESVIDEKIKWLESNQESDTEEFKQKKEMEDIIQPIIAKLY
QGAGGAGAEPPEDEDTRDELXNSTRITIKLVKYLXTFXYYSXXRXGCKSELKCVLQISALIQMLVVSYKQLFSDCI
QNFIPFHTXFITIKEKXKTXVIFFPFILLNDFSHQXEXKCFYFESSRIWSSTWXSECFVVVVVTLIISAXKKNXKWKYKLF
XHCIVKCNLXFFKXIXLXKILSCFSXFTQIKVNFTYFHQLYAYIRMVTTIIFPRXIKXSLXCXYFLESELXFTFYRXP
EHPFLIASFHCCSSMLASKAKSWHLILYMFSSCNVLASPKTLFASASNFSXCKXIKVKXTLILNSIIFHIXEKDIIVFLX
XNXGXSSHFKLLXXVYSI

ID_31

KMVSTIGISR XEGATNRXLLEVRXSQPN SINKSLPFAFLXEMAAIPPGDPKKGEALFKQRCYQCHTTEKGGPHKTGP
NLHGVI GRKTGQAPGFAYTDANKKKGIVWTKETLFEYLDNPRKYIPGTMVFAGLKKPQDRADLIAYLEIATKXTIXG
SIHHAGILKXFKYLNHKRHNNDLLQSHLDMYLDRLSEIEKDYDSNKC NLMEYLSLFKFTKISFLNCMSW KINCF LSCXK
KK

ID_32

DLFGKKNRRHFWPIWLDNIMAFLSVRIAASLAKQLPKHVNKVTNKSIAASVIAAKKFSTTNVYAAGAPEVASILEDRI
LGAAPATDLEETGRVLSIGDGIARVYGLKNIQAEEMVEFSSGLKGMALNLEPDNVGVVVFVGNDKLIKEGDIVKRTGA
IVDVPVGEDLLGRVVDALGNTIDGKGIKNAKRARVGIKAPGIIPTSVKEPMQTGIKAVDSLVPPIGRGQRELIIGDR
QTGKTAVAIDTIINQKRFNDGQDEKKLYCIYVAIGQKRSTVAQLVKRLTDTDAMKYTIIVSATASDAAPLQYLAPYS
GCAMGEFFRDNGRHALIYDDLSKQAVAYRQMSLLRRPPGREAYPGDVFYLSRLLERA AKMSDKFGGSLTALP
VIETQAGDVSAYIPTNVISITDGGQIFLETIFYKIRPAINVGLSVSRVGSAAQTRAMKQVAGSMKLELAQYREVA AF
AQFGSDLAATQQLNRGVRLTELLKQGGYVPM AIEEQVAVIYAGVKGHLDKLDPSKITKFEKFMQHIKSTQQTLL
AKIASEGKITDETAQLKLIIDFLAGFQSAXXCSSXFKYLKFDLSNRYIKLLXISDWDNSLMIMYIVCVQIKG

ID_33

LNGRYRLCSNRFXILRIVVNLAIRFLTXHESVVKRVKPLXPLEFPAYKMGKEKIHINIVVIGHVDSGKSTTTGHLYKC
GGIDKRTIEKFEKAEQEMGKGSFKYAWVLDKLAERERGITIDISLWKFETPKYYITIIDAPGHRDFIKNMITGTSQAD

CAVLIVAAGTGEFEAGISKNGQTRHALLAYTLGVKQLIVGVNKMDSTEPYPYSQARFEEIQKEVSSYIKKIGYNPASVP
FVPISGWNGDNMLDASSNMTWHKGWEIERKEGKASGKTLEALDSIIPTRPTDKPLRLPLQDVYKIGGIGTVPVG
RVETGVLKPGMVVTFAPVNLTEVKSVEMHHEALQEAVPGDNVGFNVKNVSVKELRRGYVAGDSKNNPPKAVSD
FTAQVIVLNHPGQISNGYTPVLDCHTAHIACKFAEIKEKCDRRTGKTVEENPKSIKSGDAAIVNLIPSKPMCVEFSDF
PPLGRFAVRDMRQTVAVGVIKSVVQKEVGAGKVTKAAEKAQKKKXLAVCGLGHNPAINGKPVFRDTAAKLHYWL
TSVTFKALVRLIIFLTSWLLCHKCHRKEFRKGGSTPFLCARLYANXCFIYLEKVLSEXNKEIKFXNPKKKK

Discussion & Perspectives

Parmi le panel de canaux ioniques d'insectes disponibles au laboratoire, le premier objectif de notre étude était de voir, par une caractérisation dans l'ovocyte, ceux dont le niveau d'expression permettait d'être utilisé dans un crible destiné à identifier des composés à visée insecticide. Notre second objectif était alors d'utiliser ces canaux caractérisés afin de mettre au point un crible de venins d'araignées indigènes de la région de Montpellier, afin d'identifier et analyser les venins toxiques pour l'abeille, pour tenter d'isoler les peptides actifs et les canaux ioniques ciblés. Le but étant de fournir des pistes pour la fabrication d'outils utilisables pour la compréhension des mécanismes des effets toxiques chez l'abeille et, à plus long terme, pour la synthèse de molécules insecticides à forte spécificité d'espèce.

Parmi les 100 gènes de canaux ioniques identifiés chez l'abeille (Figure 14) dont 70 sont des VGIC et 30 sont de LGIC, tous jouent bien évidemment un rôle dans la biologie de l'abeille. En revanche, une analyse rapide des effets connus des principaux venins d'arthropodes ou plus globalement d'animaux prédateurs, nous apprend que ces venins contiennent en général des composés (alcaloïdes ou petits peptides) qui perturbent gravement la transmission synaptique, le plus souvent pour immobiliser, et paralyser leurs proies. Les cibles de ces composés sont presque systématiquement des éléments de la synapse, canaux ioniques (canaux calciques, sodiques, potassiques, récepteurs nicotiques ou GABAergiques, enzyme de synthèse ou de dégradation des neuromédiateurs (choline estérase...)).

Au laboratoire, les gènes des canaux Ca_v , Na_v , certains K_v , ainsi que des récepteurs nicotiques, GABAergiques et certains glutamatergiques sont disponibles, mais tous ne s'expriment pas de manière compatible avec une utilisation pour un crible de molécules. Mon choix s'est donc porté sur :

- Le canal Ca_v3 , canal calcique à bas seuil, dont l'équipe venait de montrer l'expression dans la cellule musculaire d'abeille et son rôle dans la locomotion (Rousset *et al.*, 2017). Son expression est reproductible et donne des courants tout à fait utilisables sur un robot de type HiClamp®.

- Le canal Ca_v4 , canal calcique à haut seuil d'activation. Tout d'abord répertorié comme un canal de type sodique, l'équipe (en collaboration) avait montré une sélectivité plus importante pour l'ion Ca^{2+} (Gosselin-Badaroudine *et al.*, 2016), il était donc intéressant d'obtenir une comparaison avec son homologue à bas seuil Ca_v3 .

Ces canaux représentent un très faible pourcentage parmi l'ensemble des gènes de VGIC identifiés dans le canalome de cette espèce (environ 70 gènes) (Cens *et al.*, 2015; Gosselin-Badaroudine *et al.*, 2016). En revanche, les canaux de type calcique jouent sans doute un rôle important dans la transmission synaptique chez les insectes, et sont habituellement la cible de nombreuses toxines chez les mammifères (absence de Ca_v4 chez ces espèces) (Bladen *et al.*, 2014; Bourinet and Zamponi, 2017; Catterall, 2011; Chong *et al.*, 2007; Edgerton *et al.*, 2010; Ohkubo *et al.*, 2010; Zamponi *et al.*, 2015). En revanche, caractériser le canal Ca_v4 d'abeille, représentant un nouveau canal calcique, dont on ne connaît pas à l'heure actuelle le rôle exact, mais qui est absent chez les mammifères, ouvre des perspectives intéressantes.

- Le récepteur gabaergique (sous-unités RDL) de l'abeille, caractérisé de façon extensive dans le cadre de ce projet (EC_{50} des agonistes, IC_{50} des antagonistes), et de deux espèces nuisibles (puceron et varroa) ayant permis de conduire une étude comparative (Ménard *et al.*, 2018; del Villar and Jones, 2018).

J'aurai également souhaité pouvoir utiliser les canaux Ca_v1 , Ca_v2 , Na_v ainsi que les récepteurs nicotiniques, constituant chez les mammifères des cibles pour de nombreux venins, dont

certaines à usage thérapeutique, mais le niveau et la reproductibilité de leur expression ne l'a pas rendu possible. Les sous-unités Cav1 et Cav2 constituent néanmoins des cibles potentiellement intéressantes (rôle de Cav1 dans la contraction neuro-musculaire, et Cav2 dans la transmission synaptique) pour la recherche de nouveaux composés sélectifs (Collet, 2009; Dolphin, 2016; Quintavalle, 2012; Ryglewski *et al.*, 2012; Todorovic and Jevtovic-Todorovic, 2011). Des études dans l'équipe sur la recherche de protéines chaperones qui permettraient de normaliser cette expression me permettent d'espérer que cela le sera très bientôt.

Les canaux de mammifères (Cav2.1, Cav2.2 et Cav2.3 de lapin) utilisés dans ce projet, nous ont alors permis d'obtenir une première comparaison de réponse avec les canaux calciques d'abeille caractérisés. Les résultats mis en évidence durant ce projet montrent notamment que ces canaux présentent une réponse se rapprochant de celle du canal Cav4 d'abeille avec une activation à haut seuil d'activation (Tableau 13). Enfin, de nombreuses études rapportent déjà une sélectivité de certaines toxines de venins d'araignées pour les canaux et récepteurs de mammifères et à moindre mesure d'insectes (Chow *et al.*, 2015; Diochot *et al.*, 2016; Dutertre and Lewis, 2006, 2010; King *et al.*, 2008b; Klint *et al.*, 2012; Lau *et al.*, 2016; Osteen *et al.*, 2016; Rash and Hodgson, 2002). On peut ainsi s'attendre à découvrir de nouvelles toxines ciblant ces canaux au sein du venin des araignées sélectionnées pour ce projet.

Bien que les premières expériences d'injection *in-vivo* effectuées aient montrées que les venins étaient létaux rapidement, les potentiels effets sur le courant calcique de ces canaux d'abeille n'ont pas pu être révélés. L'apparition d'un artefact lors de ces expériences sur poste automatisé ainsi que les quantités minimales extraites de venins, nous ont contraints à interrompre ces tests.

Pour l'ensemble des gènes de la famille des LGIC (21 gènes chez l'abeille (Jones and Sattelle, 2006)), beaucoup n'ont pas pu être caractérisés. Malgré de très nombreux essais, l'expression des récepteurs nAChR semble en effet particulièrement aléatoire et n'a pas pu permettre leur caractérisation (Dupuis *et al.*, 2012; Gu *et al.*, 2016; Halevi *et al.*, 2002, 2003; Lansdell *et al.*, 2005; Mishina *et al.*, 1984). Les récepteurs au glutamate (AMPA, NMDA, Glu-Cl) et à la glycine ne sont, à l'heure actuelle, pas encore clonés. Cependant, les canaux au glutamate (AMPA et NMDA principalement), jouant un rôle clef dans la jonction neuromusculaire chez l'insecte, ceux-ci représentent également une cible de choix dans ce type de projet (Featherstone *et al.*, 2005; Fedorova *et al.*, 2009; Marrus *et al.*, 2004; Qin *et al.*, 2005; Saito and Kawai, 1985). Il a de plus été montré que, chez l'Homme, l'entrée de calcium à travers ces récepteurs au glutamate, notamment NMDA, jouait un rôle important dans le développement et la plasticité synaptique pouvant être à la base de processus sus-jacents, tels que l'apprentissage et la mémorisation (Dingledine *et al.*, 1999), dévoilant l'influence de ces types de canaux au niveau de la neurobiologie. Ces données permettent d'envisager un rôle pouvant être similaire chez l'insecte, et comprendre davantage l'implication des canaux au glutamate dans les processus de mémorisation (caractéristique particulièrement importante chez les insectes sociaux comme l'abeille) (El Hassani *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2006).

La caractérisation de toxines à partir d'un nombre restreint d'araignées spécialistes (*Thomisus onustus*, *Synema globosum*, *Xysticus cristatus*) ou généralistes (*Lycosa tarantula* et *Nemesia caemantaria*) s'étant montrée compliquée, notamment dû aux difficultés d'expression et les faibles quantités de venins extraites, des approches de protéomique et transcriptomique auront tout de même permis de discriminer des groupes de toxines d'intérêts au sein du venin du *Lycosa tarantula* (voir Résultats - chapitre 2). Ces analyses

préliminaires publiées dans notre article (KOUA & MARY *et al.*, 2020 – article soumis) devraient alors permettre par la suite la sélection de candidats sélectifs naturels, mais dont l'activité biologique devra être testée et évaluée. Les venins s'affirment depuis de nombreuses années comme une source d'outils d'une très grande précision, notamment grâce à l'isolement de ses différents constituants, dont chacun possède une remarquable spécificité (Chippaux *et al.*, 1984; Goyffon and Heurtault, 1995; Madsen and Noguchi, 1907). A l'heure actuelle, les techniques d'analyse des venins s'affinent et les perspectives de valorisation avec. Les récentes avancées dans les domaines « omiques » pour l'étude des constituants des venins, protéomique et transcriptomique essentiellement, permettent d'envisager des analyses plus rapides et sélectives (Diniz *et al.*, 2018; Garb, 2014; Jin *et al.*, 2015; Langenegger *et al.*, 2019; Mukherjee *et al.*, 2016; Smith and Undheim, 2018).

