

Marisabelle Plante  
Gabrielle Lafortune

**Effets physiologiques de venins d'arthropodes**  
**sur les «Daphnia magna»**

Projet de biologie  
Présenté à Louis Charbonneau  
Dans le cadre du cours  
Du projet synthèse 101-EYF-03  
Groupe 102

Cégep de l'Outaouais  
Campus Gabrielle-Roy  
Session hiver 2008

## Table des matières

Résumé du projet.....	p. iii
Résumé du projet (version anglaise).....	p. iv
But.....	p. v
Hypothèse .....	p. v
Théorie : A- Système immunitaire des arthropodes.....	p. v
B- Venins.....	p. vii
C- Différents arthropodes présents au Costa Rica.....	p. viii
D- Daphnie.....	p. ix
Manipulation.....	p. xii
E- Résultats : Araignée <i>Nephila</i> .....	p. xvi
Tarentule.....	p. xvii
Guêpe.....	p. xviii
Fourmi <i>Balla</i> .....	p. xx
F- Discussion : Araignée <i>Nephila</i> .....	p. xxii
Tarentule.....	p. xxiv
Guêpe.....	p. xxv
Fourmi <i>Balla</i> .....	p. xxv
G- Conclusion.....	p. xxvii
H- Annexes.....	p. xxviii
I- Bibliographie.....	p. xxxiv

## Conséquences physiologiques de divers venins d'arthropodes sur des daphnies

### Résumé :

De nos jours, le venin est utilisé dans différentes thérapies: la Bee Venom Therapy<sup>1</sup> est une méthode populaire auprès des personnes atteintes de sclérose en plaques pour diminuer leur perception de la douleur. De plus, le venin de tarentule servirait à la prévention des crises cardiaques<sup>2</sup> et le venin d'abeille serait bientôt utile à des fins anticancérigènes. Finalement, le venin d'abeille aurait une utilité dans le dépistage des allergies et dans la création d'antibiotique contre le SIDA<sup>3</sup>.

Le venin présente différents effets sur les tissus de notre corps, tels que l'augmentation du flux sanguin, la dégradation enzymatique ou tissulaire, la douleur, voir la mort. Notre projet synthèse en biologie consiste à l'étude des effets physiologiques sur la daphnie, «*Daphnia magna*», celles-ci entraînées par divers venins en provenance d'arthropodes. Notre projet a débuté par un travail de terrain au Costa Rica par la récolte d'arthropodes venimeux. Nous avons des étapes préliminaires à effectuer avant de débiter nos expérimentations sur la daphnie. À partir des glandes à venin isolées de la tarentule, de l'araignée *Nephila*, de la guêpe et de la fourmi *Balla*, nous avons procédé à la dilution des venins à différentes concentrations.

L'utilisation de la puce d'eau *Daphnia Magna* permettait l'observation du cœur et des battements cardiaques. L'expérimentation consistait à comparer le rythme cardiaque suite à l'injection de concentrations de venin. La durée de chaque observation était de moins de deux heures. Nous avons pour hypothèse que les venins auraient un effet stimulant, enzymatique et paralysant sur la daphnie. Nos données montrent que le rythme cardiaque a augmenté pour les concentrations de venin de tarentule et de guêpe. Nous avons pu observer des variations dans celui-ci pour le venin d'araignée et de fourmi *Balla* probablement dû à une adaptation de la daphnie suite à l'injection de venin étant altéré suite à différentes manipulations, tel le gel/dégel des glandes à venin et le milieu d'expérimentation plus ou moins stériles. Nous avons pu observer de plus une dégradation enzymatique chez la plupart des venins. Ainsi, les venins avaient effectivement des effets physiologiques importants sur les cellules animales.

---

<sup>1</sup> RAYNAL, Claudette, *Scleroses en plaque et apithérapie*, <http://abeille-alternative.chez-alice.fr/>, 2001.

<sup>2</sup> BOUNIAS, Michel, *Traité de toxicologie générale*, Springer, France, 1999, page 6.

<sup>3</sup> CHIPPAUX, Jean-Philippe, *Venins animaux dans la recherche biologique*, [http://www.cairn.info/resume.php?ID\\_ARTICLE=ETHN\\_043\\_0419](http://www.cairn.info/resume.php?ID_ARTICLE=ETHN_043_0419), 2004.

The venom of insects appears to induce different reactions in our body, usually harmful but surprisingly sometimes beneficial. Chemically, the proteins that make up the venom are responsible for these reactions. Venom entering the body from a puncture in the skin can generate various effects, such as: increased blood flow, enzymatic or tissue degradation, pain and can even result in death. Our research of end of college studies consisted in the study of the physiological reactions of the daphnia to various arthropod venoms. Our project began with a field trip in Costa Rica where we collected a variety of arthropods required for our research. We completed several preliminary steps before beginning our experiments on the daphnia. We first had to isolate the poison glands of the arthropods while following very specific protocol. We then diluted the collected venom at different concentration levels with which we wanted to work. The venom used for our experiment was collected from four different arthropods: the tarantula, the Golden-Orb spider (typical spider in Costa Rica), the Balla ant and the wasp.

We selected the daphnia, a small shellfish, for our study because of its transparent membrane that allows observing the heart and counting heart beats. The experiment consisted in comparing the heart rate at specific times following the injection of different levels of concentration of venom. Our task was to count the heart beats of the daphnia during thirty-second intervals every five minutes. We repeated this test for each concentration level of venom we had produced. Each test took less than two hours to complete. Our research assumption was that venoms would have a stimulating, enzymatic and paralysing affect on the daphnia. It was indeed the case; we observed the heart rate increase significantly for concentration levels of tarantula and wasp venoms. However, we observed variations in the case of the spider's and the Balla ant's venom. These variations could have resulted from the daphnia's adaptation to the injections being altered from the various handling (e.g., freezing/thawing) or because the venom concentration levels were too low. We also found that most venom caused an enzymatic degradation. We concluded that venoms had significant physiological effects on the body.

Venom is used in various treatments: the Bee Venom Therapy is a popular method used in the treatment of multiple sclerosis to reduce the patients' perception of pain. Moreover, the venom of the tarantula could be used to prevent heart attacks and the venom of bees could soon be used for cancer treatment. Finally, bee venom may also be useful in allergy testing and in the development of an antibiotic for the treatment of AIDS.

## **But :**

Déduire les effets sur le système nerveux et sur le rythme cardiaque de la daphnie à la suite d'injections de concentrations (1-2-4-6-8-10-20-30-40  $\mu\text{L}$ ) de venins d'arthropodes. À partir des résultats obtenus, Nous expliquerons les mécanismes biochimiques en expliquant les différents phénomènes observés par l'action des protéines neurotoxiques contenues dans le venin et par leurs différentes propriétés chimiques agissant sur la physiologie de la daphnie.

## **Hypothèse :**

Nous émettons l'hypothèse que les différents venins d'arthropodes provenant des araignées *Golden Orb*, des fourmis *Balla*, des guêpes et des tarentules présentent des effets neurotoxiques, enzymatiques, paralysants et/ou stimulants.

## **Théorie :**

Afin de pouvoir effectuer les meilleures récoltes possibles au Costa Rica, nous avons effectué quelques recherches préliminaires, soit sur le système immunitaire des arthropodes, sur les composantes de leur venin, sur les effets de différents types de venins sur les cellules humaines, etc. Nous avons aussi étudié la physiologie des daphnies afin de mieux comprendre le mode de vie et leur fonctionnement physique. Ainsi, nous pourrions mieux expliquer les résultats lors de nos manipulations en laboratoire.

### **A- Système immunitaire des arthropodes**

#### **Immunité humorale**

Le fluide circulatoire des insectes se nomme hémolymphe et transporte les nutriments, mais également des agents importants dans la réponse immunitaire.

-Le lysozyme est un enzyme présent en faible quantité dans la plupart des insectes ainsi que dans les sécrétions des mammifères. Il augmente radicalement en concentration suite à une stimulation. Cet enzyme hydrolyse le peptidoglycane, en particulier le Gram positif, exposant ainsi la membrane plasmique des bactéries

-Une blessure ou une injection de bactéries induit la production de cécropines dans l'hémolymphe. Plusieurs espèces d'insectes et parasites produisent des cécropines qui varient très peu d'une espèce à l'autre. Ces peptides ont un poids moléculaire d'environ 4000 g/mol et sont efficaces contre un grand nombre de bactéries pathogènes des arthropodes, Gram positif et Gram négatif. Les cécropines lysent la membrane plasmique

des bactéries et diminuent l'absorption de la proline. Ces actions sont dues au pouvoir détergent des peptides et à leur hélice alpha (formation de pores).

-Les attacines forment une seconde catégorie de protéines antimicrobiennes. Plus grosses que les cécropines, elles ont un spectre d'action plus restreint que celles-ci, mais une activité bactéricide accrue. Leur aire d'action se situe principalement sur la couche externe de la membrane bactérienne.

-De nombreuses autres molécules peuvent être présentes dans la réponse immunitaire humorale des arthropodes.

