



HAL
open science

Apithérapie et propriétés thérapeutiques du venin d'abeille : focus sur la mélittine en cancérologie expérimentale

Juliette Aillaud

► **To cite this version:**

Juliette Aillaud. Apithérapie et propriétés thérapeutiques du venin d'abeille : focus sur la mélittine en cancérologie expérimentale. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-03684478

HAL Id: dumas-03684478

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03684478v1>

Submitted on 1 Jun 2022

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

THÈSE

PRÉSENTÉE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA
FACULTÉ DE PHARMACIE DE MARSEILLE

LE 13/05/2022

PAR

Mlle Juliette AILLAUD

Née le 26 août 1997 à Aix en Provence

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE :

**APITHÉRAPIE ET PROPRIÉTÉS THÉRAPEUTIQUES DU VENIN D'ABEILLE :
FOCUS SUR LA MELITTINE EN CANCÉROLOGIE EXPÉRIMENTALE**

JURY :

Président : Pr. Philippe Piccerelle

Membres : Dr. Joseph Ciccolini
Dr. Michèle Magnan

Membre d'honneur : Dr. Michel Aillaud

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, Mme Alexandrine BERTAUD, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, M. Philippe GARRIGUE, M. Guillaume HACHE, M. Thierry TERME
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Philippe CHARPIOT, M. Riad ELIAS
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Chloé SIMON
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC M. François DEVRED
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pierre REBOUILLON M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE	M. Jérémy MAGALON Mme Carole SIANI Mme Muriel MASI

ENSEIGNANT CDI

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN
---------	-----------------------

A.H.U.

PHARMACOTECHNIE	Mme Mélanie VELIER
-----------------	--------------------

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN M. Romaric LACROIX
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN Mme Sandra GHAYAD
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Amandine BONIFAY
----------------------------	----------------------

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

PRATIQUE OFFICINALE	Mme Emmanuelle TONNEAU-PFUG
---------------------	-----------------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL M. Quentin ALBERT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER M. Mathieu CERINO
CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC M. Pascal PRINDERRE
CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN M. Elnur GARAYEV

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ETHIQUE	Mme Laurie PAHUS
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA
DISPOSITIFS MEDICAUX	Mme Valerie MINETTI-GUIDONI

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE M. Joseph CICCOLINI
TOXICOLOGIE GENERALE	Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD Mme Marie-Anne ESTEVE
PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA Mme Anne RODALLEC M. Nicolas FABRESSE
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Pierre-Henri VILLARD

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE	Mme Anaïs MOYON M. Vincent NAIL
-----------------------------	------------------------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 13 décembre 2021



LE DOYEN
F. DIGNAT-GEORGE

« L'université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

REMERCIEMENTS

- **À M. le professeur Philippe Piccerelle**, merci pour l'honneur que vous me faites en acceptant de présider mon jury, je vous adresse mes sincères remerciements.
- **À M. le docteur Joseph Ciccolini**, ce fut un plaisir de travailler avec vous sur un sujet en lien avec l'apiculture, merci pour vos conseils et vos connaissances, veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.
- **À Mme le docteur Michèle Magnan**, Michèle, ta présence dans mon jury me touche sincèrement, ce fut un plaisir d'avoir travaillé, même une courte période, à tes côtés. Merci pour ton soutien et ton avis précieux.
- **À M. le docteur Michel Aillaud, Papa**, le terme « jury d'honneur » est parfaitement approprié car je te dois entièrement ma réussite aujourd'hui. Avoir comme père un pharmacien exemplaire mais aussi avoir grandi en voyant la fierté dans tes yeux à chaque étape de ma vie ne pouvait que me faire devenir une personne épanouie aujourd'hui. Merci de m'avoir formé, accompagnée et soutenue à chaque instant. Depuis le jour où j'ai décidé de devenir pharmacien, je n'ai cessé de te prendre comme exemple car à mes yeux tu es un modèle de réussite.
- **À ma Maman**, ces quelques mots ne suffiront pas à te remercier pour l'incommensurable soutien que tu m'apportes au quotidien depuis toujours, et particulièrement dans les étapes difficiles de ces études, merci d'être toujours disponible, à l'écoute, juste et de bons conseils. Tu es la mère que tout le monde rêve d'avoir et je te dois ma réussite aujourd'hui.
- **À ma grande sœur, Claire**, qui ne connaît pas l'admiration que j'ai pour toi aujourd'hui ? Je ne saurais te remercier assez d'avoir été durant ces études une aide si précieuse (oui j'ai donné tes fiches à la moitié de la promo), passer derrière toi après ta scolarité exemplaire ne fut pas simple mais je suis fière d'être associée à toi quand on entend notre nom car tu es un exemple pour moi et tu as été mon plus gros moteur pour réussir. Tu es un pharmacien doué, irréprochable et tu ne peux être qu'une inspiration à mes yeux.

- **À ma petite sœur, Camille « Caniss »**, je suis tellement fière de toi et de la personne que tu es. Vivre avec toi dans « l'appart Aillaud » reste un des meilleurs souvenirs de mes années étudiantes, on aura passé des moments incroyables toutes les deux, merci de m'avoir supporté, d'avoir subi mon caractère pas simple mais aussi de m'avoir toujours soutenu. Tu n'as rien à envier aux autres, tu es une personne incroyable, ne doute jamais de toi. L'année prochaine tu seras à ma place mais ne commence pas à stresser ça va bien se passer !
- **À ma tatie Annie**, je te remercie pour le soutien que tu m'as toujours apporté, et particulièrement cette dernière année. Je t'admire énormément, et j'espère te rendre fière aujourd'hui.
- **Léa**, ma Léa, sûrement une de mes plus belles rencontres, qui aurait cru que la grande Azemou se lierait d'amitié avec JA, la stressée des exams ! Mais finalement c'était une évidence, je ne pourrais imaginer ces dernières années sans ta présence, ton soutien, ton amitié inégalable. Tu es une personne formidable et je serai toujours à tes côtés. Merci d'avoir supporté mon stress, mes angoisses, et quel bonheur d'avoir partagé des moments mémorables, des soirées censurables (oups), des coups de soleils, des sorties GDR et j'en passe. Hâte d'être à ta thèse, tu seras un pharmacien formidable, bien joué JO !
- **Elsa**, quelle chance d'avoir une amie comme toi, je te remercie d'avoir toujours été là pour moi, d'être de si bons conseils et de partager tes belles valeurs. La triloc à l'appart restera gravée dans mes souvenirs, autant que d'écouter des musiques (je préciserai pas) à fond dans ma voiture. Merci d'avoir fait des tonnes de compromis toujours pour me faire plaisir. Tu es une personne en or, ne change jamais. Et pour te faire plaisir, je dirais même que tu seras une super pharmaciennE ! (PS : la Twingo est à la casse j'espère)
- **Matthieu**, ma BoT, mon ami, mon confident sur ma terrasse avec un café dans la main, habiter en face c'était incroyable. Tu es une de mes plus belles rencontres, une personne à qui je pourrais tout confier sans le moindre jugement. Merci de m'avoir toujours épaulé, merci pour ces heures de révisions en facetime, ces vocaux à n'en plus finir... Je te vois t'épanouir loin de moi mais près du cœur, reviens vite dans le Sud ! Je me réjouis d'être à tes côtés pour ta thèse.

- **Charlotte**, je suis heureuse d'avoir croisé ta route, tu es une personne fabuleuse, incroyablement gentille et tellement drôle. Ton soutien me touche beaucoup, et je te souhaite le meilleur pour la suite, ton parcours sans faute est admirable, et même si je sais que je suis ta plus grande rivale je n'évoquerai pas ce qu'il se passe après une croziflette... Je te souhaite de t'épanouir dans ta grande carrière de biologiste.

- **Baptiste**, t'avoir rencontré m'a énormément apporté, merci d'avoir été là pour moi et de me faire toujours autant rire. Je sais que tu es une belle personne, je suis heureuse de te compter parmi mon cercle proche et même si ton avenir est en questionnement, je te souhaite de t'accomplir et de t'épanouir peu importe la voie. Tu réussiras quoi qu'il arrive je n'en doute pas.

- **Nadir**, krkrkr, une rencontre impensable mais finalement tellement pure. Merci d'être la personne que tu es, toujours disponible, généreuse, toujours prête à nous défendre, nous protéger, et nous faire rire à en pleurer. Ta personnalité est fabuleuse, reste comme tu es. Merci pour les tours en voiture toit ouvrant sur Sakakini et les fous rires que je ne compte plus. Hâte que tu sois mon futur confrère businessman.