L'électrophysiologie couplée aux analyses protéomique et transcriptomique de venins, et l'ensemble des résultats obtenus durant ce projet, constituent une première étape dans la recherche de composés naturels ciblant spécifiquement un canal ionique d'insectes, et laissent entrevoir de nombreuses perspectives de recherche.

Parmi les canaux de la famille des VGIC, la caractérisation des canaux N_{av} , intervenant précocement au niveau de la transmission synaptique chez l'ensemble des organismes, ainsi que celle des canaux K_v , serait évidemment un point d'étude à développer (Black and Waxman, 2013; Catterall, 2000, 2012; Catterall *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2014; Doyle *et al.*, 1998; Noda *et al.*, 1986; Olson *et al.*, 2008; Yu and Catterall, 2003; Zhang *et al.*, 2017). En effet, tout comme les canaux calciques, ces canaux montrent une implication cruciale dans la neurobiologie des espèces, mammifères et insectes, et sont la cible de nombreuses toxines de venins (Chagot *et al.*, 2004; Deuis *et al.*, 2017; Henriques *et al.*, 2016; Jiménez-Vargas *et al.*,

2017; King *et al.*, 2008b; Norton and Chandy, 2017; Wright *et al.*, 2017). On peut ainsi être amenés à montrer que les effets des toxines considérées comme spécifiques des canaux calciques ne le soient en fait pas et obtenir des effets secondaires en cascade à partir d'autres canaux que nous n'avons pas pu tester durant ce projet. La mise en évidence des canaux Nav, intervenant en amont des canaux calciques, et des canaux K_V participant à la génèse du potentiel d'action, et des études électrophysiologiques permettraient alors de répondre à cette hypothèse. Dans cette optique, la recherche de protéines chaperonnes adaptées permettant d'améliorer l'expression des différents canaux ioniques est ici plus que nécessaire et permettra d'augmenter le panel de canaux utilisables. Il a en effet déjà été rapporté que les protéines chaperonnes de type RIC-3 par exemple, facilitent l'expression des récepteurs nAChR (Halevi *et al.*, 2002; Lansdell *et al.*, 2005; Millar, 2009).

Sur le robot HiClamp[®], des expériences devront être poussées afin de mettre au point des enregistrements pour les canaux dépendants du potentiel. Des essais plus intégrés s'intéressant au potentiel d'action et à la transmission synaptique permettront entre autres de discriminer rapidement une conductance touchée.

Ces approches mises alors au point, une méthode générale pour la recherche de toxines de venin d'intérêts pourra alors être structurée.

- Des essais de toxicité systématiques *in-vivo* en présence de venin brut permettraient d'identifier et de sélectionner rapidement ceux pouvant potentiellement contenir des toxines peptidiques d'intérêt en montrant une mortalité rapide sur une espèce en particulier. Il serait également intéressant d'étendre cette étude en se procurant d'autres types de venins d'araignées et autres spécimens. En effet, de nombreuses espèces venimeuses n'ont pas encore été étudiées à ce jour, et la découverte de nouveaux spécimens est encore à l'heure actuelle particulièrement développée. Plusieurs études rapportent déjà le fort intérêt des

toxines de venins pour la conception de médicaments chez l'Homme (Dhananjaya and Sivashankari, 2015; Gao *et al.*, 2017; King, 2011; Mariottini and Grice, 2019; Utkin, 2015; Uzair *et al.*, 2018), mais peu de données s'intéressent à l'emploi de ces toxines contre les insectes (espèces pourtant largement plus susceptibles d'être touchées par les animaux venimeux).

- Suite à ces résultats, des tests sur ovocytes de xénopes pourraient alors être envisagés.

La recherche de cibles à partir des modifications du potentiel d'action ou de la transmission synaptique permettrait par exemple de discriminer les canaux potentiellement touchés par les venins/toxines. Dans cette même idée, les venins ou toxines pourraient être testés sur l'activité électrique des neurones afférents primaires d'insectes, afin de montrer si ceux-ci induisent des modulations des courants ioniques de ces neurones. On pourrait alors penser que l'inhibition des courants ioniques générée par ce venin/toxine serait capable de moduler la fréquence de décharge des potentiels d'action des neurones afférents primaires, et ainsi perturber l'ensemble des sous-unités neurobiologiques sous- et/ou sus-jacentes.

- Il sera également important de vérifier la similarité des effets obtenus au niveau du potentiel d'action sur les divers types cellulaires présentant ces mêmes types de canaux. En effet, les premiers tests d'injection effectués *in-vivo* ayant montrés une mortalité précoce chez les abeilles en présence de certains venins, d'autres structures neurobiologiques et/ou musculaires pourraient également être impliquées et directement touchées par les toxines de venins : cellules de Kenyon, ganglions de lobes antennaires, système cardiaque, ou encore diverses autres structures impliquées au niveau du système nerveux central (chaîne ganglionnaire ventrale, nocicepteurs, segments thoraciques...).

- La mise en lumière du canalome complet des canaux d'abeille serait également à étudier et permettra d'analyser les venins/toxines sur de nouvelles cibles potentielles, tels que les canaux potassiques, les récepteurs au glutamate, les canaux TRP, etc, alors préalablement

identifiés. Enfin, des essais sur les mêmes canaux ioniques provenant d'autres espèces permettront d'identifier une éventuelle spécificité de ces peptides de venin. De plus, ces toxines peptidiques s'attaquent le plus souvent à des canaux ioniques ou récepteurs membranaires propres aux arthropodes, parfois même à des structures moléculaires présentes dans des groupes zoologiques très limités, réduisant ainsi le risque de toxicité sur la faune non-cible ou l'apparition d'une résistance chez d'autres organismes.

A plus long terme, d'autres approches peuvent également être envisagées. L'analyse de la distribution fonctionnelle et les rôles physiologiques de ces différents canaux ioniques dans le temps (développement) et dans l'espace (tissus/cellules) grâce à l'élaboration de nouveaux outils (RT-qPCR, immuno-histochimie, enregistrements sur cellules isolées et sur tranches) permettra éventuellement de discriminer les canaux ayant un intérêt dans la recherche de nouveaux ligands. La caractérisation des effets cellulaires des toxines peptidiques mises en évidence permettra également une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de la toxicité. La structure d'au moins une isoforme de la plupart des canaux étant connue (ravageurs/non ravageurs), l'identification plus précise des sites de fixation des peptides serait un point fortement intéressant, via des approches de mutagenèse dirigée couplée à de la modélisation moléculaire notamment sur les canaux d'insectes ravageurs et bénéfiques. Le but de cette approche consiste en effet à prédire le(s) mode(s) de liaison prédominant(s) d'un ligand au niveau d'une protéine dont la structure est connue afin de déterminer le complexe le plus stable (Morris and Lim-Wilby, 2008; Saikia and Bordoloi, 2019). Cette technique représente un outil clef en biologie moléculaire structurale et pour la conception de médicaments notamment. Dans cette même idée, la détermination de la structure des toxines peptidiques par RMN ou cristallographie à rayon X, permettra de mieux appréhender les mécanismes de fixation. Enfin, la synthèse de nouveaux peptides plus spécifiques des

ravageurs permettra l'élaboration de produits phytosanitaires agricoles plus respectueux des insectes non-cibles.

Enfin, les recherches protéomique et transcriptomique effectuées sur le venin de Lycose pourraient être appliquées aux venins de Thomisidae (*Synema globosum*, *Xysticus cristatus* et *Thomisus onustus*), jamais étudiés auparavant. Il est en effet admis que l'utilisation des venins se fait aujourd'hui dans trois directions, que l'on peut distinguer aisément en recherche fondamentale, diagnostic et thérapeutique (Chippaux *et al.*, 1984). Le criblage des venins permet ainsi l'inventaire des toxines peptidiques efficaces et l'identification de leurs fonctions.

L'analyse combinatoire de l'électrophysiologie, manuelle et automatisée, avec les recherches analytiques et « omiques » des venins, semble être une approche prometteuse dans la recherche de molécules spécifiques d'un canal ionique d'insecte. La spécificité et la sélectivité de certaines molécules décrites, insecticides ou naturelles, permettent aujourd'hui de mieux appréhender certains mécanismes neurobiologiques et représentent un premier apport dans la recherche de nouveaux composés sélectifs des canaux ioniques d'insectes cibles. Ce travail novateur et le clonage de nouveaux gènes de ces espèces ou d'autres ouvrent alors la voie de l'exploration de tout l'éventail des cibles potentielles. La caractérisation de ces divers gènes et sous-unités de canaux et récepteurs membranaires d'insectes bénéfiques et/ou nuisibles, permettra alors d'orienter la recherche vers des ligands spécifiques pour une espèce donnée. Dans un intérêt agrochimique, la mise en évidence de toxines peptidiques spécifiques d'insectes considérés comme nuisibles pourrait alors servir à la conception d'une nouvelle génération d'insecticides épargnant les insectes bénéfiques. Les résultats obtenus durant ce projet permettent d'entrevoir de nouvelles cibles potentielles, parmi les insectes ravageurs (puceron et varroa), dans cette recherche de toxines spécifiques.

Le chemin parcouru, depuis l'usage des animaux venimeux dans l'Antiquité, dérivé essentiellement de la représentation de l'animal dans l'imaginaire individuel et collectif, jusqu'à l'emploi rationnel de toxines peptidiques définies dans le cadre de la recherche fondamentale et/ou expérimentale fut long. Les venins animaux représentent aujourd'hui un sujet d'étude fortement développé, et dont les possibilités de recherche semblent infinies.

Certes, je ne crois pas que les abeilles se livrent à ces calculs compliqués, mais je ne crois pas davantage que le hasard ou la seule force des choses produise ces résultats étonnants.

– Maurice Maeterlinck, La vie des abeilles, 1901.

Références bibliographiques

- Aajoud, A., Raveton, M., Azrou-Isghi, D., Tissut, M., and Ravanel, P. (2008). How can the fipronil insecticide access phloem? *J. Agric. Food Chem.* *56*, 3732–3737.
- Alavanja, M.C.R., Hoppin, J.A., and Kamel, F. (2004). Health Effects of Chronic Pesticide Exposure: Cancer and Neurotoxicity. *Annu. Rev. Public Health* *25*, 155–197.
- Albert, J.L., and Lingle, C.J. (1993). Activation of nicotinic acetylcholine receptors on cultured *Drosophila* and other insect neurones. *J. Physiol.* *463*, 605–630.
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Alkondon, M., and Rogers, S.W. (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiol. Rev.* *89*, 73–120.
- Aliouane, Y., El Hassani, A.K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M., and Gauthier, M. (2009). Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ. Toxicol. Chem.* *28*, 113–122.
- Allen-Wardell, G., Bernhardt, P., Bitner, R., Burquez, A., Buchmann, S., Cane, J.H., Cox, P.A., Dalton, V., Feinsinger, P., Ingram, M., et al. (1998). The Potential Consequences of Pollinator Declines on the Conservation of Biodiversity and Stability of Food Crop Yields. *Conserv. Biol.* *12*, 8–17.
- Almagro Armenteros, J.J., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat. Biotechnol.* *37*, 420–423.
- Amaya-Márquez, M., Tusso, S., Hernández, J., Jiménez, J.D., Wells, H., and I. Abramson, C. (2019). Olfactory Learning in the Stingless Bee *Melipona eburnea* Friese (Apidae: Meliponini). *Insects* *10*, 412.
- Archer, J., Whiteley, G., Casewell, N.R., Harrison, R.A., and Wagstaff, S.C. (2014). VTBuilder: a tool for the assembly of multi isoform transcriptomes. *BMC Bioinformatics* *15*, 389.
- Armstrong, C.M. (1981). Sodium channels and gating currents. *Physiol. Rev.* *61*, 644–683.
- Baeriswyl, V., and Heinis, C. (2013). Polycyclic peptide therapeutics. *ChemMedChem* *8*, 377–384.
- Bane, V., Lehane, M., Dikshit, M., O’Riordan, A., and Furey, A. (2014). Tetrodotoxin: Chemistry, Toxicity, Source, Distribution and Detection. *Toxins* *6*, 693–755.
- Barik, J., and Wonnacott, S. (2009). Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Nicotine in the CNS. In *Nicotine Psychopharmacology*, J.E. Henningfield, E.D. London, and S. Pogun, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 173–207.
- Barnard, E.A., Miledi, R., and Sumikawa, K. (1982). Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *215*, 241–246.
- Belzunces, L.P., Tchamitchian, S., and Brunet, J.-L. (2012). Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* *43*, 348–370.