Tableau 1 : Molécules présentes dans la réponse immunitaire des arthropodes :

Molécules de venin	Insectes/Arthropodes	Caractéristiques
Apidaecine	Abeilles	Bactériostatiques
Royalisine	Abeilles/gelée royale	Action comme cécropines
Défensive	Abeilles	Efficaces contre les bactéries Gram +
Diptéricine	Abeilles	Efficaces contre les bactéries Gram –
Hemoline	Arthropodes	Semblables aux anticorps humains IgG, se fixent aux membranes bactériennes
Alpha2-macroglobulines		Inhibition sélective de la dégradation des grosses protéines par des protéases bactérienne
Phenoxidase		Enzyme isolant des bactéries avec de la mélanine (protéine insoluble)
Lectine		Protéine agglutinante

## **Immunité cellulaire**

Dans l'hémolymphe, il y a plusieurs types de cellules, dont les plasmatoctes, les thrombocytes et les oenocytoides.

Plasmatoctes: 80 % des cellules, phagocytes dégradant les débris cellulaires de l'hôte, joue un rôle clé dans la métamorphose

thrombocyte : Grosse cellule séparant son cytoplasme en fragments anucléés qui sont guidés vers le site d'une infection. Ils s'agglutinent autour des intrus et/ou de la blessure et produisent des peptides antimicrobiens.

## B-Venins

### Types ou catégories de venin

Autrefois, nous déterminions les types de venins en fonction de deux types de symptômes; soit l'action sur le système sanguin, soit l'action sur le système nerveux (neurotoxique). Il est difficile de faire une distinction entre les deux, car un venin qui perturbe le système sanguin provoque généralement aussi des troubles au système nerveux et vice versa. Un venin peut être à la fois coagulant et anticoagulant.

Tableau 2 : Principaux agents toxiques des venins :

Agents toxiques	Rôles
neurotoxines	paralysant
hémorragines	causent des hémorragies
nécroses cutanées des <i>cytolysines</i>	détruisent les cellules à l'origine, parfois très importantes, allant jusqu'à l'os
<i>hémolysines</i>	attaquent plus spécifiquement les globules rouges du sang (voir hémolyse), empêchent notamment la phagocytose, expliquant les infections secondaires fréquentes
<i>substances histaminiques</i>	entraînent des réactions vasomotrices responsables du choc observé après morsure par les vipéridés

### Composantes du venin

Les principaux composants du venin sont des enzymes comme les protéases, qui détruisent les tissus ; les hyaluronidases, qui augmentent la perméabilité des tissus et qui permettent au venin de se propager plus rapidement ; les phospholipases, qui attaquent les membranes cellulaires ; et les phosphatases qui dégradent divers composés chimiques.

Le venin est un composé de polypeptides assemblés en des chaînes alpha et bêta. Chaque peptide est responsable d'un caractère du venin. Les caractères du venin les plus incriminés dans la mort par inoculation de venin sont les *neurotoxines*, qui affectent

directement l'exocytose au niveau des neurones et qui engendre une paralysie des muscles et des troubles respiratoires.

D'autres peptides sont responsables de la dénaturation des cellules du pancréas. Ces peptides détruisent les îlots de Langerhans qui, ne pouvant plus sécréter d'insuline ni de sucres digestifs, entraînent des hyperglycémies provoquant des insuffisances rénales, infarctus du myocarde, gangrène, etc.

Tableau 3 : Fonctions des différentes composantes de venins d'arthropodes :

Composantes	Rôles
sérotonine	douleur, vasodilatation
acétylcholine	NT majeur des mammifères, douleur
norépinéphrine	vasoconstriction, ischémie
épinéphrine	inhibiteur du système immunitaire, augmentation du débit sanguin
dopamine	augmentation de la circulation sanguine
piperidine	agent antibiotique et neurotoxique (surtout contre les arthropodes), douleur
phospholipase	hydrolyse des membranes cellulaires, douleur
hyaluronidase	enzyme responsable du facteur de dispersion
lipase	dégradation des lipides
peptide	extrêmement grande variété, effets individuels souvent inconnus
protéine	toxine, enzyme, très grande variété

Note : La plupart des venins contiennent des acides aminés, des ions, des glucides, des tampons biologiques, des acides organiques, etc. Ces substances favorisent ou limitent le fonctionnement de certaines protéines.

## Effets du venin sur l'organisme

Comme il l'est indiqué ci-dessus, les venins d'arthropodes ont plusieurs composantes, et celles-ci ont différents rôles.

Tableau 4 : Principaux effets des venins sur l'organisme :

Effets
Effets neurotoxiques sur le système nerveux, le cerveau et la moelle épinière
Paralysie du système respiratoire
Action coagulante sur le sang
Altération des vaisseaux sanguins provoquant des hémorragies
Action anticoagulante
Destruction des globules rouges
Action sur le cœur, baisse de la tension artérielle
Salivation intense pouvant provoquer un étouffement
Altération des cellules, des tissus et même d'organes (reins, etc.)
Œdèmes (provoquent un étouffement si la morsure est faite sur le visage ou le cou)
Nécroses

## C-Différents arthropodes présents au Costa Rica

Vu le climat tropical humide du Costa Rica, nous avons quelques idées des arthropodes venimeux que nous y retrouverons. Par contre, tout dépendant du climat et de la température lors du travail de terrain, il nous est impossible de prévoir exactement les insectes qui seront récoltés. Toutefois, nous avons effectué quelques recherches préliminaires concernant les arthropodes susceptibles d'être présents au Costa Rica. Ainsi, voici les différentes composantes des venins de quelques arthropodes. Grâce à ces spécifications, il nous sera plus facile de prévoir les risques de blessures, car nous aurons déjà une idée des effets que leur venin aura sur nous

Tableau 5 : Arthropodes présents au Costa Rica :

Classes	Espèces	Protéines
Hyménoptères	Guêpes	phospholipases, hyaluronidases, cholinestérases, peptides, kinines, histamine, sérotonine, acétylcholine, protéines allergènes
	Abeilles	phospholipases, hyaluronidases, melittine, peptide 401 (dégranulation d'histamine), histamine, dopamine, norépinéphrine, protéines allergènes
	Fourmis	piperidines, protéines allergènes
Hémiptères	Réduves	peptides antimicrobiens, protéases, hyaluronidases, phospholipases
Arachnides	Araignées	polyamines (neurotoxiques pour insectes), neurotoxines peptidiques à "noeud cystéine", neurotoxines protéiques (ex. : alpha-latrotoxine), sphingomyélinase (dégradation membranaire), hyaluronidase
	Scorpions	peptides toxiques et antimicrobiens, sérotonine, prostaglandines, leukotriènes, phospholipases, phosphatase acide, protéases, ribonucléases, cholinestérase

## D-Daphnies

Afin de déduire les effets des injections de différentes concentrations de venin d'arthropodes sur le système nerveux et sur le rythme cardiaque, nous avons décidé de faire nos manipulations sur les daphnies. Les daphnies sont des petits crustacés phyllopoètes cladocères d'environ 1 à 5mm. Leur nom populaire de « puce d'eau » donne une bonne idée de leur taille, de leur forme et de leur façon d'évoluer dans l'eau.

Tableau 6: classification de la daphnie

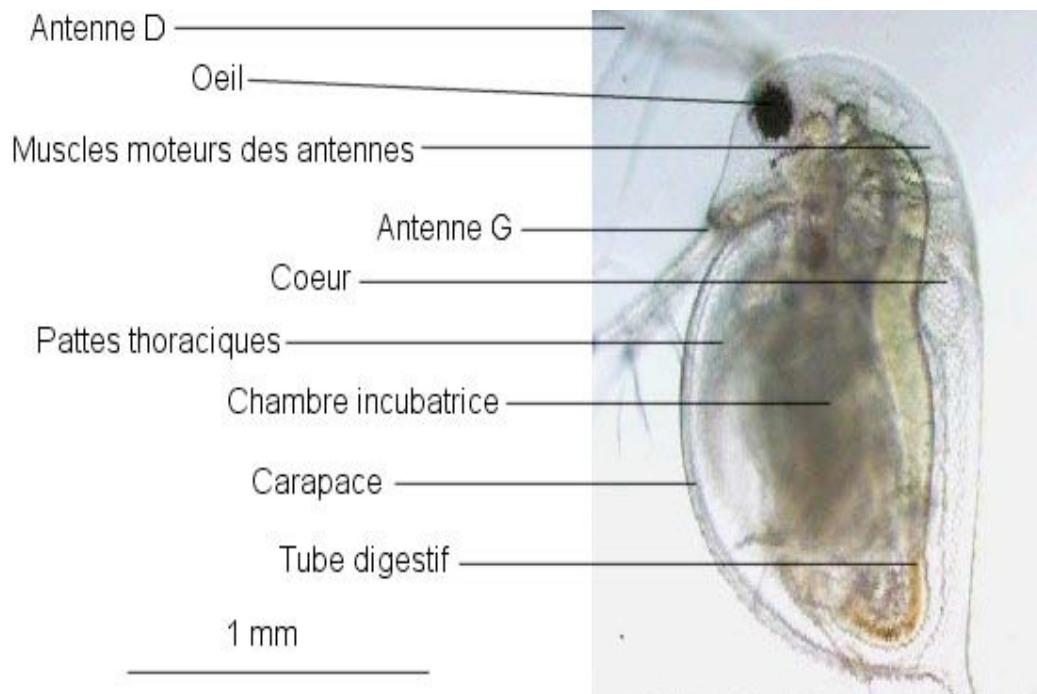
Daphnie	
<b>Classe</b>	Crustacés
<b>Ordre</b>	Cladocères
<b>Famille</b>	Daphniidés
<b>Genre</b>	Daphnia
<b>Espèce</b>	Pulex
<b>Nom commun</b>	Daphnia magna

Elles possèdent un corps trapu protégé par une carapace transparente ; de grandes antennes plumeuses utilisées en guise de nageoire ; un seul œil en guise de deux yeux réunis ; cinq minuscules paires de pattes reliées au thorax.