- **Marina**, quelle chance j'ai eu de tomber dans ton groupe de TP et de m'être rapprochée de toi. Je te remercie infiniment d'avoir été à mes côtés, d'avoir cru en moi et d'avoir partagé de si bons moments. Oui je dois le dire tu es extrêmement drôle, si ce n'est ta plus grande qualité. Nos filières différentes nous éloignent mais je ne cesse de me persuader que nous resterons toujours liées et je suis très fière du parcours que tu entreprends, tu seras un pharmacien accompli, ta rigueur et ton sérieux ont toujours été des valeurs que j'admire chez toi. Merci pour ces années d'études à tes côtés.
PS : Promis, notre secret (avec les internats) sera toujours bien gardé...

- **Logan**, le suricate, une très belle rencontre. Je suis fière d'être l'amie du major de l'internat Marseille ! Merci pour les beaux moments passés ensemble, les soirées films à l'appart avec Marina, les longues discussions sur la vie et la soirées burger aux gites... Je te souhaite le meilleur, mais tu es déjà bien parti pour être le futur doyen !

- **Axel**, mon co-externe préféré, je te remercie pour tous les moments passés ensemble, tes pas de danses, et surtout tes talents au Top Ten (je ne veux jamais oublier ce moment). Avoir dans mes amis une personne aussi saine et bienveillante me comble profondément. Je te souhaite la plus belle réussite dans ta carrière hospitalière.
- **Jeremy**, quelle chance j'ai de te compter parmi mes amis, merci pour ta bonne humeur, ton sourire, et ton humour inégalable. Tu m'as apporté beaucoup, je suis fière d'avoir avancé dans mes études à tes côtés et je te souhaite d'être un pharmacien accompli.
- **Geoffrey**, plus de 10 ans d'amitié, et je suis fière de te savoir à mes côtés pour la fin de mes études. Tu as toujours été là pour moi, on aura bien rigolé au lycée (on se souvient du cours d'histoire de Mr Blanc), et malgré la distance j'ai toujours su que je pouvais compter sur toi. Et puis avoir comme ami un expert-comptable c'est la classe (je réserve ma place en tant que première cliente dans ton futur cabinet).
- **Morgan**, mon meilleur ami depuis notre adolescence, et aujourd'hui rien n'a changé. Je me souviendrais de nos années à l'internat pour toujours. Je te remercie d'avoir toujours eu un mot gentil dans les différentes étapes de mes études, ton soutien me touche beaucoup. Je te souhaite le meilleur pour la suite !
- **Karim**, je ne peux pas ne pas parler d'un ingénieur aux arts et métiers dans mes remerciements car je veux me souvenir à jamais de cette fameuse soirée aux arts à Aix absolument mémorable. Merci pour ta gentillesse à mon égard et pour m'avoir permis de mettre un pied dans l'univers fabuleux des gadz !
- Merci aux belles personnes qui ont croisé ma route pendant ces belles années, **Thomas, Mélanie, Nans, Andréa, Lucie, Clara, Géraud, Marina, Dorian, Amandine, Yan, Lorraine, Pauline...**
- Je tiens à remercier l'équipe de la pharmacie Aillaud pour ces nombreuses années à me côtoyer, et plus particulièrement à **Valérie et Isabelle**, votre aide depuis que je travaille à la pharmacie a participé à ma réussite aujourd'hui et je vous en suis très reconnaissante.

Je dédie cette thèse aux trois personnes qui veillent sur moi aujourd'hui :

- **Mamie et Peto**, vous n'êtes pas à ma thèse mais je sais que vous me regardez et me soutenez sans faille depuis les étoiles. Votre présence me manque chaque seconde mais je serais éternellement reconnaissante de vous avoir rendu fières jusqu'au bout. Je sais que les nuages formeront un « M » le jour de ma soutenance. Je vous aime.
- **Mémé Suzanne**, pharmacien d'officine et biologiste émérite, ayant fondé la pharmacie Aillaud en 1952, je garde en mémoire ces moments passés avec toi ou tu me faisais réciter mes déclinaisons latines. J'aurai aimé que tu saches que ta petite fille est devenue pharmacien, et je sais que tu aurais été fière de moi aujourd'hui. Je pense fort à toi.

SERMENT DE GALIEN

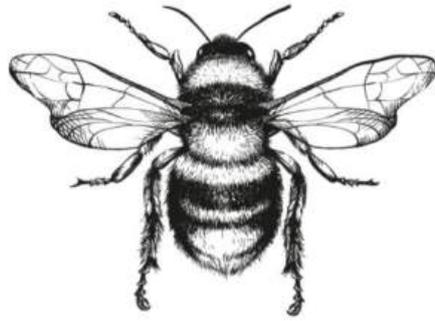


Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ◆ *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ◆ *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ◆ *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ◆ *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.



« Si l'abeille disparaissait de la surface du globe, il ne resterait plus que quatre ans à l'homme. Plus d'abeilles, plus de pollinisation, plus de plantes, plus d'animaux, plus d'homme. »

Albert Einstein

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES FIGURES.....	18
INTRODUCTION.....	19
PARTIE 1 : L'ABEILLE ET LA RUCHE	20
I. L'ABEILLE.....	21
II. PRODUITS DE LA RUCHE.....	25
1. <i>LE MIEL</i>	25
a. Source, fabrication et composition.....	25
b. Intérêts thérapeutiques.....	27
2. <i>LE POLLEN</i>	27
a. Source, fabrication et composition.....	27
b. Intérêts thérapeutiques.....	28
3. <i>LA GELÉE ROYALE</i>	29
a. Source, fabrication et composition.....	29
b. Intérêts thérapeutiques.....	29
4. <i>LA PROPOLIS</i>	30
a. Source, fabrication et composition.....	30
b. Intérêts thérapeutiques.....	30
5. <i>LA CIRE D'ABEILLE</i>	31
a. Source, fabrication et composition.....	31
b. Intérêts thérapeutiques.....	31
6. <i>LE VENIN D'ABEILLE</i>	32
a. Anatomie de l'appareil vulnérant.....	32
b. Mécanisme de la piqûre	33
c. Composition du venin.....	34
d. Récolte.....	35
e. Propriétés biologiques et perspectives thérapeutiques.....	37
f. Réactions à la piqûre d'abeille.....	38
g. Immunothérapie au venin d'abeille.....	39
h. L'utilisation des toxines animales en médecine	40
PARTIE 2 :	42
LA MELITTINE : INTÉRÊT EN CANCÉROLOGIE ET AUTRES DOMAINES THÉRAPEUTIQUES.....	42
I. RAPPELS D'ONCOLOGIE.....	43
1. <i>DÉFINITION DU CANCER</i>	43
2. <i>ÉTAT DES LIEUX ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET PRISE EN CHARGE ACTUELLE DES CANCERS</i>	43
3. <i>LES VOIES DE SIGNALISATION</i>	44
a. La voie NF- κ B.....	44
b. La voie Ras/MAPK.....	45
c. La voie PI3K/AKT.....	46
d. La voie JAK/STAT.....	47
e. La voie de la calmoduline	48
4. <i>VUE D'ENSEMBLE DES CIBLES POTENTIELLES DU VENIN D'ABEILLE</i>	49
II. LA MELITTINE.....	51
1. <i>BIOSYNTHÈSE DE LA MELITTINE</i>	51
2. <i>STRUCTURE CHIMIQUE</i>	52
3. <i>ACTION DE LA MELITTINE SUR LES MEMBRANES</i>	53

4.	<i>PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES</i>	55
a.	Propriétés anticancéreuses	56
b.	Propriétés antimicrobiennes	58
c.	Propriétés anti-inflammatoires.....	60
5.	<i>EFFETS INDÉSIRABLES DE LA MELITTINE</i>	63
a.	Réaction hémolytique.....	64
b.	Réaction allergique	64
c.	Douleur	64
6.	<i>NANOTECHNOLOGIE</i>	67
7.	<i>STANDARDISATION DE LA MÉTHODE D'OBTENTION DE LA MELITTINE</i>	71
PARTIE 3 : LA MELITTINE EN CANCÉROLOGIE EXPÉRIMENTALE		77
CONCLUSION		93
BIBLIOGRAPHIE		94