- Bernadou, A., Démares, F., Couret-Fauvel, T., Sandoz, J.C., and Gauthier, M. (2009). Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. *J. Insect Physiol.* *55*, 1099–1106.
- Bernstein, J. (1902). Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme: Erster Theil. *Pflüg. Arch. Für Gesamte Physiol. Menschen Thierte* *92*, 521–562.
- Besson, T., Debayle, D., Diochot, S., Salinas, M., and Lingueglia, E. (2016). Low cost venom extractor based on Arduino® board for electrical venom extraction from arthropods and other small animals. *Toxicon* *118*, 156–161.
- Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., and Greenamyre, J.T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* *3*, 1301–1306.
- Bianchi, L., and Driscoll, M. (2006). Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. *WormBook Online Rev. C Elegans Biol.* 1–16.
- Bicker, G. (1999). Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. *Microsc. Res. Tech.* *45*, 174–183.
- Binford, G.J., Gillespie, R.G., and Maddison, W.P. (2016). Sexual dimorphism in venom chemistry in Tetragnatha spiders is not easily explained by adult niche differences. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* *114*, 45–52.
- Birch, L.L., and Anzman-Frasca, S. (2011). Promoting children's healthy eating in obesogenic environments: Lessons learned from the rat. *Physiol. Behav.* *104*, 641–645.
- Black, J.A., and Waxman, S.G. (2013). Noncanonical Roles of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* *80*, 280–291.
- Bladen, C., Hamid, J., Souza, I.A., and Zamponi, G.W. (2014). Block of T-type calcium channels by protoxins I and II. *Mol. Brain* *7*, 36.
- Bleakman, D., Bowman, D., Bath, C.P., Brust, P.F., Johnson, E.C., Deal, C.R., Miller, R.J., Ellis, S.B., Harpold, M.M., and Hans, M. (1995). Characteristics of a human N-type calcium channel expressed in HEK293 cells. *Neuropharmacology* *34*, 753–765.
- Bloomquist, J.R. (2009). *Insecticides: Chemistries and Characteristics* 2nd Edition.
- Bommarco, R., Biesmeijer, J.C., Meyer, B., Potts, S.G., Pöyry, J., Roberts, S.P.M., Steffan-Dewenter, I., and Ockinger, E. (2010). Dispersal capacity and diet breadth modify the response of wild bees to habitat loss. *Proc. Biol. Sci.* *277*, 2075–2082.
- Bonmatin, J.-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E. a. D., et al. (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* *22*, 35–67.
- Bosmans, F., Rash, L., Zhu, S., Diochot, S., Lazdunski, M., Escoubas, P., and Tytgat, J. (2006). Four Novel Tarantula Toxins as Selective Modulators of Voltage-Gated Sodium Channel Subtypes. *Mol. Pharmacol.* *69*, 419–429.
- Bossy, B., Ballivet, M., and Spierer, P. (1988). Conservation of neural nicotinic acetylcholine receptors from *Drosophila* to vertebrate central nervous systems. *EMBO J.* *7*, 611–618.

- Bourinet, E., and Zamponi, G.W. (2017). Block of voltage-gated calcium channels by peptide toxins. *Neuropharmacology* 127, 109–115.
- Brackenbury, W.J., and Isom, L.L. (2011). Na⁺ Channel β Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Front. Pharmacol.* 2.
- Breeze, T.D., Gallai, N., Garibaldi, L.A., and Li, X.S. (2016). Economic Measures of Pollination Services: Shortcomings and Future Directions. *Trends Ecol. Evol.* 31, 927–939.
- Brehm, P., Eckert, R., and Tillotson, D. (1980). Calcium-mediated inactivation of calcium current in *Paramecium*. *J. Physiol.* 306, 193–203.
- Brejci, K., van Dijk, W.J., Klaassen, R.V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A.B., and Sixma, T.K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411, 269–276.
- Brogdon, W.G., and McAllister, J.C. (1998). Insecticide resistance and vector control. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 605–613.
- Brown, L.D., and Narahashi, T. (1992). Modulation of nerve membrane sodium channel activation by deltamethrin. *Brain Res.* 584, 71–76.
- Bryden, J., Gill, R.J., Mitton, R.A.A., Raine, N.E., and Jansen, V.A.A. (2013). Chronic sublethal stress causes bee colony failure. *Ecol. Lett.* 16, 1463–1469.
- Buckingham, null, Lapied, null, Corronc, null, and Sattelle, null (1997). Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J. Exp. Biol.* 200, 2685–2692.
- Buckingham, S.D., Pym, L., and Sattelle, D.B. (2006). Oocytes as an expression system for studying receptor/channel targets of drugs and pesticides. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 322, 331–345.
- Buckingham, S.D., Ihara, M., Sattelle, D.B., and Matsuda, K. (2017). Mechanisms of Action, Resistance and Toxicity of Insecticides Targeting GABA Receptors. *Curr. Med. Chem.* 24.
- Cameron, S.A., Lozier, J.D., Strange, J.P., Koch, J.B., Cordes, N., Solter, L.F., and Griswold, T.L. (2011). Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 662–667.
- Cartier, G.E., Yoshikami, D., Gray, W.R., Luo, S., Olivera, B.M., and McIntosh, J.M. (1996). A New - Conotoxin Which Targets 32 Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J. Biol. Chem.* 271, 7522–7528.
- Caswell, N.R., Wüster, W., Vonk, F.J., Harrison, R.A., and Fry, B.G. (2013). Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends Ecol. Evol.* 28, 219–229.
- Casida, J.E. (2009). Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 609–619.
- Casida, J.E., and Durkin, K.A. (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 99–117.
- Casida, J.E., and Durkin, K.A. (2015). Novel GABA receptor pesticide targets. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121, 22–30.

- Casida, J.E., and Quistad, G.B. (1998). Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu. Rev. Entomol.* *43*, 1–16.
- Casida, J.E., and Quistad, G.B. (2004). Why Insecticides are More Toxic to Insects than People: The Unique Toxicology of Insects. *J. Pestic. Sci.* *29*, 81–86.
- Catterall, W.A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* *26*, 13–25.
- Catterall, W.A. (2010). Signaling complexes of voltage-gated sodium and calcium channels. *Neurosci. Lett.* *486*, 107–116.
- Catterall, W.A. (2011). Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a003947–a003947.
- Catterall, W.A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J. Physiol.* *590*, 2577–2589.
- Catterall, W.A., Goldin, A.L., and Waxman, S.G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacol. Rev.* *57*, 397–409.
- Catterall, W.A., Hulme, J.T., Jiang, X., and Few, W.P. (2006). Regulation of sodium and calcium channels by signaling complexes. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* *26*, 577–598.
- Celie, P.H.N., van Rossum-Fikkert, S.E., van Dijk, W.J., Brejc, K., Smit, A.B., and Sixma, T.K. (2004). Nicotine and Carbamylcholine Binding to Nicotinic Acetylcholine Receptors as Studied in AChBP Crystal Structures. *Neuron* *41*, 907–914.
- Cens, T., Mangoni, M.E., Nargeot, J., and Charner, P. (1996). Modulation of the $\alpha 1A$ Ca^{2+} channel by β subunits at physiological Ca^{2+} concentration. *FEBS Lett.* *391*, 232–237.
- Cens, T., Rousset, M., Leyris, J.-P., Fesquet, P., and Charner, P. (2006). Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca^{2+} channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *90*, 104–117.
- Cens, T., Rousset, M., Collet, C., Raymond, V., Démares, F., Quintavalle, A., Bellis, M., Le Conte, Y., Chahine, M., and Charner, P. (2013). Characterization of the first honeybee Ca^{2+} channel subunit reveals two novel species- and splicing-specific modes of regulation of channel inactivation. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* *465*, 985–996.
- Cens, T., Rousset, M., Collet, C., Charreton, M., Garnery, L., Le Conte, Y., Chahine, M., Sandoz, J.-C., and Charner, P. (2015). Molecular characterization and functional expression of the *Apis mellifera* voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *58*, 12–27.
- Cens, T., Rousset, M., Thibaud, J.-B., Menard, C., Collet, C., Chahine, M., and Charner, P. (2017). Recent Advances in the Functional Characterization of Honeybee Voltage-Gated Ca^{2+} Channels. In *ACS Symposium Series*, A.D. Gross, Y. Ozoe, and J.R. Coats, eds. (Washington, DC: American Chemical Society), pp. 75–89.
- Chagot, B., Escoubas, P., Villegas, E., Bernard, C., Ferrat, G., Corzo, G., Lazdunski, M., and Darbon, H. (2004). Solution structure of Phrixotoxin 1, a specific peptide inhibitor of Kv4 potassium channels from the venom of the theraphosid spider *Phrixotrichus auratus*. *Protein Sci.* *13*, 1197–1208.

- Chambers, C., Cutler, P., Huang, Y., Goodchild, J.A., Blythe, J., Wang, C.K., Bigot, A., Kaas, Q., Craik, D.J., Sabbadin, D., et al. (2019). Insecticidal spider toxins are high affinity positive allosteric modulators of the nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett.* *593*, 1336–1350.
- Changeux, J.-P., Kasai, M., and Lee, C.-Y. (1970). Use of a Snake Venom Toxin to Characterize the Cholinergic Receptor Protein*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *67*, 1241–1247.
- Charvet, R., Katouzian-Safadi, M., Colin, M.-E., Marchand, P.-A., and Bonmatin, J.-M. (2004). Insecticides systémiques : de nouveaux risques pour les insectes pollinisateurs. *Ann. Pharm. Fr.* *62*, 29–35.
- Chen, C., Calhoun, J.D., Zhang, Y., Lopez-Santiago, L., Zhou, N., Davis, T.H., Salzer, J.L., and Isom, L.L. (2012). Identification of the Cysteine Residue Responsible for Disulfide Linkage of Na⁺ Channel α and β 2 Subunits. *J. Biol. Chem.* *287*, 39061–39069.
- Cheng, A., McDonald, N.A., and Connolly, C.N. (2005). Cell Surface Expression of 5-Hydroxytryptamine Type 3 Receptors Is Promoted by RIC-3. *J. Biol. Chem.* *280*, 22502–22507.
- Chippaux, J.P., Galtier, J., and Lefait, J.F. (1984). [Epidemiology of envenomation in French Guiana]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* *77*, 206–215.
- Chong, Y., Hayes, J.L., Sollod, B., Wen, S., Wilson, D.T., Hains, P.G., Hodgson, W.C., Broady, K.W., King, G.F., and Nicholson, G.M. (2007). The ω -atracotoxins: Selective blockers of insect M-LVA and HVA calcium channels. *Biochem. Pharmacol.* *74*, 623–638.
- Choudhary, A.F., Laycock, I., and Wright, G.A. (2012). γ -Aminobutyric acid receptor A-mediated inhibition in the honeybee's antennal lobe is necessary for the formation of configural olfactory percepts: Role of GABAA in odour mixture perception. *Eur. J. Neurosci.* *35*, 1718–1724.
- Chow, C., Cristofori-Armstrong, B., Undheim, E., King, G., and Rash, L. (2015). Three Peptide Modulators of the Human Voltage-Gated Sodium Channel 1.7, an Important Analgesic Target, from the Venom of an Australian Tarantula. *Toxins* *7*, 2494–2513.
- Chung, B.Y., Kilman, V.L., Keath, J.R., Pitman, J.L., and Allada, R. (2009). The GABAA Receptor RDL Acts in Peptidergic PDF Neurons to Promote Sleep in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *19*, 386–390.
- Clark, J.M., and Symington, S.B. (2007). Pyrethroid action on calcium channels: neurotoxicological implications. *Invertebr. Neurosci.* *IN 7*, 3–16.
- Coddington, J.A., and Levi, H.W. (1991). Systematics and Evolution of Spiders (Araneae). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* *22*, 565–592.
- Cohen, J.E., Schoenly, K., Heong, K.L., Justo, H., Arida, G., Barrion, A.T., and Litsinger, J.A. (1994). A Food Web Approach to Evaluating the Effect of Insecticide Spraying on Insect Pest Population Dynamics in a Philippine Irrigated Rice Ecosystem. *J. Appl. Ecol.* *31*, 747.
- Cole, J.C., and Rodgers, R.J. (1993). An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze. *Behav. Pharmacol.* *4*, 573–580.
- Colin, M.-E., and Belzunces, L.P. (1992). Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *apis mellifera* L.: a convenient biological approach. *Pestic. Sci.* *36*, 115–119.

- Collet, C. (2009). Excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibers from adult domestic honeybee. *Pflugers Arch.* *458*, 601–612.
- Collins, and Callcott, A.-M. (1998). Callcott : Fipronil Bait for Control of Fire Ants 407 FIPRONIL : AN ULTRA-LOW-DOSE BAIT TOXICANT FOR CONTROL OF RED IMPORTED FIRE ANTS (HYMENOPTERA : FORMICIDAE).
- Colliot, F., Kukorowski, K.A., Hawkins, D.W., and Roberts, D.A. (1992). Fipronil: a new soil and foliar broad spectrum insecticide. (Brighton), pp. 29–34.
- Comitani, F., Limongelli, V., and Molteni, C. (2016). The Free Energy Landscape of GABA Binding to a Pentameric Ligand-Gated Ion Channel and Its Disruption by Mutations. *J. Chem. Theory Comput.* *12*, 3398–3406.
- Connolly, C.N., and Wafford, K.A. (2004). The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem. Soc. Trans.* *32*, 529–534.
- Corral-Corral, I., and Corral-Corral, C. (2016). [Tarantism in Spain in the eighteen century: Iatrodoctism and suggestion]. *Rev. Neurol.* *63*, 370–379.
- Corringer, P.-J., Novère, N.L., and Changeux, J.-P. (2000). Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *40*, 431–458.
- Corringer, P.-J., Poitevin, F., Prevost, M.S., Sauguet, L., Delarue, M., and Changeux, J.-P. (2012). Structure and Pharmacology of Pentameric Receptor Channels: From Bacteria to Brain. *Structure* *20*, 941–956.
- Couturier, S., Bertrand, D., Matter, J.-M., Hernandez, M.-C., Bertrand, S., Millar, N., Valera, S., Barkas, T., and Ballivet, M. (1990). A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ($\alpha 7$) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by α -BTX. *Neuron* *5*, 847–856.
- Crespi, A., Colombo, S.F., and Gotti, C. (2018). Proteins and chemical chaperones involved in neuronal nicotinic receptor expression and function: an update: Chaperones for nAChRs. *Br. J. Pharmacol.* *175*, 1869–1879.
- Cui, Y.-J., Yu, L.-L., Xu, H.-J., Dong, K., and Zhang, C.-X. (2012). Molecular characterization of DSC1 orthologs in invertebrate species. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *42*, 353–359.
- Dale, D. (1914). Hydrogen ion concentrations limiting automaticity in different regions of the frog's heart. *J. Physiol.* *47*, 493–508.
- Dale, H.H., and Dudley, H.W. (1929). The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. *J. Physiol.* *68*, 97–123.
- Dale, R.P., Jones, A.K., Tamborindeguy, C., Davies, T.G.E., Amey, J.S., Williamson, S., Wolstenholme, A., Field, L.M., Williamson, M.S., Walsh, T.K., et al. (2010). Identification of ion channel genes in the *Acyrtosiphon pisum* genome: Ion channel genes in the pea aphid. *Insect Mol. Biol.* *19*, 141–153.
- Daly, N.L., and Craik, D.J. (2011). Bioactive cystine knot proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *15*, 362–368.
- Dascal, N. (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit. Rev. Biochem.* *22*, 317–387.