Les daphnies se nourrissent d'algues vertes, ainsi, lorsque nous les commanderons, il faudra les nourrir périodiquement d'algues vertes. Ainsi, leurs conditions de vie seront favorables et elles seront aptes à se reproduire rapidement par reproduction asexuée, soit par la parthénogenèse.

En toxicologie de l'environnement, les daphnies sont couramment utilisées pour l'étude de la qualité des eaux. Elles s'avéreront très utiles dans nos manipulations, car vu leur carapace transparente, il sera plus aisé de calculer leurs battements cardiaques.

Figure 1 : Physiologie de la daphnie



## **Méthode utilisée avec les daphnies :**

Pour mesurer le rythme cardiaque de la *Daphnia magna*, nous transférons une daphnie par puits dans une plaquette à Elisa. Nous avons tout d'abord déterminé une quantité de saline à mettre dans chaque puits. Ainsi, après quelques essais, nous en avons conclu qu'une quantité minimale de 50 µl d'eau saline dans chaque puits serait bénéfique. En effet, en ne mettant qu'une petite quantité de saline dans les puits, les daphnies bougeraient moins et seraient plus facilement observables. Nous avons donc pris une micropipette de 50 µl et nous avons coupé le bout stérile.<sup>4</sup>

Malgré le volume minime de saline dans les puits, les daphnies avaient encore trop de mobilité. Nous avons alors ajouté une certaine quantité de gelée de pétrole afin de réduire leur mobilité.<sup>5</sup>

## **Matériel :**

- Saline physiologique 0.85% NaCl
- Éthanol 70% (250mL)
- Plaque à Elisa à 48 puits
- Micropipettes p200, p20. p2 avec embouts stériles
- Microtubes eppendorf de 1,5 mL avec support (min 50)
- Pincés courbées
- Incubateur 37°C
- Microscope inversé avec caméra
- Pipettes pasteur stériles
- Ciseaux stériles
- pH-mètre
- Acide citrique
- Vortex
- Venins (guêpe, tarentule, araignée *Nephila*, fourmis Balla)
- Solution tampon pH 4

## **Manipulations**

### **Partie A : Extraction des glandes à venins et méthode de préservation**

#### **Matériel :**

- microscope à dissection binoculaire
- scalpel
- pincés à dissection
- éthanol 70%
- plats de pétris stériles
- tubes hermétiques stériles de 5, 15 et 50mL
- micropipette et embouts stériles
- flacon laveur

---

<sup>4</sup> Voir annexe 1

<sup>5</sup> Voir annexe 2

**Manipulations :**

- 1- Désinfecter les pinces, le scalpel et les spécimens morts en les lavant à l'éthanol 70%
- 2- Isoler l'abdomen des guêpes et fourmis en coupant entre le thorax et l'abdomen
- 3- Isoler les glandes à venin en tirant délicatement sur le dard au bout de l'abdomen
- 4- Aspirer le venin avec la micropipette s'il y a rupture de la vésicule à venin
- 5- Déposer les glandes à venin (ou l'embout contenant le venin) dans des tubes stériles<sup>6</sup>
- 6- Isoler les glandes à venin d'araignées en tirant délicatement sur les chélicères<sup>7</sup>
- 7- Déposer les chélicères et les vésicules à venin dans un tube stérile

**Note :** Ces manipulations ont eu lieu à la station de recherche de l'ANAÏ.

**Partie B : Dilution**

1-Vortexer les solutions de venins après décongélation.

2-Préparer les solutions diluées de la façon suivante :

Dans un microtube, pipetez 180 µL de saline physiologique (0.85% NaCl)

Injecter le venin contenu dans la seringue hypodermique dans la solution saline pour un volume total de 200 µL (dilution 1:10)

Ex. : *Tube 3, dilution 1 : 2*

- Pipeter 50µL de la solution mère du venin #1 (guêpe) et mélanger à 50 µL de saline physiologique dans un microtube *ependorf* de 1,5 mL.

Effectuer les dilutions de cette solution mère dans des microtubes selon le tableau suivant :

Tableau 7 : Volumes de solutions diluées

Tube	Dilution	Volume solution mère	Volume saline	Volume total
		(µL)	(µL)	(µL)
1	À blanc	0	100,000	100
2	Pure	100,00	0	100
3	1:2	50,000	50,0000	100
4	1:4	25,000	75,0000	100
5	1:8	12,500	87,5000	100
6	1:16	6,2500	93,7500	100
7	1:16	3,1250	96,8750	100
8	1:32	1,5625	98,4375	100

3-Répéter les manipulations précédentes pour les autres types de venin (#2 (tarentule) et #3 (araignée *Nephila*) et #4 (fourmis *Balla*)).

<sup>6</sup> Voir annexe 3

<sup>7</sup> Voir annexe 4

## Partie C : Manipulations sur les daphnies

- 1- Prendre 4 pipettes
  - 2- Couper l'embout d'une des pipettes comme illustré ci-dessous :
  - 3- Placer cette pipette dans le contenant où se trouve la daphnie et placer une seconde pipette dans l'eau distillée et une troisième dans la solution mère.
- N.B. Pour éviter toute contamination, n'utilisez qu'une seule pipette par solution.
- 4-Suivre les indications du tableau des volumes de solutions diluées afin de déterminer la quantité d'eau distillée et/ou de solution mère à ajouter à chaque puits de la plaque à Elisa.
  - 5-Utiliser la pipette coupée précédemment pour collecter 6 daphnies. Si les daphnies sont trop grosses, couper à nouveau la pipette.
  - 6- Enlever tous les excès d'eau dans la pipette en tenant l'ouverture contre l'intérieur du récipient de daphnies. Ne laisser de l'espace que pour laisser échapper l'eau en pressant légèrement la pipette.
  - 7-Placer 1 daphnie dans un puits.
- N.B. N'effectuer les observations que sur un seul puits à la fois pour éviter la confusion.
- 8-Pour l'observation des daphnies, placer le puits à observer sous le binoculaire et utiliser l'objectif 4X. S'assurer que l'intensité lumineuse du binoculaire ne surchauffe pas trop la daphnie pour éviter de la traumatiser ou de la tuer.
  - 9- Avec votre partenaire, déterminez la fréquence cardiaque d'une daphnie en comptant le nombre de battements cardiaques pendant trente secondes avant l'injection du venin.
  - 10- Répéter l'étape précédente deux fois.
  - 10-Noter les résultats dans un premier tableau.
  - 11- Injecter avec la micropipette la quantité de venin du tube 1 dans le puits.
  - 12- Pour les trente premières secondes suivant l'injection du venin, prendre la fréquence cardiaque. Répéter la manipulation trois fois.
  - 13- Pour évaluer les changements physiologiques de la daphnie qui pourraient être possible suite à l'action de différents enzymes, observer après deux, quatre et six minutes la condition de ceux-ci. Noter les résultats.
  - 14-Répéter ces manipulations pour les sept autres tubes de concentrations différentes et noter les résultats. Ces résultats permettront de calculer le pourcentage de daphnies mortes suite à l'exposition au venin.
  - 15-Répéter les manipulations 1 à 14 pour les trois autres types de venin.

Tableau 8 : Fréquence cardiaque moyenne des daphnies avant l'expérience :

# de battements en 30 secondes	Moyenne	Fréquence cardiaque (= moyenne x 2)
#1		
#2		
#3		

Tableau 9 : Fréquence cardiaque et activité des daphnies sous l'effet de venins :

Venins	# de battements en 30 secondes	Fréquence cardiaque (= moyenne x2)	Observations		
			Après 2 min.	Après 4 min.	Après 6 min.
Tube 1	#1				
	#2				
	#3				
Tube 2	#1				
	#2				
	#3				
Tube 3	#1				
	#2				
	#3				
Tube 4	#1				
	#2				
	#3				
Tube 5	#1				
	#2				
	#3				
Tube 6	#1				
	#2				
	#3				
Tube 7	#1				
	#2				
	#3				
Tube 8	#1				
	#2				
	#3				

N.B. Reproduire les tableaux précédents pour les trois autres types de venin.