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Classification systématique de <i>Apis mellifera</i>	21
Figure 2 : Anatomie de l'abeille.....	22
Figure 3 : Anatomie des ailes.....	24
Figure 4 : Description anatomique de l'appareil digestif de l'abeille	26
Figure 5 : Composition du miel.....	26
Figure 6 : Transport du pollen	27
Figure 7 : Composition du pollen.....	28
Figure 8 : Composition de la gelée royale	29
Figure 9 : Composition de la propolis.....	30
Figure 10 : Composition de la cire	31
Figure 11 : Anatomie de l'appareil vulnérant	33
Figure 12 : Mécanisme de la piqure	33
Figure 13 : Composition du venin déshydraté.....	35
Figure 14 : Récolte du venin par électrostimulation	36
Figure 15 : Collecteur de venin.....	37
Figure 16 : Rôle du TNF dans la voie NF- κ B.....	45
Figure 17 : Voie de signalisation RAS.....	46
Figure 18 : Voie de signalisation PI3K/AKT	47
Figure 19 : Voie de signalisation JAK/STAT	48
Figure 20 : Cibles potentielles de la melittine	49
Figure 21 : Structure chimique de la melittine	52
Figure 22 : Structure quaternaire de la melittine	53
Figure 23 : Étude des propriétés cancéreuse de la melittine	58
Figure 24 : Étude des propriétés antimicrobiennes de la melittine	60
Figure 25 : Propriétés anti-inflammatoires de la melittine	62
Figure 26 : Voie de signalisation impliqué dans l'effet anti-inflammatoire de la melittine.....	63
Figure 27 : Intervention de la melittine dans les voies de signalisation de la douleur.....	65
Figure 28 : Formes potentielles de nanoparticules contenant la melittine.....	68
Figure 29 : Structure d'un liposome	69
Figure 30 : Structure d'une nanoparticule lipidique.....	70
Figure 31 : Extracteur de venin.....	72
Figure 32 : Technique chirurgicale d'extraction du venin (54)	73
Figure 33 : Chromatogramme de la melittine en LCMS.....	76
Figure 34 : Évolution des taux de viabilité cellulaire après traitement au venin d'abeille	79
Figure 34 : Évolution de la concentration inhibitrice médiane selon les lignées cellulaires.....	80
Figure 35 : Comparaison du taux de viabilité selon le type de venin utilisé.....	81
Figure 36 : Quantification du taux de melittine selon l'origine du venin	81
Figure 37 : Taux de survie cellulaire en fonction de la concentration d'anticorps anti-melittine	82
Figure 38 : Western blot.....	83
Figure 39 : Cytométrie de flux et quantification des cellules traitées par melittine ou par venin d'abeille.....	83
Figure 40 : Comparaison de la viabilité cellulaire après traitement par melittine ou par venin d'abeille.....	84
Figure 41 : Étude de l'effet d'une liaison RGD à la melittine sur le taux de survie cellulaire	85
Figure 42 : Modifications structurales et conséquences sur l'activité anticancéreuse de la melittine	85
Figure 42 : Structures quaternaires de la melittine	86
Figure 43 : Comparaison des effets de la melittine et du venin d'abeille sur plusieurs lignées.....	87
Figure 44 : Étude par technique BRET de la liaison melittine-récepteur	88
Figure 45 : Étude par technique BRET de la saturation au récepteur EGFR	88
Figure 46 : Figure récapitulative des actions de la melittine.....	89
Figure 47 : Comparaison du taux de survie cellulaire après traitement melittine/docétaxel ou venin d'abeille/docétaxel.....	89
Figure 48 : Comparaison de la taille de tumeur chez des groupes de souris placebo ou traités.....	90
Figure 49 : Immunohistochimie et de l'immunofluorescence sur des biopsies de tumeurs.....	91

INTRODUCTION

L'abeille est un insecte qui fascine les peuples depuis des décennies par sa capacité à fabriquer une substance appréciée et gouteuse : le miel. Elle le fabrique en totale autarcie, selon une organisation que l'on pourrait qualifier de militaire tant la ruche est intelligente.

Effectivement, les abeilles fabriquent le miel pour se nourrir, mais elles sont la source d'autres produits très riches, notamment par leurs propriétés thérapeutiques. La propolis, la gelée royale ou encore le pollen sont utilisés par les hommes depuis l'antiquité et encore plus aujourd'hui, dans la quête d'une médecine plus naturelle.

Les abeilles sont essentielles à la vie sur terre par leur rôle primordial dans l'équilibre de notre écosystème. En participant à la pollinisation, elles permettent à de nombreuses espèces de se nourrir des plantes qui se reproduisent par le biais de la dissémination du pollen. A ce jour, un monde sans abeille serait inquiétant et entrainerait le déclin d'une partie de la faune et de la flore de notre planète.

Outre son atout écologique, les hommes ont cherché à exploiter les produits de la ruche à des fins alimentaires et surtout médicales. Les rôles bénéfiques du miel ou de la propolis sont bien établis dans notre vie courante mais aujourd'hui, un cran a été franchi, on se demande si l'abeille ne pourrait pas soigner des pathologies importantes comme des neuropathies, des pathologies inflammatoires voir même le cancer.

Alors, quelle substance pourrait servir à soigner une maladie qui touche des milliers de personnes dans le monde ? Quelle molécule serait une potentielle munition face à ce fléau qu'est le cancer ? La réponse se trouverait peut-être dans l'arme de défense des abeilles, le venin.

Nous allons tenter de comprendre à travers ce travail par quel mécanisme le venin d'abeille, et plus précisément son composant majeur, la melittine, petite protéine aux grandes propriétés, serait capable d'interférer avec la genèse des tumeurs.

PARTIE 1 : L'ABEILLE ET LA RUCHE

I. L'ABEILLE

L'abeille, de l'ancien provençal *abelha* et du latin *apicula*, appartient à l'embranchement des arthropodes, à la classe des insectes et à l'ordre des hyménoptères. Elle fait partie de la famille des apidés. Les abeilles sont invertébrées, ailées, possèdent six pattes et respirent grâce aux trachées (1).

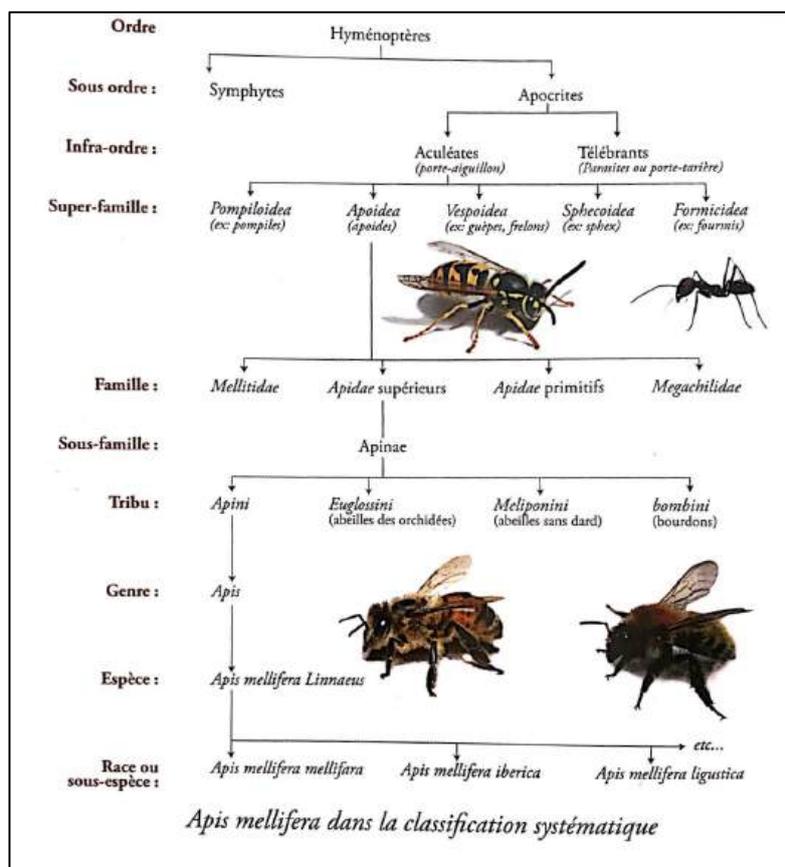


Figure 1 : Classification systématique de *Apis mellifera*

Le traité Rustica de l'apiculture, Henri Clément, 2015

Il existe à ce jour neuf espèces d'abeilles du genre *Apis* mais c'est l'espèce *Apis mellifera* Linnaeus qui est privilégiée pour l'élevage à des fins de récoltes de miel. C'est pour cette raison que cette espèce a été disséminée dans le monde entier. Il existe, au sein de l'espèce domestique *Apis mellifera*, des sous-espèces avec des particularités notamment sur leurs fonctions et leur localisation :

- *Apis mellifera ligustica* qui correspond à l'abeille italienne.
- *Apis mellifera caucasica* autrement dit « abeille caucasienne ».
- *Apis mellifera carnica* qui est appelée « abeille carniolienne ».
- *Apis mellifera mellifera*, communément appelée « abeille noire », c'est l'abeille française (2).