- Decourtye, A., and Devillers, J. (2010). Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. *Adv. Exp. Med. Biol.* *683*, 85–95.
- Decourtye, A., Lacassie, E., and Pham-Delègue, M.-H. (2003). Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manag. Sci.* *59*, 269–278.
- Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Cluzeau, S., and Pham-Delègue, M.H. (2005). Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* *48*, 242–250.
- Déglise, P., Grünewald, B., and Gauthier, M. (2002). The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neurosci. Lett.* *321*, 13–16.
- Dent, J.A. (2010). The evolution of pentameric ligand-gated ion channels. *Adv. Exp. Med. Biol.* *683*, 11–23.
- Deuis, J.R., Dekan, Z., Wingerd, J.S., Smith, J.J., Munasinghe, N.R., Bhola, R.F., Imlach, W.L., Herzig, V., Armstrong, D.A., Rosengren, K.J., et al. (2017). Pharmacological characterisation of the highly NaV1.7 selective spider venom peptide Pn3a. *Sci. Rep.* *7*.
- Dhananjaya, B.L., and Sivashankari, P.R. (2015). Snake venom derived molecules in tumor angiogenesis and its application in cancer therapy; an overview. *Curr. Top. Med. Chem.* *15*, 649–657.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.F. (1999). The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol. Rev.* *51*, 7–62.
- Diniz, M.R.V., Paiva, A.L.B., Guerra-Duarte, C., Nishiyama, M.Y., Mudadu, M.A., Oliveira, U. de, Borges, M.H., Yates, J.R., and Junqueira-de-Azevedo, I. de L. (2018). An overview of Phoneutria nigriventer spider venom using combined transcriptomic and proteomic approaches. *PLOS ONE* *13*, e0200628.
- Diocot, S., Drici, M.D., Moinier, D., Fink, M., and Lazdunski, M. (1999). Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of Ito1 in cardiac electrogenesis. *Br. J. Pharmacol.* *126*, 251–263.
- Diocot, S., Alloui, A., Rodrigues, P., Dauvois, M., Friend, V., Aissouni, Y., Eschalier, A., Lingueglia, E., and Baron, A. (2016). Analgesic effects of mambalgin peptide inhibitors of acid-sensing ion channels in inflammatory and neuropathic pain: *PAIN* *157*, 552–559.
- Doering, C., and Zamponi, G. (2005). Molecular Pharmacology of Non-L-type Calcium Channels. *Curr. Pharm. Des.* *11*, 1887–1898.
- Dolphin, A.C. (2016). Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *J. Physiol.* *594*, 5369–5390.
- Dong, K. (2007). Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebr. Neurosci.* *IN 7*, 17–30.
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., Silver, K., and Zhorov, B.S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *50*, 1–17.

Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Wang, L., and Xu, P. (2015). The *Drosophila* Sodium Channel 1 (DSC1): The founding member of a new family of voltage-gated cation channels. *Pestic. Biochem. Physiol.* *120*, 36–39.

Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* *280*, 69–77.

Drukewitz, S., Fuhrmann, N., Undheim, E., Blanke, A., Giribaldi, J., Mary, R., Laconde, G., Dutertre, S., and von Reumont, B. (2018). A Dipteran's Novel Sucker Punch: Evolution of Arthropod Atypical Venom with a Neurotoxic Component in Robber Flies (Asilidae, Diptera). *Toxins* *10*, 29.

Dupuis, J., Louis, T., Gauthier, M., and Raymond, V. (2012). Insights from honeybee (*Apis mellifera*) and fly (*Drosophila melanogaster*) nicotinic acetylcholine receptors: From genes to behavioral functions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *36*, 1553–1564.

Dupuis, J.P., Bazelot, M., Barbara, G.S., Paute, S., Gauthier, M., and Raymond-Delpech, V. (2010). Homomeric RDL and Heteromeric RDL/LCCH3 GABA Receptors in the Honeybee Antennal Lobes: Two Candidates for Inhibitory Transmission in Olfactory Processing. *J. Neurophysiol.* *103*, 458–468.

Dutertre, S. (2014). Venomics in medicinal chemistry. *Future Med. Chem.* *6*, 1609–1610.

Dutertre, S., and Lewis, R.J. (2006). Toxin insights into nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* *72*, 661–670.

Dutertre, S., and Lewis, R.J. (2010). Use of Venom Peptides to Probe Ion Channel Structure and Function. *J. Biol. Chem.* *285*, 13315–13320.

Dutertre, S., Jin, A., Kaas, Q., Jones, A., Alewood, P.F., and Lewis, R.J. (2013). Deep Venomics Reveals the Mechanism for Expanded Peptide Diversity in Cone Snail Venom. *Mol. Cell. Proteomics* *12*, 312–329.

Dutertre, S., Jin, A.-H., Alewood, P.F., and Lewis, R.J. (2014a). Intraspecific variations in *Conus* geographus defence-evoked venom and estimation of the human lethal dose. *Toxicon* *91*, 135–144.

Dutertre, S., Jin, A.-H., Vetter, I., Hamilton, B., Sunagar, K., Lavergne, V., Dutertre, V., Fry, B.G., Antunes, A., Venter, D.J., et al. (2014b). Evolution of separate predation- and defence-evoked venoms in carnivorous cone snails. *Nat. Commun.* *5*.

Dutertre, S., Nicke, A., and Tsetlin, V.I. (2017). Nicotinic acetylcholine receptor inhibitors derived from snake and snail venoms. *Neuropharmacology* *127*, 196–223.

Edgerton, G.B., Blumenthal, K.M., and Hanck, D.A. (2008). Evidence for multiple effects of ProTxII on activation gating in Na(V)1.5. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxicology* *52*, 489–500.

Edgerton, G.B., Blumenthal, K.M., and Hanck, D.A. (2010). Inhibition of the activation pathway of the T-type calcium channel Ca(V)3.1 by ProTxII. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxicology* *56*, 624–636.

El Hassani, A.K., Dacher, M., Gauthier, M., and Armengaud, C. (2005). Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol. Biochem. Behav.* *82*, 30–39.

- El Hassani, A.K., Dupuis, J.P., Gauthier, M., and Armengaud, C. (2009). Glutamatergic and GABAergic effects of fipronil on olfactory learning and memory in the honeybee. *Invertebr. Neurosci.* *9*, 91–100.
- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., and Nauen, R. (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manag. Sci.* *64*, 1099–1105.
- Elgoyhen, A.B., Vetter, D.E., Katz, E., Rothlin, C.V., Heinemann, S.F., and Boulter, J. (2001). 10: A determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 3501–3506.
- Ellis, J.D., Spiewok, S., Delaplane, K.S., Buchholz, S., Neumann, P., and Tedders, W.L. (2010). Susceptibility of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) larvae and pupae to entomopathogenic nematodes. *J. Econ. Entomol.* *103*, 1–9.
- Enell, L., Hamasaka, Y., Kolodziejczyk, A., and Nässel, D.R. (2007). γ -Aminobutyric acid (GABA) signaling components in *Drosophila*: Immunocytochemical localization of GABAB receptors in relation to the GABAA receptor subunit RDL and a vesicular GABA transporter. *J. Comp. Neurol.* *505*, 18–31.
- Eriksson, P. (1997). Developmental neurotoxicity of environmental agents in the neonate. *Neurotoxicology* *18*, 719–726.
- Escoubas, P., Quinton, L., and Nicholson, G.M. (2008). Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* *JMS 43*, 279–295.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (2010). EPPO Standards - Environmental risk assessment scheme for plant protection products. *Bull. EPPO* 323–331.
- European Food Safety Authority (2013). European Food Safety Authority | Trusted science for safe food.
- Fabre, J.-H. (1882). *La Tarentule à ventre noir*, de Jean-Henri FABRE, Souvenirs entomologiques.
- Featherstone, D.E., Rushton, E., Rohrbough, J., Liebl, F., Karr, J., Sheng, Q., Rodesch, C.K., and Broadie, K. (2005). An essential *Drosophila* glutamate receptor subunit that functions in both central neuropil and neuromuscular junction. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 3199–3208.
- Fedorova, I.M., Magazanik, L.G., and Tikhonov, D.B. (2009). Characterization of ionotropic glutamate receptors in insect neuro-muscular junction. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* *CBP 149*, 275–280.
- Feng, G., Deak, P., Chopra, M., and Hall, L.M. (1995). Cloning and functional analysis of tipE, a novel membrane protein that enhances *drosophila para* sodium channel function. *Cell* *82*, 1001–1011.
- Feyereisen, R. (1995). Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol. Lett.* *82–83*, 83–90.
- Feyereisen, R., Dermauw, W., and Van Leeuwen, T. (2015). Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. *Pestic. Biochem. Physiol.* *121*, 61–77.
- Ffrench-Constant, R.H., and Rocheleau, T.A. (1993). *Drosophila* gamma-aminobutyric acid receptor gene Rdl shows extensive alternative splicing. *J. Neurochem.* *60*, 2323–2326.

- Fleisher, J.H., Killos, P.J., and Harrison, C.S. (1961). Effects of puffer poison on neuromuscular transmission. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *133*, 98–105.
- Frisch, K. von, and Dalcq, A. (2011). *Vie et moeurs des abeilles* (Paris: A. Michel).
- Frost, E.H., Shutler, D., and Hillier, N.K. (2012). The proboscis extension reflex to evaluate learning and memory in honeybees (*Apis mellifera*): some caveats. *Naturwissenschaften* *99*, 677–686.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., and Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *28*, 3150–3152.
- Gallai, N., Salles, J.-M., Settele, J., and Vaissière, B.E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* *68*, 810–821.
- Gao, B., Harvey, P.J., Craik, D.J., Ronjat, M., De Waard, M., and Zhu, S. (2013). Functional evolution of scorpion venom peptides with an inhibitor cystine knot fold. *Biosci. Rep.* *33*.
- Gao, B., Peng, C., Yang, J., Yi, Y., Zhang, J., and Shi, Q. (2017). Cone Snails: A Big Store of Conotoxins for Novel Drug Discovery. *Toxins* *9*.
- Garb, J.E. (2014). Extraction of Venom and Venom Gland Microdissections from Spiders for Proteomic and Transcriptomic Analyses. *J. Vis. Exp.*
- Gargominy, O. (2010). A new enemy of honeybees in Europe: the Asian hornet *Vespa velutina*. in.
- Gatehouse, A.M.R., Ferry, N., Edwards, M.G., and Bell, H.A. (2011). Insect-resistant biotech crops and their impacts on beneficial arthropods. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *366*, 1438–1452.
- Gauthier, M. (2010). State of the Art on Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor Function in Learning and Memory. In *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*, S.H. Thany, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 97–115.
- Gauthier, M., Dacher, M., Thany, S., Niggebrugge, C., Deglise, P., Kljucovic, P., Armengaud, C., and Grunewald, B. (2006). Involvement of α -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*). *Neurobiol. Learn. Mem.* *86*, 164–174.
- Georghiou, G.P. (1994). Principles of insecticide resistance management. *Phytoprotection* *75*, 51–59.
- Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O., and Raine, N.E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature* *491*, 105–108.
- Giray, B., Çağlayan, A., Erkekoğlu, P., and Hincal, F. (2010). Fenvalerate exposure alters thyroid hormone status in selenium- and/or iodine-deficient rats. *Biol. Trace Elem. Res.* *135*, 233–241.
- Giribaldi, J., Wilson, D., Nicke, A., El Hamdaoui, Y., Laconde, G., Faucherre, A., Moha Ou Maati, H., Daly, N., Enjalbal, C., and Dutertre, S. (2018). Synthesis, Structure and Biological Activity of CIA and CIB, Two α -Conotoxins from the Predation-Evoked Venom of *Conus catus*. *Toxins* *10*, 222.
- Gisselmann, G., Wetzels, C.H., Warnstedt, M., and Hatt, H. (2004). Functional characterization of I_h -channel splice variants from *Apis mellifera*. *FEBS Lett.* *575*, 99–104.