## E - Résultats

Tableau 10 : Fréquence moyenne des daphnies avant l'expérience :

# de battements en 30 secondes	Moyenne	Fréquence cardiaque (= moyenne x2)
#1 125	123 batt. /30s	246 batt. /30s
#2 118		
#3 125		

### Araignée *NEPHILA* (Golden Orb-spider) (venin 1-2-4-10 µL)

Tableau 11 : Fréquence cardiaque des daphnies :

Blanc 1	(1 µL) 2	(2 µL) 3	(4µL) 4	(10 µL) 5	(16 µL) 6
125 batt. /30s 250 batt. /min	Ralentissement (peu)	100 batt. /30s 200 batt. /min	110 batt. /30s 220 batt. /min	55 batt. /30s 110 batt. /min	*Vérification de la toxicité du venin

#### Observations :

1 µL : après une durée de 30 minutes, battement cardiaque : 32 batt. /30s  
64 batt. /min

10 µL : Après 30 secondes, la daphnie a été complètement dégradée, les antennes se sont décrochées du restant du corps.

\*16 µL : Si les daphnies survivent à 16 µL de venin dans 50 mL de saline, le venin n'est pas toxique.

Après 7 minutes, elles bougeaient beaucoup moins vite malgré tout leurs efforts. On voit très bien que leur enzyme est en train de se faire digérer car il y a plusieurs résidus dans le puits. Les cils de la daphnie sont en train de se désintégrer.

Le venin sous conditions testées n'est pas létal. Par contre, on note une dégradation enzymatique. La proie est digérée et liquéfiée.

Suppositions : Ainsi, ce la expliquerait pourquoi, malgré que les livres indiquent que le venin des Golden Orb-spiders contient des peptides neurotoxiques, lors de notre

laboratoire les daphnies ne seraient pas mortes rapidement. Elles ne sont que dégradées par les enzymes de dégradation.

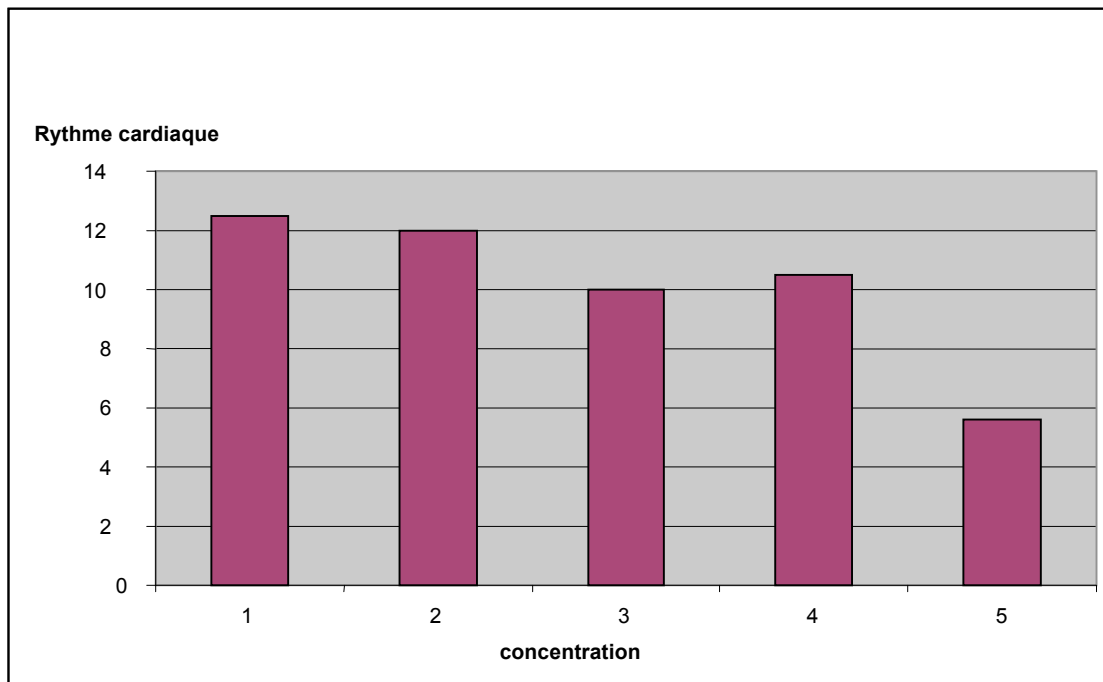
Ainsi, après environ 30 minutes, les daphnies ont été dégradées.

- La digestion ne se fait pas instantanément. C'est ce qui retarde les activités enzymatiques.

Après environ 1h30, les daphnies ont été complètement dégradées. Il ne reste plus que la chitine\* (25%), soit la peau des insectes.

\* polymère de sucre, les protéases ne les digèrent pas. Il faudrait des enzymes très spécifiques pour les dégrader.

Figure 2 : Graphique du rythme cardiaque de la daphnie en fonction des concentrations de venins de l'araignée *Nephila*



### **Tarentule (venin 1-2-4-8-16 µL)**

(mis avec 1 minute d'intervalle)

Observations :

\* En moins de 10 minutes, elles ont toutes commencé à se désintégrer. Nous pouvons remarquer que les enzymes digestives de venin de tarentule sont plus actives que celles du venin de l'araignée *Nephila*, engendrant des effets quasi-immédiats.

1  $\mu\text{L}$  : Après 18 minutes, le battement cardiaque est beaucoup plus rapide.

4  $\mu\text{L}$  : Après 25 minutes, sa carapace de chitine s'est ouverte.

8  $\mu\text{L}$  : Après 30 minutes, son intérieur est en train de se désintégrer (intestin, etc.)

Après 40 minutes, le battement cardiaque de la daphnie est de 312 battements/ minute (a augmenté).

16  $\mu\text{L}$  : la daphnie ne bouge presque plus et le battement cardiaque après 35 minutes est de 280 battements/ minute.

### **Guêpe - venin ( 20-30-40 $\mu\text{L}$ )**

Tableau 12 : Effets des injections de venin 20-30-40  $\mu\text{L}$

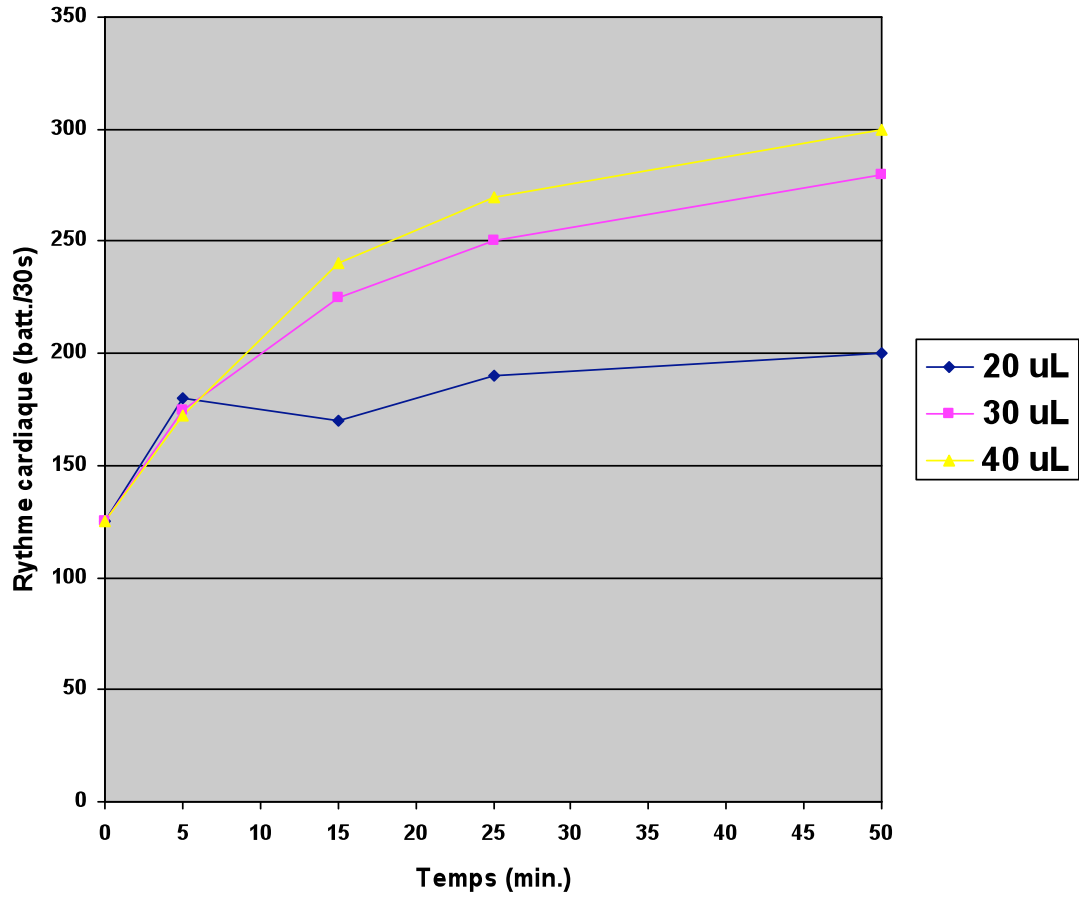
\* Vaseline déposée sur le rebord de chaque puits