D'un point de vue anatomique, l'abeille est constituée d'une tête, d'un corps, d'un thorax et d'un abdomen. Elle possède un système circulatoire, nerveux, respiratoire et digestif. La morphologie est spécifique de l'abeille mais il y aura des différences entre la reine, le mâle et l'ouvrière.

Le corps, composé de chitine dure, forme un exosquelette divisé en trois parties, la tête, le thorax et l'abdomen. La tête de l'abeille supporte les organes de l'odorat et de la vision ainsi qu'un cerveau d'une taille non négligeable. Le thorax supporte l'appareil locomoteur qui comprend les deux paires d'ailes et les trois paires de pattes. L'abdomen est divisé en sept segments qui supportent les glandes de l'abeille : les glandes cirières, les glandes de Nasanov qui produisent des phéromones et les glandes à venin prolongées par un dard (3).

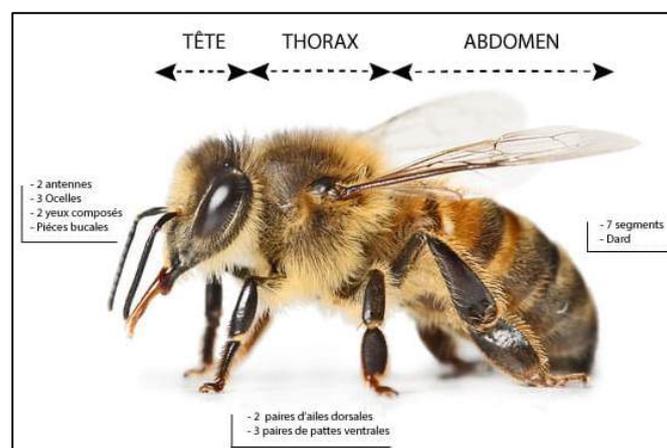


Figure 2 : Anatomie de l'abeille

https://ruches.net/anatomie_abeille

Dans une colonie d'abeille, il y a trois castes différentes : la reine, les ouvrières et les mâles.

La reine est la seule femelle féconde. Son unique fonction est la ponte après avoir été fécondée par les mâles lors du vol nuptial. La reine provient d'une larve nourrie exclusivement par de la

gelée royale. Sa morphologie est différente des ouvrières : elle est plus grande (vingt millimètres contre douze millimètres) et est dépourvue des organes servant au travail dans la ruche. Sa durée de vie est également supérieure, 4 ans contre 45 jours pour une ouvrière.

Le mâle, aussi appelé faux bourdon, n'est pas systématiquement retrouvé dans une colonie. Il n'a qu'une seule fonction de reproduction en fécondant la reine. Il ne participe à aucune tâche dans la vie de la colonie. Il est morphologiquement plus grand qu'une abeille ouvrière, et ne possède pas de dard. Lors de l'accouplement, une partie de l'appareil reproducteur se dévagine, entraînant ainsi la mort du mâle.

Le vol nuptial est le moment de l'accouplement de la reine avec plusieurs mâles, à plus de 10 mètres d'altitude. La reine, peu après sa naissance, va ainsi remplir sa spermathèque qui lui permettra de féconder ses œufs pour le restant de sa vie. Le mâle mourant juste après l'accouplement, la reine restera en vol ou repartira les jours suivants jusqu'à ce que sa spermathèque soit totalement remplie.

Les ouvrières sont des abeilles qui ont pour rôle le bon fonctionnement de la ruche. Il y a des tâches spécifiques qu'elles vont accomplir successivement au cours de leur courte vie (nettoyage de la ruche, nourrissage, maçonnerie, ventilation, défense de la colonie, butinage). Leur anatomie va donc évoluer au fil du temps pour s'adapter à leur tâche (1). C'est ainsi qu'une jeune ouvrière possèdera déjà un système sensoriel lui permettant de se retrouver dans l'espace via des poils mécanorécepteurs. Elle se servira de ses antennes pour détecter les odeurs et phéromones qui l'entourent et elle aura aussi des récepteurs gustatifs.

Dans la deuxième partie du développement, l'abeille va acquérir une mémoire visuelle pour trouver les sources stratégiques de nourriture et rentrer à la ruche. Elle développera également une ouïe sensible au son de ses congénères et aux sons de l'environnement extérieur.

Les abeilles ont un système de vol très efficace. En effet, c'est un système constitué de deux paires d'ailes rattachées au thorax et s'articulant de manière simultanée via un système d'accroche appelé l'hamuli.

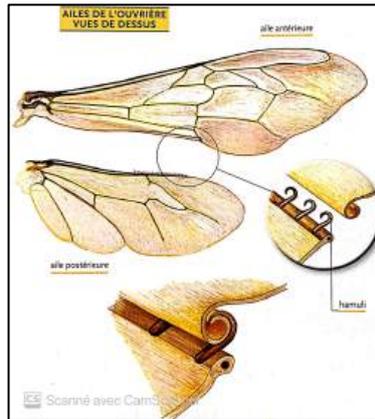


Figure 3 : Anatomie des ailes

Le traité Rustica de l'apiculture, Henri Clément, 2015

La fréquence d'un battement d'aile est de 400 battements par seconde, et une ouvrière a une vitesse de vol moyenne de 25 km/h. Les abeilles butineuses volent dans un périmètre d'environ 1,5 km autour de la ruche. (3)

Pour communiquer, les abeilles utiliseront plusieurs moyens notamment les antennes, les phéromones et les vibrations. Les phéromones induisent des comportements bien spécifiques : elles peuvent modifier le comportement, ralentir le développement du couvain ou encore modifier la physiologie. Elles sont produites par différentes glandes (glande mandibulaire, glande à venin, glande de Nasanov).

Enfin, un des éléments clés de la communication est la danse de l'abeille. On distingue la danse frétillante, ou en huit, qui informe sur la distance, la direction et la richesse d'une source de nourriture située à plus de 80 mètres de la ruche, de la danse en rond qui indique simplement qu'une source de butinage a été trouvée près de la ruche, à moins de 80 mètres.(3)

II. PRODUITS DE LA RUCHE

1. LE MIEL

a. Source, fabrication et composition

Le miel est une substance sucrée produite par les abeilles mellifères à partir du nectar des fleurs, qu'elles emmagasinent dans les rayons de la ruche pour ensuite en nourrir leurs larves (définition du Larousse). Il s'agit d'un des produits alimentaires les plus naturels. Il existe deux sources sucrées pour la butineuse : le nectar et le miellat.

Le nectar est une solution aqueuse concentrée en sucre qui est sécrétée par les nectaires qui sont des tissus glandulaires situés au centre des fleurs. Il s'agit d'une sève élaborée. La composition en sucre dépend de la plante, on retrouve deux monosaccharides (fructose, glucose) et un disaccharide (saccharose). En plus faible quantité, on retrouve dans le nectar des vitamines, des arômes et des pigments. L'odeur et le goût de ce nectar vont ainsi attirer les abeilles qui y trouveront la source de la matière première du miel.

Le miellat est un liquide sirupeux excrété par certains insectes et laissés sur les végétaux. Ces insectes sont suceurs piqueurs, il s'agit en général de pucerons, cochenilles, psylles et aleurodes. Ils rejettent ainsi un liquide sucré par difficulté de digestion, c'est le miellat. Sa composition diffère du nectar du fait des sucres produits qui sont plus complexes avec notamment des trisaccharides.

Ainsi, l'abeille va aspirer avec sa langue du nectar ou du miellat et stocker les nutriments dans son jabot. Le jabot est une poche située au bout de l'œsophage qui sert exclusivement au stockage du nectar et à la digestion grâce à la libération d'enzymes. Sa capacité de stockage est de 40 à 70 mg.