- Goldberg, F., Grünewald, B., Rosenboom, H., and Menzel, R. (1999). Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kenyon cells from the mushroom bodies of the honey bee *Apis mellifera*. *J. Physiol.* *514*, 759–768.
- Goldin, A.L. (1991). Expression of ion channels by injection of mRNA into *Xenopus* oocytes. *Methods Cell Biol.* *36*, 487–509.
- Goldin, A.L., Barchi, R.L., Caldwell, J.H., Hofmann, F., Howe, J.R., Hunter, J.C., Kallen, R.G., Mandel, G., Meisler, M.H., Netter, Y.B., et al. (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* *28*, 365–368.
- Gonoi, T., Hille, B., and Catterall, W.A. (1984). Voltage clamp analysis of sodium channels in normal and scorpion toxin-resistant neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *4*, 2836–2842.
- Gosselin-Badaroudine, P., Moreau, A., Delemotte, L., Cens, T., Collet, C., Rousset, M., Charnet, P., Klein, M.L., and Chahine, M. (2015). Characterization of the honeybee AmNaV1 channel and tools to assess the toxicity of insecticides. *Sci. Rep.* *5*.
- Gosselin-Badaroudine, P., Moreau, A., Simard, L., Cens, T., Rousset, M., Collet, C., Charnet, P., and Chahine, M. (2016). Biophysical characterization of the honeybee DSC1 orthologue reveals a novel voltage-dependent Ca²⁺ channel subfamily: CaV4. *J. Gen. Physiol.* *148*, 133–145.
- Gotti, C., Clementi, F., Fornari, A., Gaimarri, A., Guiducci, S., Manfredi, I., Moretti, M., Pedrazzi, P., Pucci, L., and Zoli, M. (2009). Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem. Pharmacol.* *78*, 703–711.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., and Rotheray, E.L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* *347*, 1255957.
- Goyffon, M., and Heurtault, J. (1995). *La fonction venimeuse* (Paris: Masson).
- Gu, S., Matta, J.A., Lord, B., Harrington, A.W., Sutton, S.W., Davini, W.B., and Brecht, D.S. (2016). Brain $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Assembly Requires NACHO. *Neuron* *89*, 948–955.
- Gunasekara, A.S., Troiano, J., Goh, K.S., and Tjeerdema, R.S. (2007). Chemistry and fate of simazine. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* *189*, 1–23.
- Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R., and Marbaix, G. (1971). Use of Frog Eggs and Oocytes for the Study of Messenger RNA and its Translation in Living Cells. *Nature* *233*, 177–182.
- Gurnett, C.A., Felix, R., and Campbell, K.P. (1997). Extracellular Interaction of the Voltage-dependent Ca²⁺ Channel $\alpha 2\delta$ and $\alpha 1$ Subunits. *J. Biol. Chem.* *272*, 18508–18512.
- Gutnick, M.J., Lux, H.D., Swandulla, D., and Zucker, H. (1989). Voltage-dependent and calcium-dependent inactivation of calcium channel current in identified snail neurones. *J. Physiol.* *412*, 197–220.
- Halevi, S., McKay, J., Palfreyman, M., Yassin, L., Eshel, M., Jorgensen, E., and Treinin, M. (2002). The *C.elegans ric-3* gene is required for maturation of nicotinic acetylcholine receptors. *EMBO J.* *21*, 1012–1020.

- Halevi, S., Yassin, L., Eshel, M., Sala, F., Sala, S., Criado, M., and Treinin, M. (2003). Conservation within the RIC-3 Gene Family EFFECTORS OF MAMMALIAN NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR EXPRESSION. *J. Biol. Chem.* 278, 34411–34417.
- Halm, M.-P., Rortais, A., Arnold, G., Taséi, J.N., and Rault, S. (2006). New risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). *Environ. Sci. Technol.* 40, 2448–2454.
- Hammer, M., and Menzel, R. (1995). Learning and memory in the honeybee. *J. Neurosci.* 15, 1617–1630.
- Hans, M., Urrutia, A., Deal, C., Brust, P.F., Stauderman, K., Ellis, S.B., Harpold, M.M., Johnson, E.C., and Williams, M.E. (1999). Structural elements in domain IV that influence biophysical and pharmacological properties of human alpha1A-containing high-voltage-activated calcium channels. *Biophys. J.* 76, 1384–1400.
- Harmar, A.J., Hills, R.A., Rosser, E.M., Jones, M., Buneman, O.P., Dunbar, D.R., Greenhill, S.D., Hale, V.A., Sharman, J.L., Bonner, T.I., et al. (2009). IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. *Nucleic Acids Res.* 37, D680-685.
- Hendrickson, L.M., Guildford, M.J., and Tapper, A.R. (2013). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors: Common Molecular Substrates of Nicotine and Alcohol Dependence. *Front. Psychiatry* 4.
- Henriques, S.T., Deplazes, E., Lawrence, N., Cheneval, O., Chaousis, S., Inserra, M., Thongyoo, P., King, G.F., Mark, A.E., Vetter, I., et al. (2016). Interaction of Tarantula Venom Peptide ProTx-II with Lipid Membranes Is a Prerequisite for Its Inhibition of Human Voltage-gated Sodium Channel Na_v 1.7. *J. Biol. Chem.* 291, 17049–17065.
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., and Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348–350.
- Hermitte, L.C.D. (1946). Venomous marine molluscs of the genus *Conus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 39, 485–512.
- Hermsen, B., Stetzer, E., Thees, R., Heiermann, R., Schrattenholz, A., Ebbinghaus, U., Kretschmer, A., Methfessel, C., Reinhardt, S., and Maelicke, A. (1998). Neuronal nicotinic receptors in the locust *Locusta migratoria*. Cloning and expression. *J. Biol. Chem.* 273, 18394–18404.
- Herzig, V., and Hodgson, W.C. (2009). Intersexual variations in the pharmacological properties of *Coremiocnemis tropix* (Araneae, Theraphosidae) spider venom. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 53, 196–205.
- Herzig, V., Wood, D.L.A., Newell, F., Chaumeil, P.-A., Kaas, Q., Binford, G.J., Nicholson, G.M., Gorse, D., and King, G.F. (2011). ArachnoServer 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures. *Nucleic Acids Res.* 39, D653–D657.
- Hess, P., Lansman, J.B., and Tsien, R.W. (1986). Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. *J. Gen. Physiol.* 88, 293–319.

- Hibbs, R.E., Sulzenbacher, G., Shi, J., Talley, T.T., Conrod, S., Kem, W.R., Taylor, P., Marchot, P., and Bourne, Y. (2009). Structural determinants for interaction of partial agonists with acetylcholine binding protein and neuronal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *EMBO J.* *28*, 3040–3051.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., and Kurachi, Y. (2010). Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev.* *90*, 291–366.
- Hille, B. (2001). *Ion channels of excitable membranes* (Sunderland, Mass: Sinauer).
- Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* *117*, 500–544.
- Hodgkin, A.L., and Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* *108*, 37–77.
- Honda, H., Tomizawa, M., and Casida, J.E. (2006). Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors: Neonicotinoid Binding Site Specificity Is Usually but Not Always Conserved with Varied Substituents and Species. *J. Agric. Food Chem.* *54*, 3365–3371.
- Hosie, A., Sattelle, D., Aronstein, K., and French-Constant, R. (1997). Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends Neurosci.* *20*, 578–583.
- Hosie, A.M., Baylis, H.A., Buckingham, S.D., and Sattelle, D.B. (1995). Actions of the insecticide fipronil, on dieldrin-sensitive and-resistant GABA receptors of *Drosophila melanogaster*. *Br. J. Pharmacol.* *115*, 909–912.
- Huang, L., Wang, Z., Yu, N., Li, J., and Liu, Z. (2018). Toxin diversity revealed by the venom gland transcriptome of *Pardosa pseudoannulata*, a natural enemy of several insect pests. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* *28*, 172–182.
- Ihara, M., Okajima, T., Yamashita, A., Oda, T., Hirata, K., Nishiwaki, H., Morimoto, T., Akamatsu, M., Ashikawa, Y., Kuroda, S., et al. (2008). Crystal structures of *Lymnaea stagnalis* AChBP in complex with neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin. *Invert. Neurosci.* *8*, 71–81.
- Ihara, M., Okajima, T., Yamashita, A., Oda, T., Asano, T., Matsui, M., Sattelle, D.B., and Matsuda, K. (2014). Studies on an acetylcholine binding protein identify a basic residue in loop G on the $\beta 1$ strand as a new structural determinant of neonicotinoid actions. *Mol. Pharmacol.* *86*, 736–746.
- Ikeda, T., Zhao, X., Nagata, K., Kono, Y., Shono, T., Yeh, J.Z., and Narahashi, T. (2001). Fipronil modulation of gamma-aminobutyric acid(A) receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *296*, 914–921.
- Isom, L.L. (2001). Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* *7*, 42–54.
- Itier, V., and Bertrand, D. (2001). Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS Lett.* *504*, 118–125.
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J.T., and Roe, R.M. (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot.* *23*, 371–378.

- Jacobsen, R.B., DelaCruz, R.G., Grose, J.H., McIntosh, J.M., Yoshikami, D., and Olivera, B.M. (1999). Critical residues influence the affinity and selectivity of alpha-conotoxin M1 for nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry* 38, 13310–13315.
- Jeong, K., Lee, S., Seo, H., Oh, Y., Jang, D., Choe, J., Kim, D., Lee, J.-H., and Jones, W.D. (2015). Ca- α 1T, a fly T-type Ca²⁺ channel, negatively modulates sleep. *Sci. Rep.* 5, 17893.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., and Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2897–2908.
- Jeziorski, M.C., Greenberg, R.M., and Anderson, P.A. (2000). The molecular biology of invertebrate voltage-gated Ca(2+) channels. *J. Exp. Biol.* 203, 841–856.
- Jiménez-Vargas, J.M., Possani, L.D., and Luna-Ramírez, K. (2017). Arthropod toxins acting on neuronal potassium channels. *Neuropharmacology* 127, 139–160.
- Jin, A.-H., Vetter, I., Himaya, S.W.A., Alewood, P.F., Lewis, R.J., and Dutertre, S. (2015). Transcriptome and proteome of *Conus planorbis* identify the nicotinic receptors as primary target for the defensive venom. *PROTEOMICS* 15, 4030–4040.
- Jones, A.K. (2018). How Complex Can Resistance to Dieldrin, the Insect γ -Aminobutyric Acid Receptor, Get? *Int. J. Insect Sci.* 10, 1179543318804782.
- Jones, A.K., and Sattelle, D.B. (2006). The cys-loop ligand-gated ion channel superfamily of the honeybee, *Apis mellifera*. *Invert. Neurosci.* 6, 123–132.
- Jones, A.K., and Sattelle, D.B. (2007). The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics* 8, 327.
- Jones, A.K., and Sattelle, D.B. (2010). Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Adv. Exp. Med. Biol.* 683, 25–43.
- Joshi, V., Bansal, S.K., and Verma, K.V. (1992). Sandfly fauna of domestic & para-domestic habitats in arid & semi-arid zones of Rajasthan. *Indian J. Med. Res.* 95, 93–94.
- Kadala, A., Charreton, M., Jakob, I., Cens, T., Rousset, M., Chahine, M., Le Conte, Y., Charnet, P., and Collet, C. (2014). Pyrethroids Differentially Alter Voltage-Gated Sodium Channels from the Honeybee Central Olfactory Neurons. *PLoS ONE* 9, e112194.
- Kamel, F., and Hoppin, J.A. (2004). Association of Pesticide Exposure with Neurologic Dysfunction and Disease. *Environ. Health Perspect.* 112, 950–958.
- Kandel, E.R., and Squire, L.R. (2000). Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind. *Science* 290, 1113–1120.
- Kao, C.Y. (1966). Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol. Rev.* 18, 997–1049.
- Katoh, K., and Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780.
- Kayser, H., Lee, C., Decock, A., Baur, M., Haettenschwiler, J., and Maienfisch, P. (2004). Comparative analysis of neonicotinoid binding to insect membranes: I. A structure–activity study of the mode

of[3H]imidacloprid displacement in *Myzus persicae* and *Aphis craccivora*. *Pest Manag. Sci.* *60*, 945–958.

Keramidas, A., Moorhouse, A.J., Schofield, P.R., and Barry, P.H. (2004). Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *86*, 161–204.

Keynes, R.D. (1963). CHLORIDE IN THE SQUID GIANT AXON. *J. Physiol.* *169*, 690–705.

Kievits, J., and Bruneau, E. (2009). Apimondia, fin de la langue de bois. *Abeilles Co* 14–18.

King, G.F. (2004). The wonderful world of spiders: preface to the special *Toxicon* issue on spider venoms. *Toxicon* *43*, 471–475.

King, G.F. (2011). Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opin. Biol. Ther.* *11*, 1469–1484.

King, G.F., and Coaker, H. (2014). The future of venoms-based drug discovery: an interview with Glenn King. *Future Med. Chem.* *6*, 1613–1615.

King, T.P., and Guralnick, M. (2004). Hymenoptera allergens. *Clin. Allergy Immunol.* *18*, 339–353.

King, G.F., Gentz, M.C., Escoubas, P., and Nicholson, G.M. (2008a). A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon* *52*, 264–276.

King, G.F., Escoubas, P., and Nicholson, G.M. (2008b). Peptide toxins that selectively target insect Na_v and Ca_v channels. *Channels* *2*, 100–116.