\*\* (écart de 2 minutes entre chaque puits)

<b>Concentrations (pH 4)</b>	<b>20 <math>\mu\text{L}</math> (battements/30 secondes)</b>	<b>30 <math>\mu\text{L}</math> (battements/30 secondes)</b>	<b>40 <math>\mu\text{L}</math> (battements/30 secondes)</b>
<b>Temps</b>			
<b>À t = 0</b>	125	125	125
<b>À t = 5 minutes</b>	(soit t = 5 min) 180	(soit t = 7 min) 175	(soit t = 9 min) 172
<b>À t = 15 minutes</b>	(soit t =15 min) 170	(soit t = 17 min) 225	(soit t = 19 min) 240
<b>À t = 25 minutes</b>	(soit t = 25 min) 190	(soit t = 27 min) 250	(soit t = 29 min) 270
<b>À t = 50 minutes</b>	(soit t = 50 min) 200	(soit t = 52 min) 280	(soit t = 54 min) 300

Figure 3 :

**Graphique du rythme cardiaque de la daphnie**  
**suite à l'injection de venin de Vespa de**  
**concentration 20-30-40 uL**



## **Fourmis Balla - venin ( 20-30-40 $\mu$ L)**

Tableau 13 : Effets des injections de venin 20-30-40  $\mu$ L

\* Vaseline déposée sur le rebord de chaque puits

\*\* (écart de 2 minutes entre chaque puits)

<b>Temps</b>	<b>20 <math>\mu</math>L (battements/30 secondes)</b>	<b>30 <math>\mu</math>L (battements/30 secondes)</b>	<b>40 <math>\mu</math>L (battements/30 secondes)</b>
<b>À t = 0 (pH 4)</b>	150	150	150
<b>À t = 5 minutes</b>	(soit t = 5 min) 160	(soit t = 7 min) 170	(soit t = 9 min) 190
<b>À t = 15 minutes</b>	(soit t = 15 min) 130	(soit t = 17 min) 170	(soit t = 19 min) 250
<b>À t = 25 minutes</b>	(soit t = 25 min) 150	(soit t = 27 min) 145	(soit t = 29 min) 300
<b>À t = 35 minutes</b>	(soit t = 35 min) 167	(soit t = 37 min) 155	(soit t = 39 min) 300
<b>À t = 50 minutes</b>	(soit t = 50 min) 190	(soit t = 52 min) 160	(soit t = 54 min) 350

\* Après 2 heures, le battement cardiaque est de 160 battements/ 30 secondes.

### Observations :

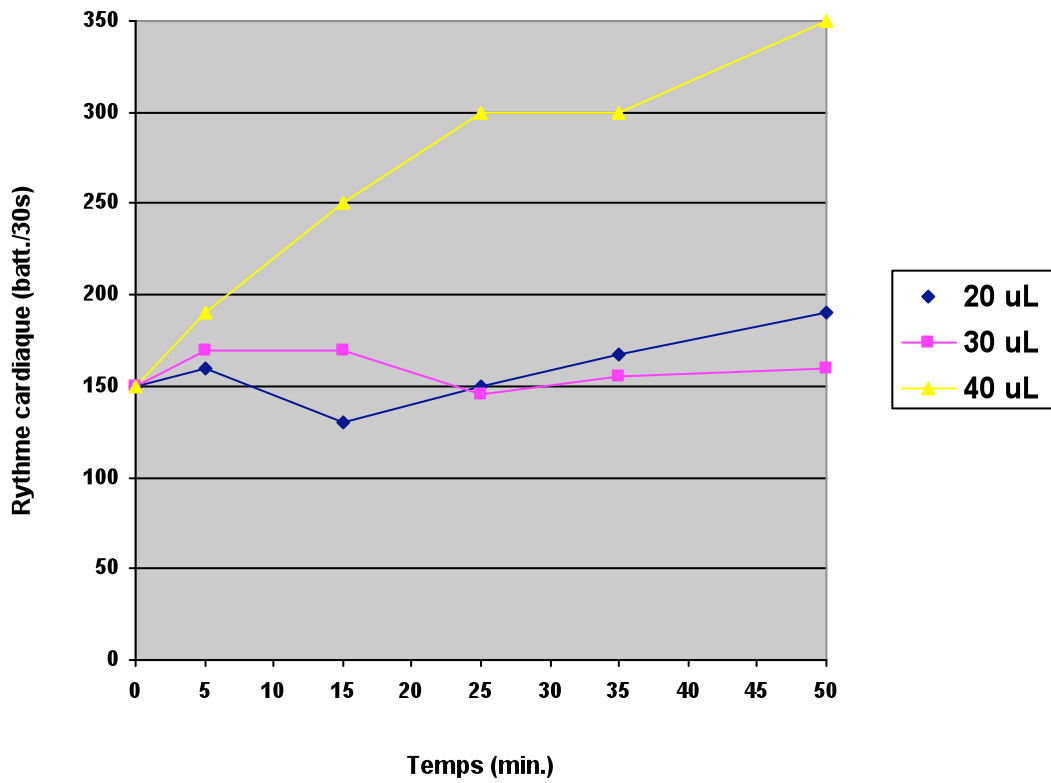
Il n'y a pas de digestion des daphnies avec le venin des fourmis Balla.

Nous supposons que le gel/dégel du venin a entraîné le phénomène suivant : les protéases auraient digéré les peptides neurotoxiques.

Ainsi, ce n'est qu'après une dizaine de minutes que nous avons pu commencer à observer une dégradation des tissus.

Figure 4 :

**Graphique du rythme cardiaque de la daphnie suite à l'injection de venin de fourmis Balla de concentration 20-30-40 uL**



## **F - Discussion**

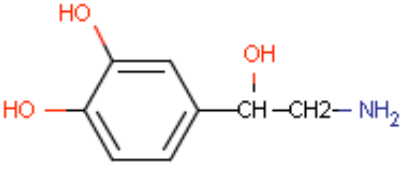
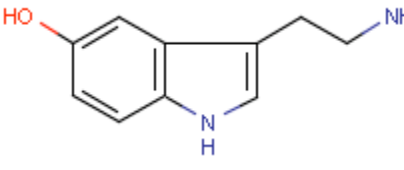
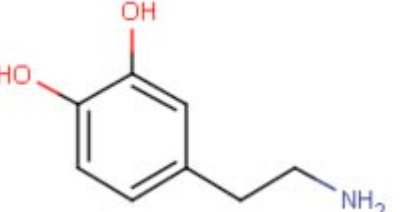
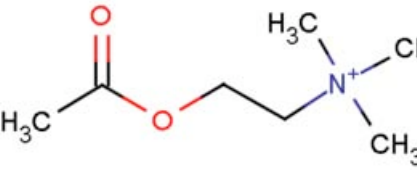
### ***Araignée *Nephila****

Comme nous l'avons indiqué dans la section théorie ci-dessus, les principales composantes des venins d'araignées sont les suivantes :

- polyamines --- inhibent la fonction des canaux ioniques
- neurotoxines peptidiques --- rôle d'immobilisation
- neurotoxines protéiques --- rôle d'immobilisation
- sphingomyélinase --- déficiences au niveau de l'activité enzymatique
- hyaluronidase --- enzyme responsable du facteur de dispersion

Ainsi, le venin d'araignées altère la transmission synaptique au niveau-cérébral ou neuromusculaire. En effet, il atteint les neurones et intervient dans plusieurs mécanismes, tel que :

- Blocage de la libération d'Ach au niveau de la JNM
- Libération massive d'Ach au niveau de la JNM (crampes)
- Diminution de la noradrénaline et de la sérotonine
- Diminution de la noradrénaline et de la dopamine
- Augmentation de la noradrénaline et de la sérotonine
- Diminution de la noradrénaline et de l'acétylcholine
- Diminution de la noradrénaline, de la sérotonine et de la dopamine

Nom	Rôle	Molécule chimique
<b>Noradrénaline</b>	Composé organique (neuromédiateur) qui joue le rôle d'hormone adrénergique et de neurotransmetteur. Il est principalement libérée par les fibres nerveuses du système nerveux orthosympathique et agit comme neurotransmetteur au niveau des organes effecteurs.	
<b>Sérotonine</b>	Molécule issue du tryptophane, un acide aminé. Elle a d'abord été identifiée comme étant le facteur libéré par les plaquettes sanguines entraînant une contraction des vaisseaux sanguins, mais elle est aussi un des principaux neuro-modulateurs du système nerveux central.	
<b>Dopamine</b>	Neurotransmetteur appartenant aux catécholamines et donc issue de l'acide aminé tyrosine. Joue le rôle d'analeptique circulatoire, stimulant des fonctions assurant la circulation sanguine.	
<b>Acétylcholine</b>	Joue un rôle important aussi bien dans le système nerveux central où il est impliqué dans la mémoire et l'apprentissage, que dans le système nerveux périphérique.	