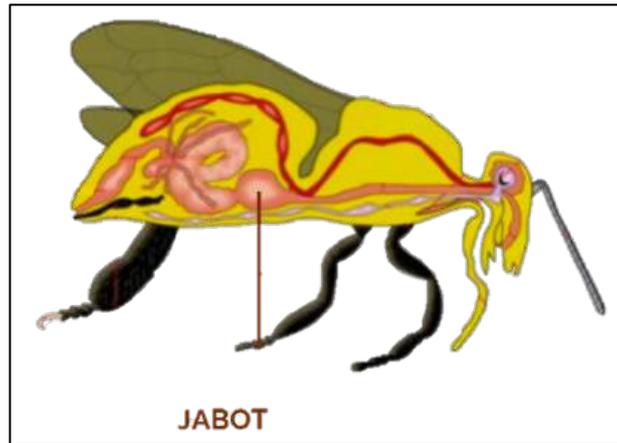


Figure 4 : Description anatomique de l'appareil digestif de l'abeille

<https://be-keeper.com/blog/jabot-abeille/>

Lorsque l'abeille retourne dans la ruche, elle va déverser le contenu du jabot dans le jabot d'une abeille receveuse, cet échange est appelé **trophallaxie**, on pourrait le comparer à un bouche-à-bouche alimentaire (4). Il permettra d'enrichir le contenu du jabot en enzymes : la diastase qui va transformer l'amidon, l'invertase qui coupe le saccharose en glucose et fructose et la glucose oxydase qui produit de l'acide gluconique et de l'eau oxygénée.

La composition de la miellée va ainsi évoluer, avec une étape de déshydratation pour ensuite transposer le miel dans les cellules de cires operculées. La teneur en eau va pouvoir diminuer grâce aux ventileuses qui vont créer un climat sec et chaud pour passer en dessous de 18%.

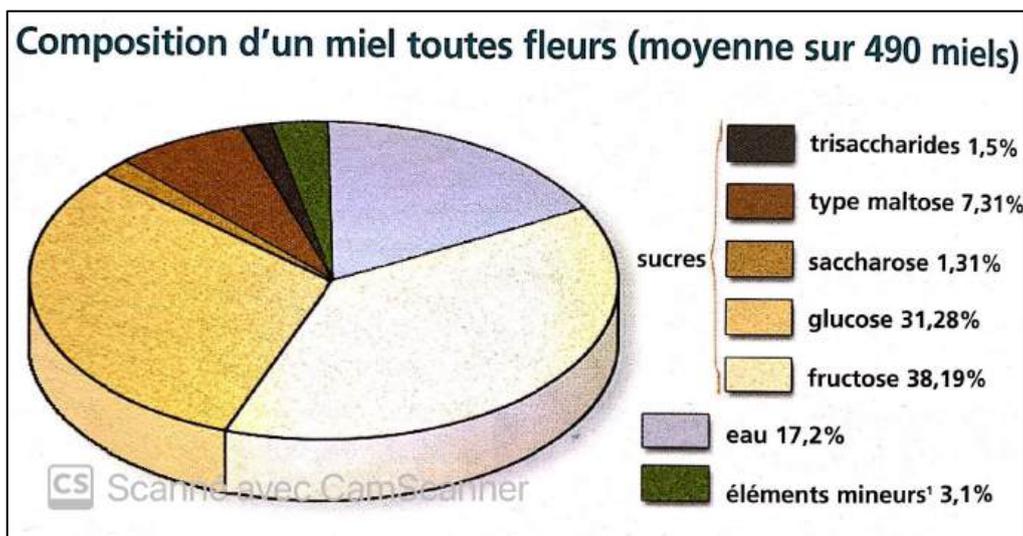


Figure 5 : Composition du miel

Le traité Rustica de l'apiculture, Henri Clément, 2015

b. Intérêts thérapeutiques

Le miel est utilisé comme remède depuis toujours, et ce dans le monde entier. Il s'agit d'une aliment très calorique possédant des propriétés antibactériennes et cicatrisantes grâce à ses propriétés osmotiques. En effet, son osmolarité élevée permet d'attirer l'eau et ainsi conserver un milieu humide tout en évitant la propagation des germes au sein d'une plaie.

De plus, sa forte concentration en sucre fournirait un substrat pour les cellules participant aux différentes étapes de la cicatrisation. Il serait également efficace en cas de toux sèche en provoquant une surproduction de mucus, qui adoucirait ainsi la gorge (5).

2. LE POLLEN

a. Source, fabrication et composition

Le pollen est une poussière de graines microscopiques produite par les fleurs pour assurer leur reproduction. Il provient des étamines qui sont les organes mâles dans la fleur, et contient les gamètes de la fleur. Les grains de pollen sont transportés par le vent ou les insectes vers les organes femelles des fleurs alentours : le pistil (6). Pendant le butinage, l'abeille va passer de fleurs en fleurs et ainsi participer à leur reproduction et transporter le pollen, c'est la pollinisation entomophile.

L'abeille butineuse transporte le pollen sous forme de « pelote » après s'être méthodiquement secouée pour rassembler le pollen dans une corbeille à l'extérieur de la troisième paire de pattes. La morphologie de ses pattes composées de poils et de peigne lui permet de regrouper le pollen à un endroit stratégique pour le transport.

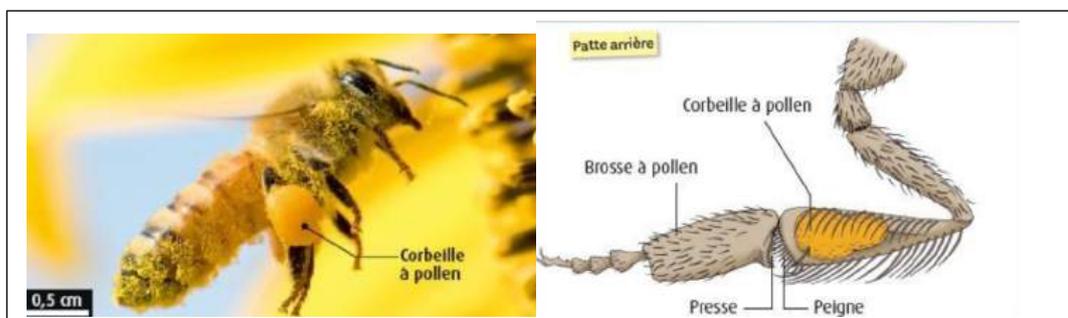


Figure 6 : Transport du pollen

(7)

Lorsque l'abeille arrive dans la ruche, elle dépose la pelote autour du couvain. Le pollen va subir une lactofermentation liée à l'atmosphère de la ruche, afin de le rendre plus digeste. En effet, le pollen est une nourriture indispensable pour les abeilles car c'est la seule source de protéines. Sa composition varie selon la fleur dont il provient mais elle est très complexe et est nécessaire à leur alimentation :

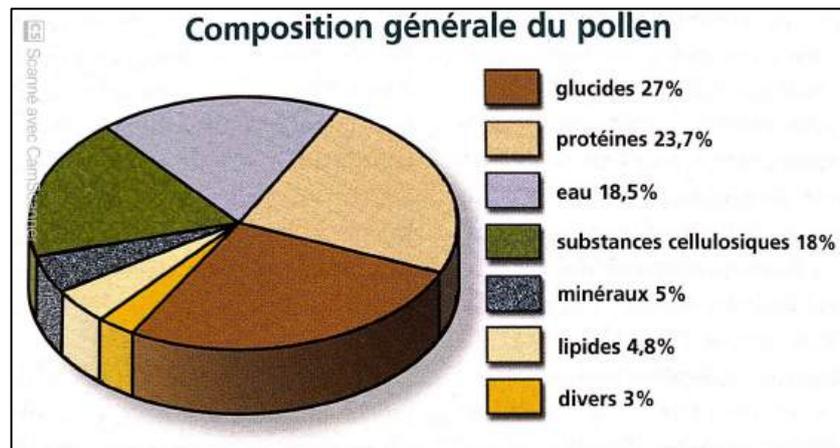


Figure 7 : Composition du pollen

Le traité Rustica de l'apiculture, Henri Clément, 2015

b. Intérêts thérapeutiques

Le pollen, par sa composition riche et variée, serait doté de différentes propriétés : antioxydant, anti-inflammatoire, anti-cancéreux, anti-infectieux, hépato-protecteur et immuno-modulateur. Des recherches sont actuellement en cours pour démontrer ces propriétés et écarter le risque d'effets indésirables graves car le pollen contient des allergènes pouvant être dangereux en cas d'utilisation en thérapeutique humaine (8).