King, M.D., Long, T., Andersen, T., and McDougal, O.M. (2016). Genetic Algorithm Managed Peptide Mutant Screening: Optimizing Peptide Ligands for Targeted Receptor Binding. *J. Chem. Inf. Model.* *56*, 2378–2387.

Klebanoff, M.A., Carey, J.C., Hauth, J.C., Hillier, S.L., Nugent, R.P., Thom, E.A., Ernest, J.M., Heine, R.P., Wapner, R.J., Trout, W., et al. (2001). Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. *N. Engl. J. Med.* *345*, 487–493.

Klein, A.-M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., and Tschardtke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Biol. Sci.* *274*, 303–313.

Klint, J.K., Senff, S., Rupasinghe, D.B., Er, S.Y., Herzig, V., Nicholson, G.M., and King, G.F. (2012). Spider-venom peptides that target voltage-gated sodium channels: Pharmacological tools and potential therapeutic leads. *Toxicon* *60*, 478–491.

Kopljär, I., Grottesi, A., de Block, T., Rainier, J.D., Tytgat, J., Labro, A.J., and Snyders, D.J. (2016). Voltage-sensor conformation shapes the intra-membrane drug binding site that determines gambierol affinity in Kv channels. *Neuropharmacology* *107*, 160–167.

Koua, D., and Kuhn-Nentwig, L. (2017). Spider Neurotoxins, Short Linear Cationic Peptides and Venom Protein Classification Improved by an Automated Competition between Exhaustive Profile HMM Classifiers. *Toxins* *9*, 245.

- Kozlov, S., and Grishin, E. (2005). Classification of spider neurotoxins using structural motifs by primary structure features. Single residue distribution analysis and pattern analysis techniques. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* *46*, 672–686.
- Kratsios, P., Pinan-Lucarré, B., Kerk, S.Y., Weinreb, A., Bessereau, J.-L., and Hobert, O. (2015). Transcriptional Coordination of Synaptogenesis and Neurotransmitter Signaling. *Curr. Biol.* *25*, 1282–1295.
- Krogstad, D.J. (1996). Malaria as a reemerging disease. *Epidemiol. Rev.* *18*, 77–89.
- Kuang, Q., Purhonen, P., and Hebert, H. (2015). Structure of potassium channels. *Cell. Mol. Life Sci.* *72*, 3677–3693.
- Kuhn-Nentwig, L., Largiadèr, C.R., Streitberger, K., Chandru, S., Baumann, T., Kämpfer, U., Schaller, J., Schürch, S., and Nentwig, W. (2011). Purification, cDNA structure and biological significance of a single insulin-like growth factor-binding domain protein (SIBD-1) identified in the hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *41*, 891–901.
- Kulkarni, N.H., Yamamoto, A.H., Robinson, K.O., Mackay, T.F.C., and Anholt, R.R.H. (2002). The DSC1 channel, encoded by the *smi60E* locus, contributes to odor-guided behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *161*, 1507–1516.
- Kusano, K., Miledi, R., and Stinnakre, J. (1982). Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J. Physiol.* *328*, 143–170.
- Kuzmenkov, A.I., Fedorova, I.M., Vassilevski, A.A., and Grishin, E.V. (2013). Cysteine-rich toxins from *Lachesana tarabaevi* spider venom with amphiphilic C-terminal segments. *Biochim. Biophys. Acta* *1828*, 724–731.
- Langenegger, N., Nentwig, W., and Kuhn-Nentwig, L. (2019). Spider Venom: Components, Modes of Action, and Novel Strategies in Transcriptomic and Proteomic Analyses. *Toxins* *11*, 611.
- Langley, J.N. (1907). On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of “receptive” substances: Part I. *J. Physiol.* *36*, 347–384.
- Langley, J.N. (1909). On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of ‘receptive’ substances. *J. Physiol.* *39*, 235–295.
- Lansdell, S.J., Gee, V.J., Harkness, P.C., Doward, A.I., Baker, E.R., Gibb, A.J., and Millar, N.S. (2005). RIC-3 Enhances Functional Expression of Multiple Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes in Mammalian Cells. *Mol. Pharmacol.* *68*, 1431–1438.
- Lau, C.H.Y., King, G.F., and Mobli, M. (2016). Molecular basis of the interaction between gating modifier spider toxins and the voltage sensor of voltage-gated ion channels. *Sci. Rep.* *6*, 34333.
- Laufer, J., Pelhate, M., and Sattelle, D.B. (1985). Actions of pyrethroid insecticides on insect axonal sodium channels. *Pestic. Sci.* *16*, 651–661.
- Lauffer, L., Kanzy, E.J., Köhler, R., Kurrle, R., Enssle, K., and Seiler, F.R. (1995). Monomeric and dimeric forms of soluble receptors can differ in their neutralization potential. *Behring Inst. Mitt.* 21–31.
- Le Conte, Y. (2002). L’abeille dans la classification des insectes. *Abeilles Fleurs* 15–16.

- Le Conte, Y., and Navajas, M. (2008). Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 27, 485–497, 499–510.
- Lee, C.Y., and Chang, C.C. (1966). Modes of actions of purified toxins from elapid venoms on neuromuscular transmission. *Mem. Inst. Butantan* 33, 555–572.
- Leech, C.A., and Sattelle, D.B. (1992). Multiple conductances of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 31, 501–507.
- Leitch, B., and Laurent, G. (1996). GABAergic synapses in the antennal lobe and mushroom body of the locust olfactory system. *J. Comp. Neurol.* 372, 487–514.
- Levy, S. (2011). The pollinator crisis: What’s best for bees. *Nature* 479, 164–165.
- Li, W., and Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 22, 1658–1659.
- Littleton, J.T., and Ganetzky, B. (2000). Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* 26, 35–43.
- Liu, Z., Chung, I., and Dong, K. (2001). Alternative splicing of the BSC1 gene generates tissue-specific isoforms in the German cockroach. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 703–713.
- Liu, Z., Qian, W., Li, J., Zhang, Y., and Liang, S. (2009). Biochemical and pharmacological study of venom of the wolf spider *Lycosa singoriensis*. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 15, 79–92.
- Lloyd, G.K., and Williams, M. (2000). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as novel drug targets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292, 461–467.
- Lofts, B. (1975). ENVIRONMENTAL CONTROL OF REPRODUCTION.
- Madsen, T., and Noguchi, H. (1907). TOXINS AND ANTITOXINS--SNAKE VENOMS AND ANTIVENINS. *J. Exp. Med.* 9, 18–50.
- Mariottini, G.L., and Grice, I.D. (2019). Natural Compounds and Drug Discovery: Can Cnidarian Venom Play a Role? *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 19, 114–118.
- Marrus, S.B., Portman, S.L., Allen, M.J., Moffat, K.G., and DiAntonio, A. (2004). Differential localization of glutamate receptor subunits at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 1406–1415.
- Martin, S.J., Highfield, A.C., Brettell, L., Villalobos, E.M., Budge, G.E., Powell, M., Nikaido, S., and Schroeder, D.C. (2012). Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* 336, 1304–1306.
- Matsuda, K., Buckingham, S.D., Kleier, D., Rauh, J.J., Grauso, M., and Sattelle, D.B. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 573–580.
- McGivern, J.G. (2007). Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 3, 69–85.

- McIntosh, M., Cruz, L.J., Hunkapiller, M.W., Gray, W.R., and Olivera, B.M. (1982). Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. *Arch. Biochem. Biophys.* *218*, 329–334.
- Mebs, D., Narita, K., Iwanaga, S., Samejima, Y., and Lee, C.Y. (1972). Purification, properties and amino acid sequence of α -bungarotoxin from the venom of *Bungarus multicinctus*. *Hoppe. Seylers Z. Physiol. Chem.* *353*, 243–262.
- Melo-Braga, M.N., Almeida, F.D.M., Dos Santos, D.M., de Avelar Júnior, J.T., Dos Reis, P.V.M., and de Lima, M.E. (2020). Antimicrobial Peptides From Lycosidae (Sundevall, 1833) Spiders. *Curr. Protein Pept. Sci.*
- Ménard, C., Folacci, M., Brunello, L., Charreton, M., Collet, C., Mary, R., Rousset, M., Thibaud, J.-B., Vignes, M., Charnet, P., et al. (2018). Multiple combinations of RDL subunits diversify the repertoire of GABA receptors in the honey bee parasite *Varroa destructor*. *J. Biol. Chem.* *293*, 19012–19024.
- Menzel, R. (2012). *Honeybee Neurobiology and Behavior: A Tribute to Randolph Menzel* (Dordrecht: Springer Netherlands).
- Middleton, R.E., Warren, V.A., Kraus, R.L., Hwang, J.C., Liu, C.J., Dai, G., Brochu, R.M., Kohler, M.G., Gao, Y.-D., Garsky, V.M., et al. (2002). Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels. *Biochemistry* *41*, 14734–14747.
- Miledi, R. (1982). A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *215*, 491–497.
- Miledi, R., Parker, I., and Sumikawa, K. (1982a). Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* *1*, 1307–1312.
- Miledi, R., Parker, I., and Sumikawa, K. (1982b). Synthesis of chick brain GABA receptors by frog oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *216*, 509–515.
- Millar, N.S. (1999). Heterologous expression of mammalian and insect neuronal nicotinic acetylcholine receptors in cultured cell lines. *Biochem. Soc. Trans.* *27*, 944–950.
- Millar, N.S. (2009). RIC-3: a nicotinic acetylcholine receptor chaperone: RIC-3: a nicotinic receptor chaperone. *Br. J. Pharmacol.* *153*, S177–S183.
- Miller, K.G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J.A., Johnson, C.D., and Rand, J.B. (1996). A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 12593–12598.
- Millet, P., Delforge, J., Pappata, S., Syrota, A., and Cinotti, L. (1996). Error analysis on parameter estimates in the ligand-receptor model: application to parameter imaging using PET data. *Phys. Med. Biol.* *41*, 2739–2756.
- Mintz, I.M., Venema, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Bean, B.P., and Adams, M.E. (1992). P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature* *355*, 827–829.
- Mishina, M., Kurosaki, T., Tobimatsu, T., Morimoto, Y., Noda, M., Yamamoto, T., Terao, M., Lindstrom, J., Takahashi, T., Kuno, M., et al. (1984). Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs. *Nature* *307*, 604–608.

- Mishina, M., Takai, T., Imoto, K., Noda, M., Takahashi, T., Numa, S., Methfessel, C., and Sakmann, B. (1986). Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* *321*, 406–411.
- Monceau, K., Bonnard, O., and Thiéry, D. (2013). *Vespa velutina*: a new invasive predator of honeybees in Europe. *J. Pest Sci.* *87*, 1–16.
- Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M.S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., and Furuichi, T. (1991). Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* *350*, 398–402.
- Morris, G.M., and Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *443*, 365–382.
- Mukherjee, A.K., Kalita, B., and Mackessy, S.P. (2016). A proteomic analysis of Pakistan *Daboia russelii russelii* venom and assessment of potency of Indian polyvalent and monovalent antivenom. *J. Proteomics* *144*, 73–86.
- Murray, J.K., Qian, Y.-X., Liu, B., Elliott, R., Aral, J., Park, C., Zhang, X., Stenkilsson, M., Salyers, K., Rose, M., et al. (2015). Pharmaceutical Optimization of Peptide Toxins for Ion Channel Targets: Potent, Selective, and Long-Lived Antagonists of Kv1.3. *J. Med. Chem.* *58*, 6784–6802.
- Murray, J.K., Long, J., Zou, A., Ligutti, J., Andrews, K.L., Poppe, L., Biswas, K., Moyer, B.D., McDonough, S.I., and Miranda, L.P. (2016). Single Residue Substitutions That Confer Voltage-Gated Sodium Ion Channel Subtype Selectivity in the Nav1.7 Inhibitory Peptide GpTx-1. *J. Med. Chem.* *59*, 2704–2717.
- Nai, Q., McIntosh, J.M., and Margiotta, J.F. (2003). Relating Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes Defined by Subunit Composition and Channel Function. *Mol. Pharmacol.* *63*, 311–324.
- Nakasu, E.Y.T., Williamson, S.M., Edwards, M.G., Fitches, E.C., Gatehouse, J.A., Wright, G.A., and Gatehouse, A.M.R. (2014). Novel biopesticide based on a spider venom peptide shows no adverse effects on honeybees. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *281*, 20140619.
- Namadurai, S., Yereddi, N.R., Cusdin, F.S., Huang, C.L.-H., Chirgadze, D.Y., and Jackson, A.P. (2015). A new look at sodium channel β subunits. *Open Biol.* *5*, 140192.
- Nauen, R., and Bretschneider, T. (2002). New modes of action of insecticides. *Pestic. Outlook* *13*, 241–245.
- Nemecz, Á., Prevost, M.S., Menny, A., and Corringer, P.-J. (2016). Emerging Molecular Mechanisms of Signal Transduction in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron* *90*, 452–470.
- Nernst, W. (1889). *Begründung der Theoretischen Chemie: Neun Abhandlungen, 1889-1921* (Frankfurt am Main: Verlag Harri Deutsch).
- Neumann, P., and Carreck, N.L. (2010). Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* *49*, 1–6.
- Nguyen, M., Alfonso, A., Johnson, C.D., and Rand, J.B. (1995). *Caenorhabditis Elegans* Mutants Resistant to Inhibitors of Acetylcholinesterase. *Genetics* *140*, 527.