Lors de nos manipulations du venin d'araignée *Nephila*, nous avons observé une légère diminution du rythme cardiaque, soit près de  $\frac{1}{4}$ . Nous avons aussi observé une dégradation considérable du tissu des daphnies. Par nos observations, nous avons pu déduire que les enzymes des daphnies étaient sans doute en train de se faire digérer par le venin.

Lors de nos recherches dans des livres et sur des sites internet, nous prédisions que les daphnies seraient mortes en quelques minutes, suite à la concentration en peptides neurotoxiques du venin d'araignée *Nephila*. Toutefois, puisque nous avons collecté le venin de ces araignées au Costa Rica, et que nous avons dû les extraire dans des conditions plus ou moins stériles, le venin a pu être contaminé. De plus, malgré le fait que nous avons immédiatement congelé les glandes à venin une fois isolées, et que nous les avons aussi gardées au noir, les glandes à venins ont subi plusieurs manipulations (gèle/dégèle) lors du transport en avion, ainsi que lors des expériences en laboratoire. Ainsi, nous croyons que les enzymes digestives auraient digéré les enzymes neurotoxiques, ou tout simplement que celles-ci auraient perdu leurs propriétés neurotoxiques.

Ainsi, cela expliquerait pourquoi nos daphnies ne sont pas mortes en quelques minutes, mais plutôt suite à une dégradation complète des tissus. En effet, sous les conditions testées, le venin des araignées *Nephila* n'était pas létal. En effet, les enzymes neurotoxiques n'étant plus actives, les daphnies ont survécu plus longtemps, car la digestion n'est pas un mécanisme instantané. Les daphnies ont donc tranquillement été dégradées et digérées. Leurs antennes se sont détachées de leur corps et leur carapace s'est ouverte. Nous pouvions observer de petits débris dans les puits où se trouvaient les daphnies, et nous avons aussi remarqué que malgré un grand effort, celles-ci n'arrivaient plus à se déplacer.

Finalement, après une heure et demie d'observation, il ne restait plus que la chitine des daphnies dans les puits. En effet, cette chitine étant composée de polymères de sucres, les protéases digestives du venin ne la digèrent pas.

## **Tarentule**

Lors de nos expérimentations avec le venin de la tarentule, nous avons rapidement observé une dégradation des tissus de la daphnie. En effet, en moins d'une dizaine de minutes, nous avons pu observer son rythme cardiaque grandement augmenté. Nous croyons aussi que les enzymes digestives présentes dans le venin de la tarentule étaient en train de digérer la daphnie.

Comme il est indiqué plus haut, le venin des araignées est constitué de différentes composantes, telles que des protéines et des enzymes digestives. Celles-ci sont aussi présentes dans le venin des tarentules. Ainsi, cela expliquerait pourquoi lorsque nous avons mis les daphnies en présence d'infime quantité de venin, nous avons pu observer un désagrégement de leur chitine. De plus, leur rythme cardiaque a légèrement augmenté. Avant de débiter l'expérience, nous pensions que le rythme des battements cardiaques des daphnies aurait augmenté de façon considérable, mais tout comme pour le venin des araignées *Nephila*, nous croyons que les protéases présentes dans le venin auraient digéré les peptides neurotoxiques lors du gel et dégelé des glandes à venin.

## **Guêpe**

Les résultats que nous avons obtenus lors de l'expérimentation avec le venin d'abeille démontrent une augmentation considérable du battement cardiaque et ce, pour chaque différente concentration de venin. Nous avons pu observer durant les 5 premières minutes de l'expérience, une augmentation approximativement semblable du rythme pour les trois différentes concentrations. Ce phénomène pourrait toutefois s'expliquer par un stress subit vécu par la daphnie lors de l'injection du poison. Nous avons déduit que le taux de concentration de venin injectée influençait l'intensité du rythme cardiaque de la daphnie à différentes intensités. En effet, avec une concentration de 20  $\mu\text{L}$ , le battement était de 200 battements par 30 secondes après 50 minutes et augmentait d'environ 10 à 20 battements aux 10 minutes. Nous avons observé que, pour les concentrations plus élevées de venin, le battement cardiaque augmentait de plus en plus rapidement à chaque intervalle de 10 minutes. Il en résultait donc un battement cardiaque plus haut pour le même laps de temps final, soit 50 minutes. Avec une concentration de 30  $\mu\text{L}$ , la daphnie augmentait son rythme cardiaque jusqu'à 280 battements par 30 secondes et d'environ 30 battements aux 10 minutes. Le même phénomène se produit avec une concentration de venin de 10  $\mu\text{L}$  plus élevée. Après 50 minutes, le rythme est de 300 battements par 30 secondes et celui-ci augmente d'environ 50 battements aux 10 minutes. Ces résultats laissent entendre clairement que le venin d'abeille agit directement sur le système circulatoire. En nous basant sur nos recherches préliminaires à l'expérience, nous pouvons expliquer ces phénomènes par la présence des protéines dans le venin. Les quatre principales étant l'hyaluronidase, la phospholipase, la mélitine et l'apamine. Cette augmentation évidente du rythme cardiaque observée chez la daphnie peut être expliquée par la présence de la mélitine et de l'apamine. Ce sont ces protéines qui facilitent la circulation du sang, régulent la pression, assouplissent les capillaires, augmentent la fluidité du sang et la production des globules rouges. Cette vasodilatation n'est peut-être pas le seul phénomène responsable de l'augmentation du rythme cardiaque.

## **Fourmis *Balla***

Les expérimentations effectuées avec les concentrations de venin de fourmis *Balla* laissent sous-entendre à plusieurs interprétations. Les concentrations de 20 et 30  $\mu\text{L}$  présentent des résultats auxquels nous ne nous attendions pas. Le rythme cardiaque n'augmente pas de façon constante. Il présente des intervalles où le battement est élevé, plus tard faible, pour ensuite redevenir élevé, et ainsi de suite. Durant la quinzième minute suite à l'injection du venin, la daphnie abaisse son rythme cardiaque à 130 battements par 30 secondes pour la concentration de 20  $\mu\text{L}$ . Pour ce qui en est du venin de concentration de 30  $\mu\text{L}$ , le battement est situé autour de 145 battements par 30 secondes, 25 minutes après l'injection. À la suite de ces ralentissements, le même phénomène se produit, le rythme cardiaque recommence à augmenter.

Toutefois, la situation n'est pas similaire pour le venin de concentration 40  $\mu$ L. Le battement cardiaque augmente de façon continue pour se rendre à un maximum impressionnant de 350 battements par 30 secondes après 50 minutes.

Les résultats obtenus pourraient en premier lieu nous laisser croire à des erreurs de manipulations, probablement lors des diverses procédures d'isolation du venin. Les neurotoxines protéiques ont probablement été détruites ou digérées par diverses protéases lors du gel ou du dégel des concentrations de venin. Les principaux peptides neurotoxiques du venin de fourmis Balla sont la poneratoxine (bloque la transmission des influx nerveux) et l'acide formique (acide faible qui serait responsable des destructions cellulaires observées au niveau de la fixation tissulaire). Le venin n'agirait pas de façon efficace sur la daphnie, car il y aurait eu modification de ses propriétés enzymatiques. Par contre, la concentration à 40  $\mu$ L est d'une efficacité indéniable sur la daphnie. Les manipulations s'étant fait de la même manière que pour les différentes concentrations, il est possible d'expliquer ce phénomène par une autre explication.

Nous pouvons supposer que les concentrations de 20 et 30  $\mu$ L n'étaient pas suffisamment puissantes sur la daphnie. La hausse du rythme cardiaque durant les cinq premières minutes seraient dues à un effet nerveux de la daphnie suite à une modification de son milieu. Toute espèce a tendance physiologiquement à modifier ses activités ou son état afin de s'ajuster à un milieu nouveau. La daphnie aurait donc tenté de diminuer son rythme cardiaque suite à une hausse considérable de venin et en un bref délai de temps. Le venin aurait quand même agit sur celle-ci, car le battement augmente dans les dernières minutes de l'expérience. Les résultats obtenus pour la concentration de 40  $\mu$ L laissent croire que le soluté était amplement puissant sur la daphnie.

Lors de nos recherches préliminaires, nous avons découvert que dépendamment de où l'on est piqué, le temps des douleurs ressenties peut varier. La douleur peut persister jusqu'à 8 heures ou plus et diminue avec le temps. Fait intéressant, la douleur est souvent accompagnée de spasmes. Ainsi, ces modifications subites du rythme cardiaque pourraient être perçues comme des spasmes subits par la daphnie. Cette situation ne s'appliquerait pas cependant à la concentration de 40  $\mu$ L, celle-ci étant trop forte sur la daphnie.