3. LA GELÉE ROYALE

a. Source, fabrication et composition

La gelée royale est la substance apicole qui nourrit et participe à l'élaboration, comme son nom l'indique, d'une reine. C'est une gelée blanchâtre produite par les glandes pharyngiennes des abeilles nourricières.

Chaque larve bénéficie d'une alimentation par la gelée durant leurs trois premiers jours puis seule la cellule royale en reçoit pour les larves destinées à devenir reines jusqu'au 5^{ème} jour. C'est également la nourriture exclusive de la reine de la colonie. Elle permet une croissance fulgurante grâce à sa composition riche en protéine, proche de celle du pollen.

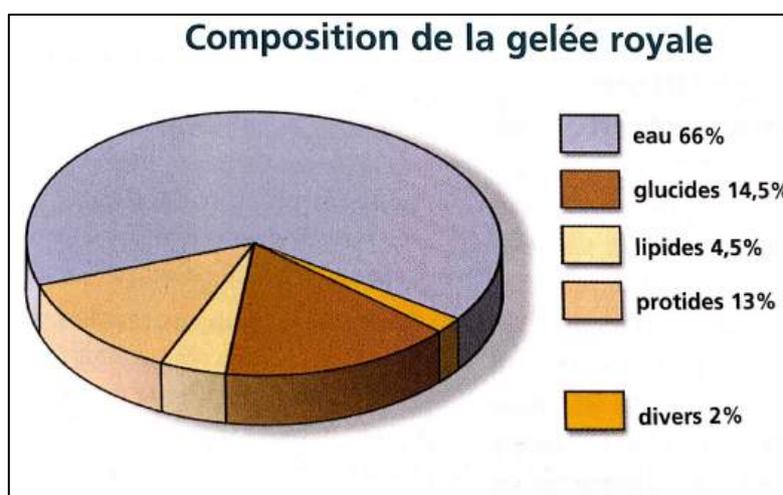


Figure 8 : Composition de la gelée royale

Le traité Rustica de l'apiculture, Henri Clément, 2015

b. Intérêts thérapeutiques

La richesse de sa composition confère à la gelée royale des propriétés multiples et en particulier dans l'immunité. Elle serait un excellent revitalisant et est fortement conseillée en période hivernale comme complément alimentaire pour pallier aux maux de l'hiver. Elle posséderait également des propriétés antibactériennes et oestrogéniques (5).

4. LA PROPOLIS

a. Source, fabrication et composition

La propolis, qui signifie « entrée d'une ville » en grec ancien, est une résine brune visqueuse récoltée par les abeilles sur les bourgeons de certains arbres comme le chêne, le marronnier ou le pin. Les butineuses vont transporter cette résine de la même manière que le pollen pour ensuite la fournir aux ouvrières qui vont s'en servir comme véritable ciment pour la ruche.

C'est la propolis qui rend la ruche étanche. En plus de ce rôle architectural, la propolis est un aseptisant naturel essentiel à l'hygiène de la ruche via ses propriétés anti-infectieuses. Les abeilles l'utilisent pour embaumer les animaux morts et ainsi éviter la diffusion d'odeurs liées aux cadavres (3).

Sa composition est variable en fonction du végétal dont elle provient, mais elle est majoritairement composée de résines ainsi que d'huiles essentielles :

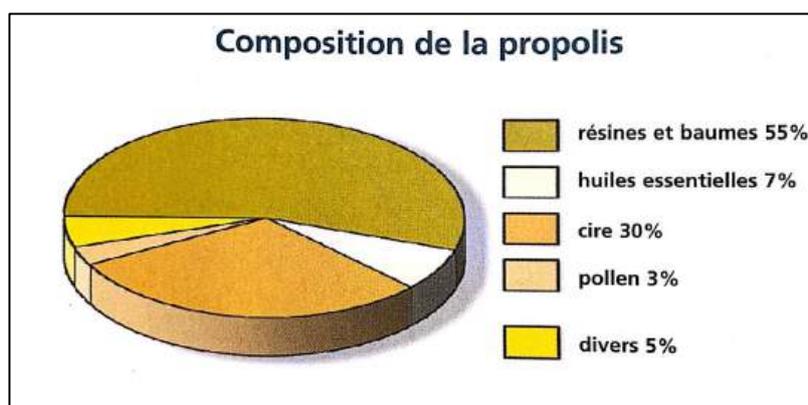


Figure 9 : Composition de la propolis

Le traité Rustica de l'apiculture, Henri Clément, 2015

b. Intérêts thérapeutiques

Les propriétés de la propolis, basées sur une utilisation traditionnelle et empirique, seraient des propriétés anti-infectieuses couramment utilisées dans le domaine de l'oto-rhino-laryngologie ainsi que des propriétés antiparasitaires, cicatrisantes et fongicides. Elle serait également efficace pour lutter contre la mauvaise haleine et la prolifération de bactéries dans la sphère buccale (9).

5. LA CIRE D'ABEILLE

a. Source, fabrication et composition

La cire est une substance blanche produite directement par les ouvrières via leurs glandes cirières en utilisant du miel ou du nectar comme matière première.

Elle est malaxée et transformée par les abeilles via les glandes mandibulaires pour obtenir la cire finale qui sera l'élément structural fondamental de la ruche. En effet, les abeilles vont ainsi construire les alvéoles hexagonales qui accueilleront le miel et le couvain.

Elle est majoritairement composée d'acides gras :

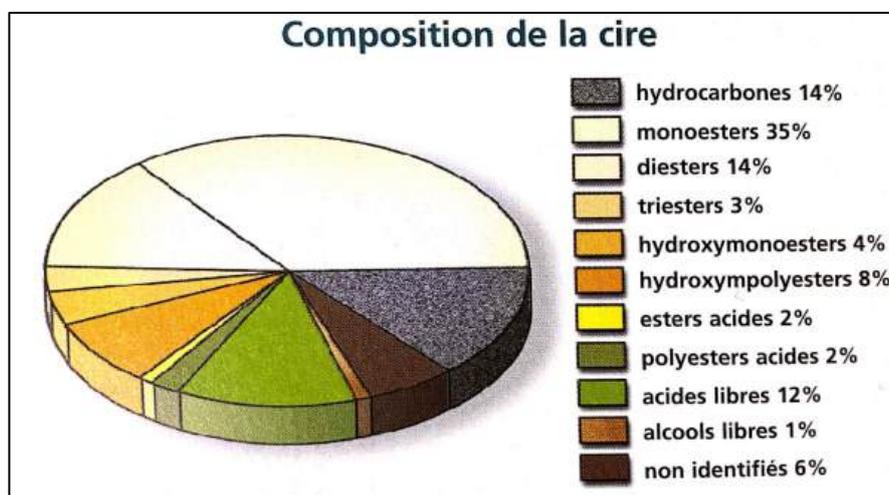


Figure 10 : Composition de la cire

Le traité Rustica de l'apiculture, Henri Clément, 2015

b. Intérêts thérapeutiques

Actuellement, la cire est un ingrédient couramment utilisé en cosmétologie. Associée à des corps gras, c'est un excipient qui joue un rôle d'épaississant. On la retrouve notamment dans la composition du cérat de Galien, un émollient utilisé depuis l'antiquité. La cire est retrouvée également dans l'enrobage de certains médicaments (10).

La cire sert aussi à fabriquer des bougies qui, en plus de l'odeur agréable, permettraient de faire fuir les insectes.

6. LE VENIN D'ABEILLE

a. Anatomie de l'appareil vulnérant

Le venin est la substance toxique présente dans la glande à venin des abeilles femelles uniquement et qui représente le mécanisme de défense de l'abeille. L'organe à l'origine de ce système de défense est appelé l'appareil vulnérant. Il s'agit chez l'abeille du résultat de l'évolution d'un organe reproducteur, l'oviscapte.

D'un point de vue anatomique, il est situé à proximité du rectum de l'abeille et est constitué de deux glandes : la glande de Dufour qui est une glande alcaline, et la glande acide. La glande alcaline sécrète les phéromones d'alerte et lubrifie l'aiguillon tandis que la glande acide est responsable de la toxicité. Les sécrétions de ces deux glandes rejoignent le sac à venin d'une capacité moyenne de 0,3 mg. Ces glandes ne fonctionneront qu'à partir du 2^{ème} jour de vie de l'abeille.