- Nicholson, G.M., Graudins, A., Wilson, H.I., Little, M., and Broady, K.W. (2006). Arachnid toxinology in Australia: From clinical toxicology to potential applications. *Toxicon* 48, 872–898.
- Noda, M., Ikeda, T., Suzuki, H., Takeshima, H., Takahashi, T., Kuno, M., and Numa, S. (1986). Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. *Nature* 322, 826–828.
- Norton, R.S., and Chandy, K.G. (2017). Venom-derived peptide inhibitors of voltage-gated potassium channels. *Neuropharmacology* 127, 124–138.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P., and Tsien, R.W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316, 440–443.
- Nyffeler, M., and Birkhofer, K. (2017). An estimated 400–800 million tons of prey are annually killed by the global spider community. *Sci. Nat.* 104.
- Ødegaard, F. (2000). How many species of arthropods? Erwin's estimate revised. *Biol. J. Linn. Soc.* 71, 583–597.
- Ohkubo, T., Yamazaki, J., and Kitamura, K. (2010). Tarantula toxin ProTx-I differentiates between human T-type voltage-gated Ca²⁺ Channels Cav3.1 and Cav3.2. *J. Pharmacol. Sci.* 112, 452–458.
- Oldroyd, B.P. (2007). What's killing American honey bees? *PLoS Biol.* 5, e168.
- Ollerton, J., Price, V., Armbruster, W.S., Memmott, J., Watts, S., Waser, N.M., Totland, O., Goulson, D., Alarcón, R., Stout, J.C., et al. (2012). Overplaying the role of honey bees as pollinators: a comment on Aebi and Neumann (2011). *Trends Ecol. Evol.* 27, 141–142; author reply 142–143.
- Olsen, J.A., Balle, T., Gajhede, M., Ahring, P.K., and Kastrup, J.S. (2014). Molecular Recognition of the Neurotransmitter Acetylcholine by an Acetylcholine Binding Protein Reveals Determinants of Binding to Nicotinic Acetylcholine Receptors. *PLoS ONE* 9, e91232.
- Olson, R.O., Liu, Z., Nomura, Y., Song, W., and Dong, K. (2008). Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channel variants from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 604–610.
- Osteen, J.D., Herzig, V., Gilchrist, J., Emrick, J.J., Zhang, C., Wang, X., Castro, J., Garcia-Caraballo, S., Grundy, L., Rychkov, G.Y., et al. (2016). Selective spider toxins reveal a role for the Nav1.1 channel in mechanical pain. *Nature* 534, 494–499.
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A.L. (2006). How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 993–996.
- Park, J.H., Carlin, K.P., Wu, G., Ilyin, V.I., Musza, L.L., Blake, P.R., and Kyle, D.J. (2014). Studies examining the relationship between the chemical structure of protoxin II and its activity on voltage gated sodium channels. *J. Med. Chem.* 57, 6623–6631.
- Park, Y., Taylor, M.F., and Feyereisen, R. (1999). Voltage-gated sodium channel genes hscp and hDSC1 of *Heliobasis virescens* F. genomic organization. *Insect Mol. Biol.* 8, 161–170.
- Payandeh, J., Gamal El-Din, T.M., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2012). Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* 486, 135–139.

- Peng, K., Lin, Y., and Liang, S.-P. (2006). Nuclear Magnetic Resonance Studies on Huwentoxin-XI from the Chinese Bird Spider *Ornithoctonus huwena*: ¹⁵N Labeling and Sequence-specific ¹H, ¹⁵N Nuclear Magnetic Resonance Assignments. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* *38*, 457–466.
- Perl, O., Ilani, T., Strous, R.D., Lapidus, R., and Fuchs, S. (2003). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in schizophrenia: decreased mRNA levels in peripheral blood lymphocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 1948–1950.
- Piacentini, L.N., and Ramírez, M.J. (2019). Hunting the wolf: A molecular phylogeny of the wolf spiders (Araneae, Lycosidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* *136*, 227–240.
- Pierron, M., Pinan-Lucarré, B., and Bessereau, J.-L. (2016). Preventing Illegitimate Extrasynaptic Acetylcholine Receptor Clustering Requires the RSU-1 Protein. *J. Neurosci.* *36*, 6525–6537.
- Pineda, S.S., Chaumeil, P.-A., Kunert, A., Kaas, Q., Thang, M.W.C., Le, L., Nuhn, M., Herzig, V., Saez, N.J., Cristofori-Armstrong, B., et al. (2018). ArachnoServer 3.0: an online resource for automated discovery, analysis and annotation of spider toxins. *Bioinformatics* *34*, 1074–1076.
- Planas, E., Fernández-Montraveta, C., and Ribera, C. (2013). Molecular systematics of the wolf spider genus *Lycosa* (Araneae: Lycosidae) in the Western Mediterranean Basin. *Mol. Phylogenet. Evol.* *67*, 414–428.
- Platnick, N. (2014). The World Spider Venom Catalog. Version 14.0. DOI 105531dbiz0001.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., and Kunin, W.E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* *25*, 345–353.
- Powell, M.E., Bradish, H.M., Cao, M., Makinson, R., Brown, A.P., Gatehouse, J.A., and Fitches, E.C. (2020). Demonstrating the potential of a novel spider venom-based biopesticide for target-specific control of the small hive beetle, a serious pest of the European honeybee. *J. Pest Sci.* *93*, 391–402.
- Prashanth, J.R., Brust, A., Jin, A.-H., Alewood, P.F., Dutertre, S., and Lewis, R.J. (2014). Cone snail venomomics: from novel biology to novel therapeutics. *Future Med. Chem.* *6*, 1659–1675.
- Price, K.L., and Lummis, S.C.R. (2014). An atypical residue in the pore of *Varroa destructor* GABA-activated RDL receptors affects picrotoxin block and thymol modulation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *55*, 19–25.
- Priest, B.T., Blumenthal, K.M., Smith, J.J., Warren, V.A., and Smith, M.M. (2007). ProTx-I and ProTx-II: gating modifiers of voltage-gated sodium channels. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxicology* *49*, 194–201.
- Qin, G., Schwarz, T., Kittel, R.J., Schmid, A., Rasse, T.M., Kappei, D., Ponimaskin, E., Heckmann, M., and Sigrist, S.J. (2005). Four different subunits are essential for expressing the synaptic glutamate receptor at neuromuscular junctions of *Drosophila*. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 3209–3218.
- Qin, Q.-H., He, X.-J., Tian, L.-Q., Zhang, S.-W., and Zeng, Z.-J. (2012). Comparison of learning and memory of *Apis cerana* and *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* *198*, 777–786.
- Quintavalle, A. (2012). Voltage-Gated Calcium Channels in Honey Bees: Physiological Roles and Potential Targets for Insecticides — Département de Biologie.

- Ramaswami, M., and Tanouye, M.A. (1989). Two sodium-channel genes in *Drosophila*: implications for channel diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 2079–2082.
- Rasar, M.A., and Hammes, S.R. (2006). The physiology of the *Xenopus laevis* ovary. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *322*, 17–30.
- Rash, L.D., and Hodgson, W.C. (2002). Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* *40*, 225–254.
- Rash, L.D., King, R.G., and Hodgson, W.C. (2000). Sex differences in the pharmacological activity of venom from the white-tailed spider (*Lampona cylindrata*). *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* *38*, 1111–1127.
- Raymond, V., and Sattelle, D.B. (2002). Novel animal-health drug targets from ligand-gated chloride channels. *Nat. Rev. Drug Discov.* *1*, 427–436.
- Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle, B.M., Rauh, J.J., and Sattelle, D.B. (2005). Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert. Neurosci.* *5*, 119–133.
- Ritchie, J.M. (1980). Tetrodotoxin and saxitoxin, and the sodium channels of excitable tissue. *Trends Pharmacol. Sci.* *1*, 275–279.
- Robinson, R.B., and Siegelbaum, S.A. (2003). Hyperpolarization-Activated Cation Currents: From Molecules to Physiological Function. *Annu. Rev. Physiol.* *65*, 453–480.
- Rohrbough, J., and Broadie, K. (2002). Electrophysiological analysis of synaptic transmission in central neurons of *Drosophila* larvae. *J. Neurophysiol.* *88*, 847–860.
- Rong, M., Liu, J., Zhang, M., Wang, G., Zhao, G., Wang, G., Zhang, Y., Hu, K., and Lai, R. (2016). A sodium channel inhibitor ISTX-I with a novel structure provides a new hint at the evolutionary link between two toxin folds. *Sci. Rep.* *6*.
- Rortais, A., Villemant, C., Gargominy, O., Rome, Q., and Haxaire, J. (2010). (PDF) A New Enemy of Honeybees in Europe: the Asian Hornet *Vespa velutina*.
- Rougier, O., Vassort, G., Gargouil, Y.M., Coraboeuf, E., and Garnier, D. (1969). Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. *Pflüg. Arch.* *308*, 91–110.
- Rousset, M., Charnet, P., and Cens, T. (2005). Structure de la sous-unité β du canal calcique : la place du β -interaction domain. *Médecine/Sciences* *21*, 279–283.
- Rousset, M., Cens, T., Menard, C., Bowerman, M., Bellis, M., Brusés, J., Raoul, C., Scamps, F., and Charnet, P. (2015). Regulation of neuronal high-voltage activated CaV2 Ca²⁺ channels by the small GTPase RhoA. *Neuropharmacology* *97*, 201–209.
- Rousset, M., Collet, C., Cens, T., Bastin, F., Raymond, V., Massou, I., Menard, C., Thibaud, J.-B., Charreton, M., Vignes, M., et al. (2017). Honeybee locomotion is impaired by Am-CaV3 low voltage-activated Ca²⁺ channel antagonist. *Sci. Rep.* *7*.
- Ryglewski, S., Lance, K., Levine, R.B., and Duch, C. (2012). Ca_v2 channels mediate low and high voltage-activated calcium currents in *Drosophila* motoneurons: Novel roles for Dmca1A and Dm α G calcium channels. *J. Physiol.* *590*, 809–825.

- Saez, N.J., Senff, S., Jensen, J.E., Er, S.Y., Herzig, V., Rash, L.D., and King, G.F. (2010). Spider-Venom Peptides as Therapeutics. *Toxins* 2, 2851–2871.
- Saikia, S., and Bordoloi, M. (2019). Molecular Docking: Challenges, Advances and its Use in Drug Discovery Perspective. *Curr. Drug Targets* 20, 501–521.
- Saito, M., and Kawai, N. (1985). Developmental changes in the glutamate receptor at the insect neuromuscular synapse. *Brain Res.* 350, 97–102.
- Salvador-Recatalà, V., and Greenberg, R.M. (2012). Calcium channels of schistosomes: unresolved questions and unexpected answers. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* 1, 85–93.
- Sandoz, J.C. (2011). Behavioral and neurophysiological study of olfactory perception and learning in honeybees. *Front. Syst. Neurosci.* 5, 98.
- Santos, D.M., Verly, R.M., Piló-Veloso, D., de Maria, M., de Carvalho, M. a. R., Cisalpino, P.S., Soares, B.M., Diniz, C.G., Farias, L.M., Moreira, D.F.F., et al. (2010). LyeTx I, a potent antimicrobial peptide from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. *Amino Acids* 39, 135–144.
- dos Santos, L., Dias, N., Roberto, J., Pinto, A., and Palma, M. (2009). Brown Recluse Spider Venom: Proteomic Analysis and Proposal of a Putative Mechanism of Action. *Protein Pept. Lett.* 16, 933–943.
- Sattelle, D.B., Lummis, S.C.R., Wong, J.F.H., and Rauh, J.J. (1991). Pharmacology of insect GABA receptors. *Neurochem. Res.* 16, 363–374.
- Schneider, C.W., Tautz, J., Grünewald, B., and Fuchs, S. (2012). RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS One* 7, e30023.
- Sgard, F., Charpentier, E., Bertrand, S., Walker, N., Caput, D., Graham, D., Bertrand, D., and Besnard, F. (2002). A novel human nicotinic receptor subunit, $\alpha 10$, that confers functionality to the $\alpha 9$ -subunit. *Mol. Pharmacol.* 61, 150–159.
- Shen, H., Li, Z., Jiang, Y., Pan, X., Wu, J., Cristofori-Armstrong, B., Smith, J.J., Chin, Y.K.Y., Lei, J., Zhou, Q., et al. (2018). Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins. *Science* 362, eaau2596.
- Sherer, T.B., Kim, J.-H., Betarbet, R., and Greenamyre, J.T. (2003). Subcutaneous Rotenone Exposure Causes Highly Selective Dopaminergic Degeneration and α -Synuclein Aggregation. *Exp. Neurol.* 179, 9–16.
- Shu, Q., and Liang, S.P. (1999). Purification and characterization of huwentoxin-II, a neurotoxic peptide from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *J. Pept. Res. Off. J. Am. Pept. Soc.* 53, 486–491.
- Smith, J., and Undheim, E. (2018). True Lies: Using Proteomics to Assess the Accuracy of Transcriptome-Based Venomics in Centipedes Uncover False Positives and Reveals Startling Intraspecific Variation in *Scolopendra subspinipes*. *Toxins* 10, 96.
- Snutch, T.P. (1988). The use of *Xenopus* oocytes to probe synaptic communication. *Trends Neurosci.* 11, 250–256.
- Soesanto, L. (2012). BIOPESTICIDES: IMPACT TO THE ENVIRONMENT.