## **G - Conclusion**

En conclusion, lors de notre projet, nous devions d'abord faire des recherches scientifiques concernant les venins et les arthropodes pour ensuite, aller collecter différents arthropodes au Costa Rica. Nous avons isolé les glandes à venin avec lesquelles nous avons pu observer les conséquences physiologiques de différentes concentrations de venins d'arthropodes sur des daphnies. Notre expérience a été concluante, car nous avons pu observer divers résultats, tels une augmentation du rythme cardiaque et une dégradation des tissus de la daphnie pour quatre venins provenant d'espèces différentes. Le développement des sciences et les recherches en toxicologie ont permis de trouver de nouvelles utilisations au venin de différents arthropodes. En effet, lors de nos manipulations, nous avons conclu que le venin avait des conséquences physiques sur les cellules animales. Nous avons démontré tout d'abord les effets négatifs et mortels des venins agissant sur les daphnies, mais grâce à des recherches plus approfondies en toxicologie, nous avons appris que l'utilisation de venins pouvait s'avérer bénéfique chez les humains. Il est intéressant de savoir que le venin d'une certaine tarentule pourrait prévenir les malaises cardiaques, tel que l'arythmie. Le venin d'abeilles est aussi étudié et utilisé lors d'une thérapie nommée Bee Venom Therapy pour les personnes atteintes de sclérose en plaques. L'étude des venins est une science très poussée et pas toujours simple, il est donc intéressant de voir tout ce qui a déjà été découvert jusqu'à aujourd'hui.