Cet appareil vulnérant se termine par l'aiguillon barbelé et venimeux qui fonctionne selon un mécanisme assez complexe et pointu. A la base de l'abdomen se trouve une cavité appelée chambre de l'aiguillon qui trouve son origine au niveau intra-abdominal.

L'appareil vulnérant se divise en deux parties :

- Le gorgeret formant la pointe à l'extrémité, il est creux et permet au dard de coulisser à l'intérieur.
- Les lancettes (une à gauche et une à droite) qu'on peut comparer à un harpon une fois le dard enfoncé dans la chair à cause de ses soies barbelées. Elles constituent le dard.

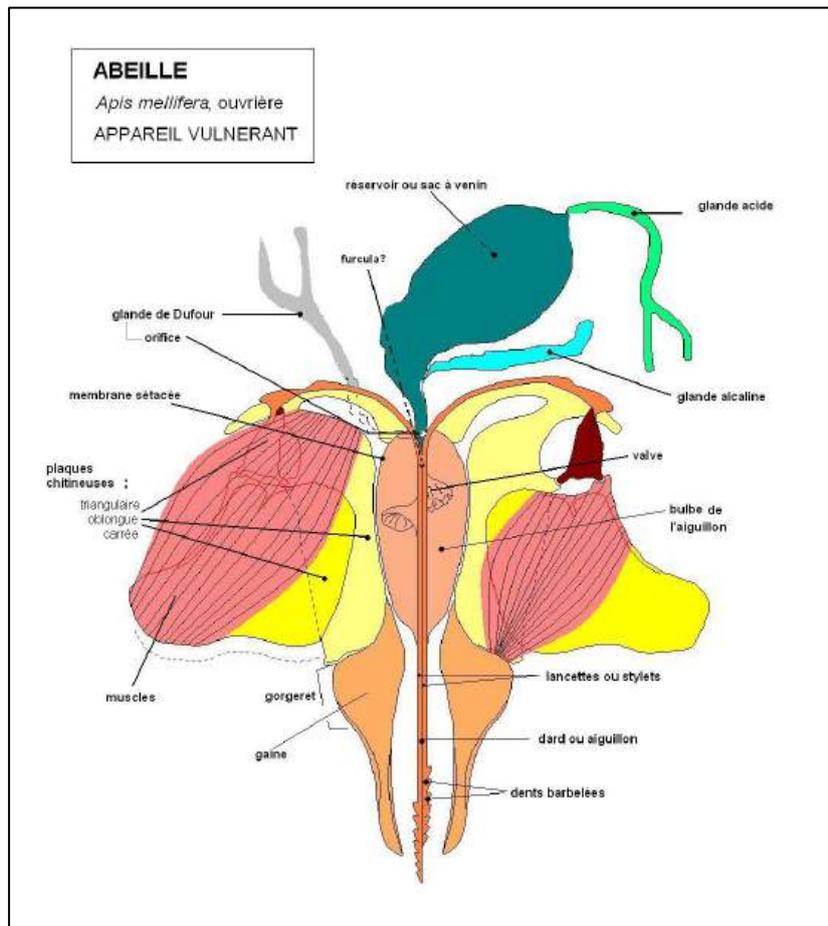


Figure 11 : Anatomie de l'appareil vulnérant

(11)

b. Mécanisme de la piqûre

Lors de la piqûre, le stylet ainsi que les lancettes vont pénétrer dans la peau en faisant une rotation dans le sens des aiguilles d'une montre ce qui va diminuer la force de pénétration.

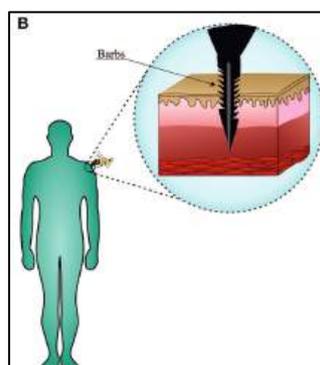


Figure 12 : Mécanisme de la piqûre

(12)

Cette structure est actionnée par l'appareil musculaire. En effet, quatre muscles permettent la rétraction et l'activation. Cependant, le retrait dans la peau d'un humain n'est pas possible du fait de la morphologie en harpon du dard qui l'empêche de s'extraire, arrachant ainsi l'abdomen de l'abeille ainsi que le sac à venin qui continuera de se déverser dans la peau.

Quand une abeille attaque et pique, elle va injecter entre 50 et 100 µg de venin (13) (14) (15) et 90% de cette quantité totale injecté en moins de 20 secondes. Une fois la piqûre faite et l'abdomen de l'abeille arraché, la poche à venin continue d'injecter de manière autonome le venin pendant au moins 30 secondes c'est pourquoi il est fortement conseillé de retirer le dard aussitôt sans comprimer la poche à venin.

Concernant la toxicité, on définit une concentration létale médiane qui est un indicateur mesurant la quantité de substance qui causerait la mort de 50% d'une population donnée après injection dans des conditions expérimentales. Pour le venin d'abeille, cette dose létale médiane est comprise entre 2,8 et 3,5 milligrammes de venin par kilogrammes de poids corporel chez l'homme (12).

c. Composition du venin

Le venin d'abeille est une substance de composition complexe, où presque chaque composant fait l'objet d'étude scientifique pour en définir l'intérêt thérapeutique depuis la fin du 19^{ème} siècle. Il s'agit d'une substance liquide, incolore, inodore, au pH acide (entre 4,5 et 5,5) et comprenant plus de 100 protéines et peptides. Il est constitué majoritairement d'eau (88%), la partie sèche du venin ne représente que 12% de la totalité du venin (16).

La partie d'intérêt comprends principalement :

- Des **peptides** dont la melittine qui est le composant le plus important (50 à 60% de la partie sèche), l'adolapine, l'apamine, le MCD-peptide (Mast Cell Degranulated peptide).
- Des **enzymes** dont la phospholipase A2 qui est le deuxième composant le plus important (10 à 12% de la partie sèche) et la hyaluronidase A2.
- Des **amines bioactives** dont l'histamine, la dopamine et la noradrénaline.

En quantité moindre, on retrouve dans le venin des composés volatiles, des phospholipides, des sucres ainsi que des phéromones (17).

Dried bee venom composition.			
Molecular group	Component	MW	Percent in dry venom
Enzymes	Phospholipase A2	19,000	10–12
	Phospholipase B		1
	Hyaluronidase	38,000	1.5–2
	Acid phosphomonoesterase	55,000	1
	α - Glucosidase	170,000	0.6
	Phosphatase		1
	Lysophospholipase		1
Peptides	Melittin	2840	40–50
	Apamine	2036	2–3
	MCD	2588	2–3
	Secapine	3000	0.5–2
	Pamine		1–3
	Minimine	6000	2–3
	Adolapine	11,500	1
	Procamine A, B	600	1.4
	Protease inhibitor	9000	<0.8
	Tertiapine	2500	0.1
	Cardiopep	2500	<0.7
	Melittin F		0.01
	Phospholipids		700
Amines	Histamine	307.14	1.5
	Dopamine	189.64	0.13–1
	Noradrenalin	169.18	0.1–0.7
	Neurotransmitters		0.1–1
Amino acids	γ -aminobutyric acid	189.64	0.13–1
	α -amino acids	169.18	0.1–0.7
Carbohydrates	Glucose	180	2–4
	Fructose		
Pheromones	Iso-pentyl acetate; n-butyl acetate; iso-pentanol; n-hexyl acetate; n-octyl acetate; 2-nonanol; n-decyl acetate; benzyl acetate; benzyl alcohol; (2)-11-eicosen-1-ol	200	4–8

Figure 13 : Composition du venin déshydraté

Bee Venom: An Updating Review of Its Bioactive Molecules and Its Health Applications, Carpena et al, 2020

d. Récolte

La récolte de venin d'abeille est complexe du fait de la petite quantité présente dans la poche à venin d'une abeille, s'ajoutant la nécessité pour l'abeille de piquer une surface pour l'extraire naturellement. Le but de la récolte est de préserver l'abeille lors de l'extraction tout en puisant la plus grande quantité de venin possible.

Dans un premier temps, les chercheurs ont essayé de retirer le venin chirurgicalement mais cette méthode a vite été abandonnée. C'est au début des années 1960 qu'une nouvelle méthode est proposée : la solution trouvée par les scientifiques Markovic et Molnar fut de stimuler les abeilles via des chocs électriques pour déclencher le réflexe de défense de l'abeille, provoquant ainsi la sortie du venin. C'est aujourd'hui la méthode standard de récolte.