- Soravia, E., Martini, G., and Zasloff, M. (1988). Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Lett.* *228*, 337–340.
- Strachan, L.C., Lewis, R.J., and Nicholson, G.M. (1999). Differential actions of pacific ciguatoxin-1 on sodium channel subtypes in mammalian sensory neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *288*, 379–388.
- Taillebois, E., Cartereau, A., Jones, A.K., and Thany, S.H. (2018). Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. *Pestic. Biochem. Physiol.* *151*, 59–66.
- Taly, A., and Charon, S. (2012). $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors: A Therapeutic Target in the Structure Era. *Curr. Drug Targets* *13*, 695–706.
- Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P., and Changeux, J.-P. (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* *8*, 733–750.
- Tang, X., Zhang, Y., Hu, W., Xu, D., Tao, H., Yang, X., Li, Y., Jiang, L., and Liang, S. (2010). Molecular Diversification of Peptide Toxins from the Tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) Venom Based on Transcriptomic, Peptidomic, and Genomic Analyses. *J. Proteome Res.* *9*, 2550–2564.
- Tareilus, E., Hanke, W., and Breer, H. (1990). Neuronal acetylcholine receptor channels from insects: a comparative electrophysiological study. *J. Comp. Physiol. [A]* *167*, 521–526.
- Tasneem, A., Iyer, L.M., Jakobsson, E., and Aravind, L. (2005). Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. *Genome Biol.* *6*, R4.
- Tautz, J. (2009). L'étonnante abeille (De Boeck Supérieur).
- Taylor-Wells, J., Brooke, B.D., Bermudez, I., and Jones, A.K. (2015). The neonicotinoid imidacloprid, and the pyrethroid deltamethrin, are antagonists of the insect Rdl GABA receptor. *J. Neurochem.* *135*, 705–713.
- Tedford, H.W., Gilles, N., Ménez, A., Doering, C.J., Zamponi, G.W., and King, G.F. (2004). Scanning Mutagenesis of ω -Atracotoxin-Hv1a Reveals a Spatially Restricted Epitope That Confers Selective Activity against Insect Calcium Channels. *J. Biol. Chem.* *279*, 44133–44140.
- Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Ind. Biotechnol.* *2*, 194–208.
- Thany, S.H., Lenaers, G., Crozatier, M., Armengaud, C., and Gauthier, M. (2003). Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 3$ mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* *12*, 255–262.
- The European Commission (2013). 2013 Commission report on monitoring the application of EU law.
- Todorovic, S.M., and Jevtovic-Todorovic, V. (2011). T-type voltage-gated calcium channels as targets for the development of novel pain therapies: T-channels in nociceptive pathways. *Br. J. Pharmacol.* *163*, 484–495.
- Utkin, Y.N. (2015). Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World J. Biol. Chem.* *6*, 28–33.

- Uzair, B., Bint-E-Irshad, S., Khan, B.A., Azad, B., Mahmood, T., Rehman, M.U., and Braga, V.A. (2018). Scorpion Venom Peptides as a Potential Source for Human Drug Candidates. *Protein Pept. Lett.* *25*, 702–708.
- Van den Beukel, I., van Kleef, R.G., and Oortgiesen, M. (1998). Differential effects of physostigmine and organophosphates on nicotinic receptors in neuronal cells of different species. *Neurotoxicology* *19*, 777–787.
- vanEngelsdorp, D., and Meixner, M.D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* *103*, S80–S95.
- vanEngelsdorp, D., Underwood, R.M., and Cox-Foster, D.L. (2008). Short-term fumigation of honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies with formic and acetic acids for the control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *J. Econ. Entomol.* *101*, 256–264.
- vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., et al. (2009). Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE* *4*, e6481.
- Vassilevski, A.A., Kozlov, S.A., and Grishin, E.V. (2009). Molecular diversity of spider venom. *Biochem. Mosc.* *74*, 1505–1534.
- Vetter, I., Davis, J.L., Rash, L.D., Anangi, R., Mobli, M., Alewood, P.F., Lewis, R.J., and King, G.F. (2011). Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. *Amino Acids* *40*, 15–28.
- del Villar, S., and Jones, A. (2018). Cloning and Functional Characterisation of the Duplicated RDL Subunits from the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 2235.
- Wang, F., Yan, Z., Liu, Z., Wang, S., Wu, Q., Yu, S., Ding, J., and Dai, Q. (2016). Molecular basis of toxicity of N-type calcium channel inhibitor MVIIA. *Neuropharmacology* *101*, 137–145.
- Warmke, J.W., Reenan, R.A.G., Wang, P., Qian, S., Arena, J.P., Wang, J., Wunderler, D., Liu, K., Kaczorowski, G.J., der Ploeg, L.H.T.V., et al. (1997). Functional Expression of *Drosophila* para Sodium Channels. *J. Gen. Physiol.* *110*, 119–133.
- Wei, A., Jegla, T., and Salkoff, L. (1996). Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* *35*, 805–829.
- Weiland, S., Bertrand, D., and Leonard, S. (2000). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from the gene to the disease. *Behav. Brain Res.* *113*, 43–56.
- Weinstock, Robinson, and Gibbs (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* *443*, 931–949.
- West, J.W., Patton, D.E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A.L., and Catterall, W.A. (1992). A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *89*, 10910–10914.
- Windley, M.J., Herzig, V., Dziemborowicz, S.A., Hardy, M.C., King, G.F., and Nicholson, G.M. (2012). Spider-Venom Peptides as Bioinsecticides. *Toxins* *4*, 191–227.
- Winston, M.L. (1991). *The biology of the honey bee* (Cambridge, Mass.: Harvard Univ. Press).

- Wonnacott, S., Barik, J., Dickinson, J., and Jones, I.W. (2006). Nicotinic Receptors Modulate Transmitter Cross Talk in the CNS: Nicotinic Modulation of Transmitters. *J. Mol. Neurosci.* *30*, 137–140.
- Wright, Z.V.F., McCarthy, S., Dickman, R., Reyes, F.E., Sanchez-Martinez, S., Cryar, A., Kilford, I., Hall, A., Takle, A.K., Topf, M., et al. (2017). The Role of Disulfide Bond Replacements in Analogues of the Tarantula Toxin ProTx-II and Their Effects on Inhibition of the Voltage-Gated Sodium Ion Channel Nav1.7. *J. Am. Chem. Soc.* *139*, 13063–13075.
- Wüstenberg, D.G., Boytcheva, M., Grünewald, B., Byrne, J.H., Menzel, R., and Baxter, D.A. (2004). Current- and Voltage-Clamp Recordings and Computer Simulations of Kenyon Cells in the Honeybee. *J. Neurophysiol.* *92*, 2589–2603.
- Xiao, Y., Blumenthal, K., Jackson, J.O., Liang, S., and Cummins, T.R. (2010). The tarantula toxins ProTx-II and huwentoxin-IV differentially interact with human Nav1.7 voltage sensors to inhibit channel activation and inactivation. *Mol. Pharmacol.* *78*, 1124–1134.
- Xie, L., Gao, S., Alcaire, S.M., Aoyagi, K., Wang, Y., Griffin, J.K., Stagljar, I., Nagamatsu, S., and Zhen, M. (2013). NLF-1 Delivers a Sodium Leak Channel to Regulate Neuronal Excitability and Modulate Rhythmic Locomotion. *Neuron* *77*, 1069–1082.
- Yu, F.H., and Catterall, W.A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* *4*, 207.
- Zamponi, G.W., Striessnig, J., Koschak, A., and Dolphin, A.C. (2015). The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol. Rev.* *67*, 821–870.
- Zhang, F., Liu, C., Tan, H., Wang, H., Jiang, Y., Liang, S., Zhang, F., and Liu, Z. (2015a). A survey of the venom of the spider *Lycosa vittata* by biochemical, pharmacological and transcriptomic analyses. *Toxicon* *107*, 335–343.
- Zhang, J.F., Randall, A.D., Ellinor, P.T., Horne, W.A., Sather, W.A., Tanabe, T., Schwarz, T.L., and Tsien, R.W. (1993). Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* *32*, 1075–1088.
- Zhang, S., Schwarz, S., Pahl, M., Zhu, H., and Tautz, J. (2006). Honeybee memory: A honeybee knows what to do and when. *J. Exp. Biol.* *209*, 4420–4428.
- Zhang, T., Liu, Z., Song, W., Du, Y., and Dong, K. (2011). Molecular characterization and functional expression of the DSC1 channel. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *41*, 451–458.
- Zhang, X., Zheng, Y., Ren, Q., and Zhou, H. (2017). The involvement of potassium channel ORK1 in short-term memory and sleep in *Drosophila*: *Medicine (Baltimore)* *96*, e7299.
- Zhang, Y., Chen, J., Tang, X., Wang, F., Jiang, L., Xiong, X., Wang, M., Rong, M., Liu, Z., and Liang, S. (2010). Transcriptome analysis of the venom glands of the Chinese wolf spider *Lycosa singoriensis*. *Zoology* *113*, 10–18.
- Zhang, Y.-Y., Huang, Y., He, Q.-Z., Luo, J., Zhu, L., Lu, S.-S., Liu, J.-Y., Huang, P.-F., Zeng, X.-Z., and Liang, S.-P. (2015b). Structural and Functional Diversity of Peptide Toxins from Tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) Venom Revealed by Transcriptomic, Peptidomic, and Patch Clamp Approaches. *J. Biol. Chem.* *290*, 14192–14207.

Zhao, C., Xu, Z., Chen, J., Yu, Z., Tong, K.-L., Lo, W.-S., Pun, F.W., Ng, S.-K., Tsang, S.-Y., and Xue, H. (2006). Two isoforms of GABA(A) receptor beta2 subunit with different electrophysiological properties: Differential expression and genotypical correlations in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* *11*, 1092–1105.

Zhou, W., Chung, I., Liu, Z., Goldin, A.L., and Dong, K. (2004). A Voltage-Gated Calcium-Selective Channel Encoded by a Sodium Channel-like Gene. *Neuron* *42*, 101.

Zimmermann, K., Deuis, J.R., Inserra, M.C., Collins, L.S., Namer, B., Cabot, P.J., Reeh, P.W., Lewis, R.J., and Vetter, I. (2013). Analgesic treatment of ciguatoxin-induced cold allodynia. *Pain* *154*, 1999–2006.

Résumé/Abstract

Depuis 2006, un syndrome connu sous le nom de « syndrome d'effondrement des colonies » (ou CCD) est responsable d'une mortalité moyenne de 50% (dans les cas extrêmes jusqu'à 90%) des colonies d'abeilles dans certaines régions du monde. Bien que d'origine multifactorielle, la pulvérisation intensive d'insecticides montre un rôle majeur dans la mortalité des pollinisateurs. Or, en l'absence de protection, 30 à 40% des récoltes mondiales seraient détruites par les maladies et les insectes nuisibles. En 2009, ces insectes ont causé à eux-seuls 14% de perte de récolte, en moyenne. La lutte contre ces insectes repose ainsi essentiellement sur l'application d'insecticides synthétiques, dont l'utilisation massive a rapidement conduit à de nombreux effets délétères sur les insectes non cibles mais également sur l'environnement ou la santé humaine. La toxicité aiguë des différentes classes de composés insecticides se produit via leurs actions sur les canaux ioniques. En revanche, la sensibilité des abeilles à ces composés reste encore à déterminer, afin d'envisager l'élaboration de solutions de remplacement des méthodes de protection des cultures. Parmi les principaux objectifs de ce projet de thèse, citons i) la caractérisation des canaux ioniques d'*Apis mellifera* et d'insectes nuisibles (puçeron *Acyrtosiphon pisum*, et varroa *Varroa destructor*) par la technique d'électrophysiologie en double électrode et voltage imposé, ii) l'analyse transcriptomique et protéomique de différents venins d'araignées dans le but de fournir les outils moléculaires permettant de déchiffrer avec précision la pharmacologie et les rôles des principaux sous-types de canaux ioniques dans la neurobiologie des abeilles domestiques, mais aussi d'identifier de nouvelles molécules insecticides sélectives des insectes nuisibles.

Mots clefs : abeille mellifère, insecticides, venins, toxines, caractérisation, électrophysiologie, protéomique, transcriptomique.

Since 2006, a syndrome known as “colony collapse syndrome” (or CCD) has been responsible for an average mortality of 50% (in extreme cases up to 90%) of bee colonies in certain regions of the world. Although of multifactorial origin, the intensive spraying of insecticides shows a major role in the mortality of pollinators. However, in the absence of protection, 30 to 40% of the world's crops would be destroyed by diseases and pest insects. In 2009, these insects have caused by themselves an average loss of 14%. The fight against these insects is therefore essentially based on the application of synthetic insecticides, whose massive use of which has quickly led to numerous deleterious effects on non-target insects but also on the environment or human health. The acute toxicity of the different classes of insecticidal compounds occurs through their actions on the ion channels. However, the sensitivity of bees to these compounds remains to be determined, in order to consider the development of alternatives to crop protection methods. Among the main objectives of this thesis project, were i) the characterization of the ion channels of *Apis mellifera* and pest insects (aphid *Acyrtosiphon pisum*, and varroa *Varroa destructor*) by the technique of two-electrode voltage clamp electrophysiology, ii) transcriptomic and proteomic analysis of different spider venoms in order to provide molecular tools to accurately decipher the pharmacology and roles of the main ion channel subtypes in the neurobiology of honeybees, but also identify new insecticidal molecules selective for pest insects.

Keywords: honey bee, insecticides, venoms, toxins, characterization, electrophysiology, proteomics, transcriptomics.