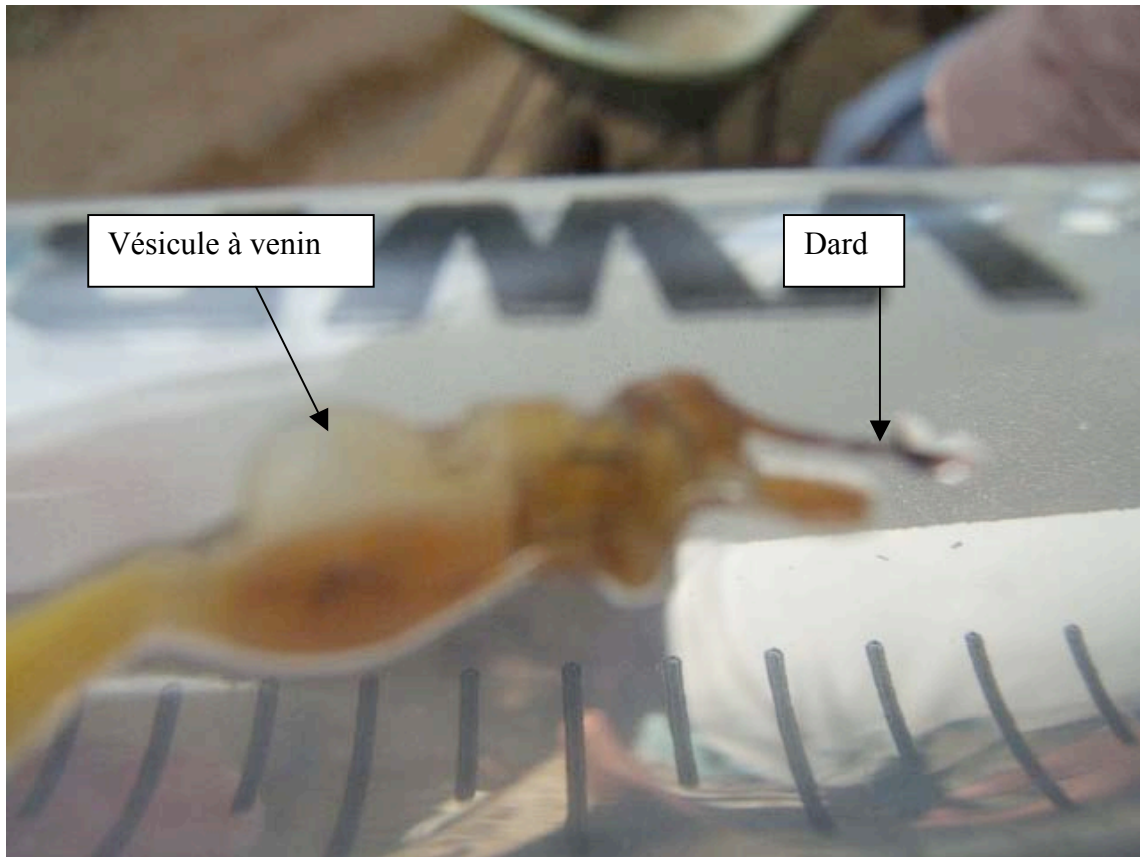
**Annexe 1**



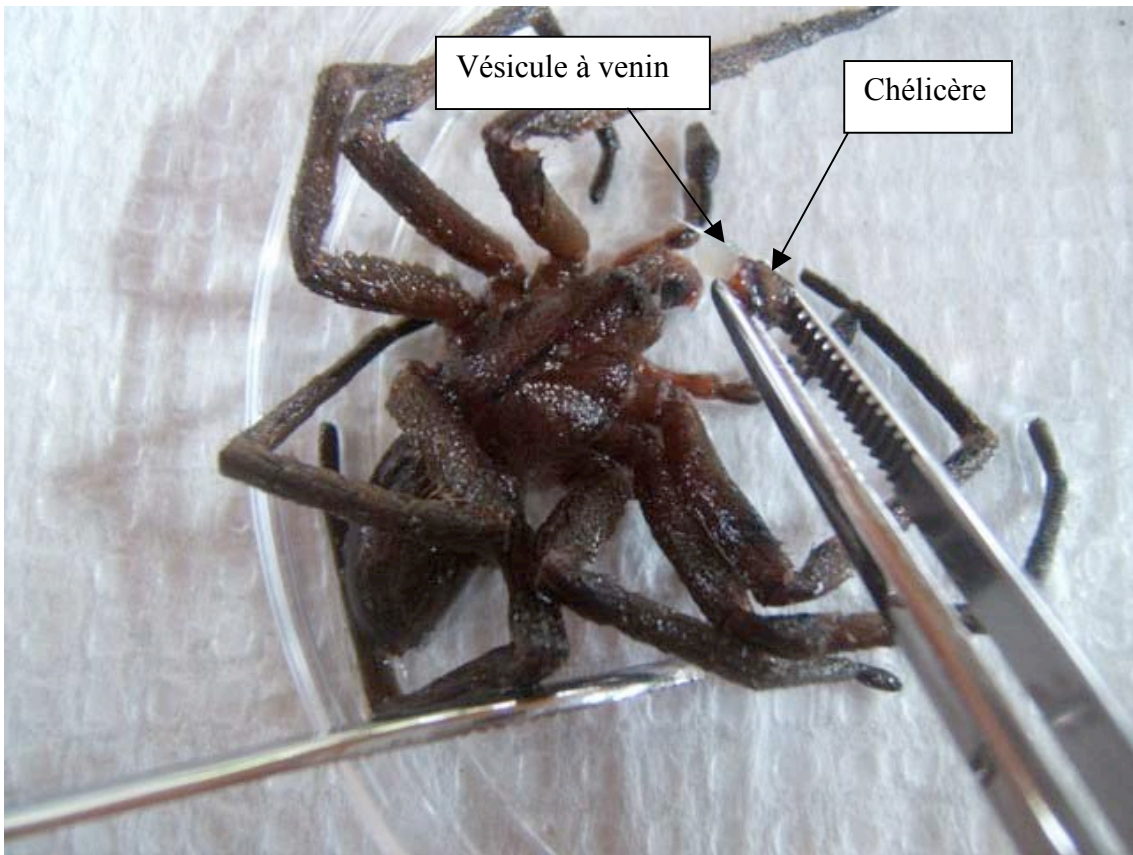
## Annexe 2



### Annexe 3



## Annexe 4

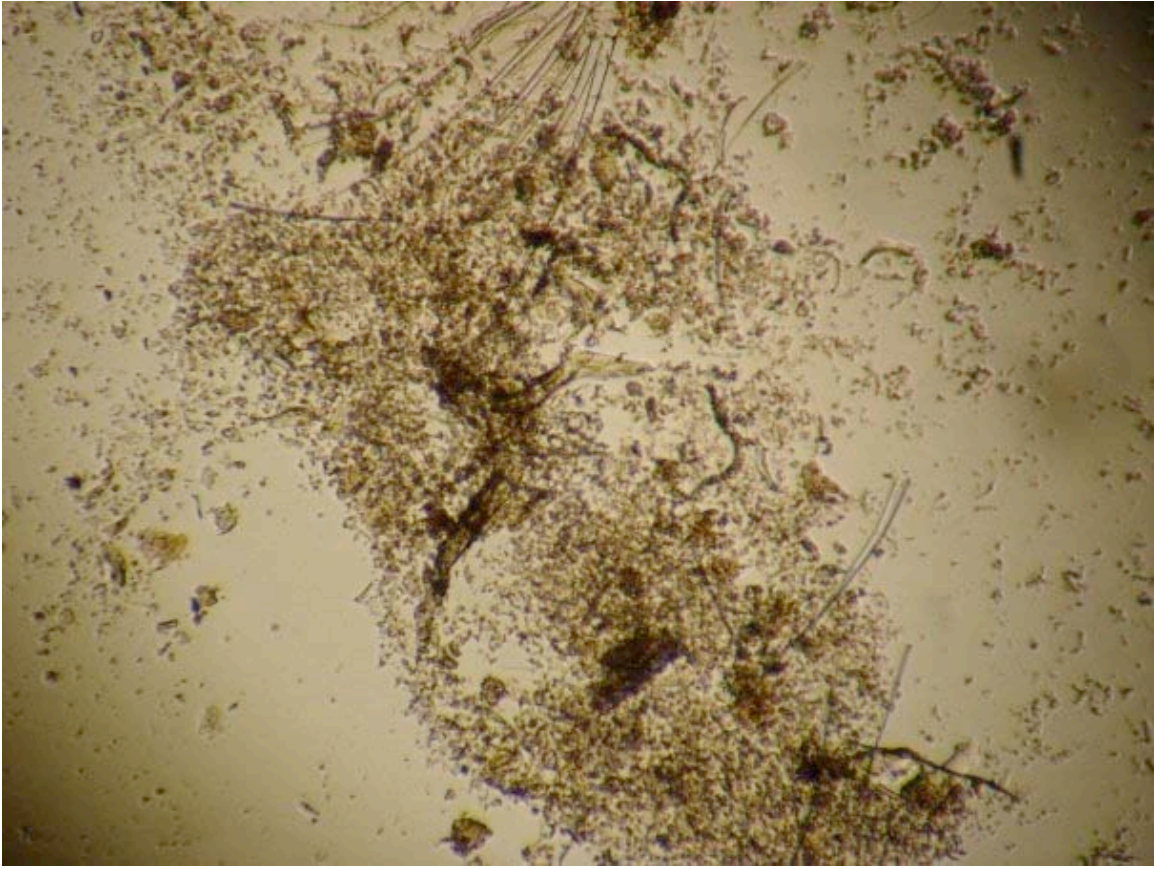


Annexe 5



## Annexe 6

Dégradation enzymatique de la daphnie :



## **Bibliographie**

### Ouvrages de référence :

FABRE, René, *La toxicologie*, «Que sais-je?», Le point des connaissances actuelles, no 61, Presses universitaires de France, 1964, 314 pages.

BOUNIAS, Michel, *Traité de toxicologie générale*, Springer, France, 1999, 789 pages.

### Sites internet :

CHIPPAUX, Jean-Philippe, *Venins animaux dans la recherche biologique*, [En ligne], [http://www.cairn.info/resume.php?ID\\_ARTICLE=ETHN\\_043\\_0419](http://www.cairn.info/resume.php?ID_ARTICLE=ETHN_043_0419), 2004, page consultée le 13 février 2008.

JOLY, Pierre, *Une galaxie de pathologie*, [En ligne], <http://www.frm.org/images/stories/Aidez/pdfrs/n87.pdf>, 2001, page consultée le 18 mars 2008.

BAILLY, Yanick, *La Mellitine*, [En ligne], <http://www.bigre.ulb.ac.be/Users/jean/BioInformatic/Session2000-01/mellitine/>, 2001, page consultée le 18 mars 2008.

RAYNAL, Claudette, *Scleroses en plaque et apithérapie*, [En ligne], <http://abeille-alternative.chez-alice.fr/>, 2001, page consultée le 5 avril 2008.

KIAN WEE, Chua, *Venom*, [En ligne], <http://web.singnet.com/~chuaecc/venom/venom.htm>, 1998, page consultée le 20 janvier 2008.

ACOSTA, Dalia, *Scorpion Venom a New Weapon in Fighting Cancer*, <http://www.tierramerica.net/2001/0819/iacentos.shtml>, [En ligne], 2001, page consultée le 2 février 2008.

FEN, Xin, *Genetic mechanisms of scorpion venom peptide diversification*, [En ligne] [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=16387337&dopt=AbstractPlus](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=16387337&dopt=AbstractPlus), 1998, page consultée le 12 mars 2008.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, [En ligne], <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=444309&blobtype=pdf>, 1972, page consultée le 3 mars 2008.

BLOOD, *Solenopsin, the alkaloidal component of the fire ant (solenopsis invicta), is a naturally occurring inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase signaling and*

- angiogenesis*, [En ligne],  
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/reprint/blood-2006-06-029934v1.pdf>, 21 septembre 2006, page consultée le 24 mars 2008.
- J. LEWIS, Richard, *Conotoxin Venom Peptide Therapeutics*, [En ligne],  
<http://www.eurekah.com/chapter/3664>, 2008, page consultée le 3 mars 2008.
- AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, *Solution Structure and Interaction of Cupiennin Ia, a Spider Venom Peptide, with Phospholipid Bilayers*, [En ligne],  
<http://pubs.acs.org/cgi-bin/abstract.cgi/bichaw/2007/46/i11/abs/bi062306+.html>, 2007, page consultée le 24 mars 2008.
- ION CHANNEL, PATCH CLAMP AND ELECTROPHYSIOLOGY RESEARCH, *A venom peptide with a novel presynaptic blocking action*, [En ligne],  
<http://www.ionchannels.org/showabstract.php?pmid=6608056>, 2007, page consultée le 2 avril 2008.
- ZHANG, Guangmei, SCHMIDT, Otto et ASGARI, Sassan, *A Novel Venom Peptide from an Endoparasitoid Wasp Is Required for Expression of Polydnavirus Genes in Host Hemocytes*, [En ligne],  
<http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/279/40/41580>, 2004, page consultée le 3 mars 2008.
- INFORMA HEALTHCARE, *Precursor of a Novel Scorpion Venom Peptide (BmKn1) with no Disulfide Bridge from Buthus martensii Karsch*, [En ligne],  
<http://www.ingentaconnect.com/content/tandf/ubmb/2001/00000051/00000002/art00010>, 2001, page consultée le 3 mars 2008.
- WIKIPEDIA, THE FREE ENCYCLOPEDIA, *Antimicrobial peptides*, [En ligne],  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Antimicrobial\\_peptides](http://en.wikipedia.org/wiki/Antimicrobial_peptides), 2008, page consultée le 28 mars 2008.
- BIOINFOBANK LIBRARY, *Comprehensive sequence analysis of horseshoe crab cuticular proteins and their involvement in transglutaminase-dependent cross-linking*, [En ligne], <http://lib.bioinfo.pl/meid:8941>, 2005, page consultée le 3 mars 2008.
- INSTITUTE OF TECHNOLOGIE TALLAGHT, *Antimicrobial peptides - alternative to antibiotics?*, [En ligne],  
<http://www.irishscientist.ie/2003/contents.asp?contentxml=03p85.xml&contentxml=is03pages.xsl>, 2003, page consultée le 2 avril 2008.
- UNIVERSITY OF NEBRASKA, MEDICAL CENTER, *Antimicrobial Peptide Database*, [En ligne], <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, 2008, page consultée le 23 mars 2008.

- EISNER, Thomas et CAMAZINE Scott, *Spider web autonomy induced by prey venom injection: an adaptive response to pain?*, [En ligne], <http://www.pnas.org/cgi/reprint/80/11/3382.pdf>, 1983, page consultée le 2 avril 2008.
- SAHAYARAJ K., BORGIO J. F., MUTHUKUMAR S., ANANDH G. P., *Antibacterial activity of Rhynocoris marginatus (FAB.) and Catamirus previpennis (Servile) (Hemiptera: Reduviidae) venoms against human pathogens*, [En ligne], <http://www.scielo.br/pdf/jvatitd/v12n3/31235.pdf>, 2006, page consultée le 2 avril.
- S. EDWARDS, John, *The action and composition of the saliva of an assassin bug Platyeris Rhadamanthus Gaerst. (Hemiptera Reduviidae)*, [En ligne], <http://jeb.biologists.org/cgi/reprint/38/1/61.pdf>, 1960, page consultée le 2 avril.
- A. BROGDEN, *Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?*, [En ligne], [http://72.14.205.104/search?q=cache:DNRUSsIKxdUJ:www.dentistry.uiowa.edu/public/clinics/perio/Perio\\_Brogden.pdf+antimicrobial+peptides&hl=fr&ct=clnk&cd=6&gl=fr](http://72.14.205.104/search?q=cache:DNRUSsIKxdUJ:www.dentistry.uiowa.edu/public/clinics/perio/Perio_Brogden.pdf+antimicrobial+peptides&hl=fr&ct=clnk&cd=6&gl=fr), mars 2005, page consultée le 27 février 2008.
- BALWS, Robert, *Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection*, [En ligne], <http://respiratory-research.com/content/1/3/141>, 2000, page consultée le 23 mars 2008.
- M. PUTMAN, Sean et Dr. David W. STANLEY, *Insect immunology: humoral immunity*, [En ligne], <http://entomology.unl.edu/ent801/humimm.html>, 2007, page consultée le 23 mars 2008.
- THE EMBO JOURNAL, *Insect immunity: expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and dipterocin, in Phormia terranova*, [En ligne], <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=552280>, 1990, page consultée le 2 avril 2008.