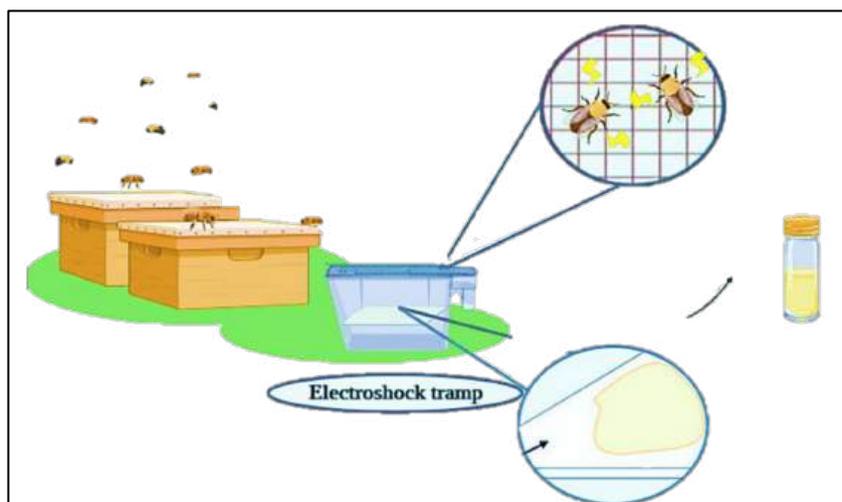


Figure 14 : Récolte du venin par électrostimulation

Bee Venom: An Updating Review of Its Bioactive Molecules and Its Health Applications, Carpena et al, 2020

(17)

Elle a été modifiée et approfondie pour aboutir à une standardisation par le scientifique Galuszka : il recommande de soumettre les abeilles à des chocs électriques pendant quinze minutes à trois jours d'intervalle puis de renouveler l'opération deux puis trois semaines après. Cette fréquence de récolte permet d'augmenter la production de venin au fil des semaines tout en préservant la ruche (18).

Le collecteur est composé d'une plaque en verre surmontée de fil de fer placés parallèlement à six millimètres d'intervalle. Il est conseillé d'appliquer une tension d'environ 33 volts et ensuite de l'adapter en fonction de la récolte (18). Le collecteur se positionne au niveau de la planche d'envol de la ruche de sorte que les abeilles puissent s'y déplacer intuitivement.

Lorsque les abeilles parcourent les fils, elles reçoivent un choc électrique qui provoque un réflexe de défense et libèrent alors une larme de venin qui se déposera sur le réceptacle en verre situé juste en dessous.

La substance toxique va sécher très rapidement et sera alors récupérée sous forme de poudre. L'apiculteur n'aura plus qu'à racler le verre pour récolter le venin déshydraté. Il est conseillé de le conserver au congélateur dans des bocaux opaques pour éviter toute dégradation par la lumière ou la chaleur.



Figure 15 : Collecteur de venin

<https://www.amazon.fr/BeeWhisper-Bee-Venom-Collector/dp/B07HKFSNFV>

Cette méthode largement répandue épargne les abeilles car aucun dard n'est arraché, cependant, la stimulation électrique rend la colonie très agressive et stressée.

e. Propriétés biologiques et perspectives thérapeutiques

L'utilisation du venin d'abeille en thérapeutique se base principalement sur l'empirisme, il n'existe pas ou peu actuellement de recommandations officielles. Cependant, l'usage traditionnel de cette substance depuis des décennies nous amène à regarder de plus près ses diverses propriétés.

Historiquement, les premières personnes à faire le lien entre le venin d'abeille et la thérapie sont les apiculteurs qui remarquaient une diminution de leurs douleurs rhumatismales au niveau des mains après des piqûres à répétition. Charlemagne s'en serait même servi pour traiter ses accès de goutte mais les premières expériences scientifiques remontent à 1914 lorsqu'un médecin et apiculteur autrichien du nom de Terc utilisera le venin pour traiter ses propres rhumatismes ainsi que ceux de ses patients pendant plusieurs années (19).

Initialement, le venin d'abeille à faible dose est indiqué dans les pathologies inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde, sclérose en plaques et plus récemment la dermatite atopique) pour traiter l'inflammation chronique ainsi que les pics de douleur. C'est majoritairement la melittine qui est responsable de l'activité anti-inflammatoire, que nous approfondirons ultérieurement (20).

Le venin a également des propriétés anti-oxydantes par l'inhibition de la peroxydation des lipides et par l'augmentation de l'activité de la superoxydase dismutase qui convertit les radicaux libres O₂ en H₂O₂. Ce sont la melittine, l'apamine et la phospholipase A₂ qui en sont responsables.

On note des propriétés antimicrobiennes via la melittine qui aurait une action sur la membrane bactérienne et l'enveloppe virale. La phospholipase A₂ aurait également une activité antiparasitaire notamment sur *plasmodium falciparum* et *trypanosoma brucei brucei* (17).

Enfin, les recherches actuelles se tournent vers les propriétés anti-cancéreuses du venin et surtout de la melittine car c'est le composant qui a le plus fort potentiel cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales. C'est principalement l'activité d'induction de l'apoptose ainsi que l'inhibition de la croissance tumorale qui sont étudiées.

f. Réactions à la piqûre d'abeille

Outre ces propriétés très intéressantes, le venin est avant tout le fruit du mécanisme de défense de l'abeille et il a pour but d'éloigner les ennemis potentiels de la ruche. C'est pourquoi il déclenche chez la cible des effets néfastes.

En cas d'exposition rapide et ponctuelle au venin d'abeille à la suite d'une piqûre, la réaction allergique entraînera la production d'IgG1 et d'IgG2 mais chez un apiculteur qui se fait piquer régulièrement, alors il aura une réponse immunitaire que l'on appelle humorale avec la production d'IgG4. Les personnes allergiques au venin déclenchent une réaction d'hypersensibilité de type I, autrement dit l'allergie immédiate. Ce type de réaction concerne des personnes qui ont un terrain allergique, ou terrain atopique, et entraîne la production d'IgE spécifiques (21).

En cas de piqûre chez l'homme, le venin peut donc entraîner différentes réactions de gravité croissante, cela dépend du nombre de piqûre, du niveau de sensibilité de la personne ainsi que son âge, son poids, et ses comorbidités.

On peut classer les réactions en trois grades de sévérité croissante :

- **La réaction inflammatoire locale** : les symptômes seront principalement une douleur vive, un oedème, une rougeur associée à une démangeaison.
- **La réaction toxique** : les symptômes seront les mêmes que la réaction locale mais ils peuvent s'accompagner de troubles tels qu'une diarrhée, des vomissements, et une hypotension.
- **Le choc anaphylactique** : cette réaction allergique grave ne dépend pas du nombre de piqûre, c'est une situation d'urgence qui peut entraîner un décès sans prise en charge immédiate.

Lors d'une piqure dans la peau, le dard atteindra le tissu conjonctif mais si la piqûre se situe dans une muqueuse ou au niveau de l'œil, là où la vascularisation est plus importante, la réaction sera d'autant plus rapide.

La prise en charge dépend du degré de gravité de la réaction. Il faut dans un premier temps retirer le dard avec un objet plat type carte de crédit ou bord non tranchant d'un couteau afin d'éviter de presser la poche à venin.

Pour une simple piqûre provoquant une petite réaction locale, on préconise dans un premier temps de désinfecter puis d'appliquer une crème apaisante, avec ou sans cortisone, afin de freiner la réaction inflammatoire et donc la démangeaison et le gonflement.

Si la réaction est plus importante, un traitement par voie orale à base d'antihistaminique pourra s'ajouter au traitement local.

En cas de gonflements trop importants, de signes cliniques plus inquiétants ou selon la localisation (gorge, œil, langue...), il est conseillé d'aller directement aux urgences ou de consulter très rapidement un médecin.

g. Immunothérapie au venin d'abeille

Le seul traitement possible pour lutter contre des réactions allergiques graves chez les personnes sensibles aux piqûres d'abeille est l'immunothérapie, c'est à dire l'utilisation de venin à des doses thérapeutiques aboutissant à une désensibilisation du système immunitaire. On se base généralement sur l'anamnèse pour déterminer si une personne est éligible à ce type de traitement puis sur des tests cutanés et des dosages des IgE dans le sang.

Il existe différents protocoles, plus ou moins longs, que l'on appelle « rush » pour le plus rapide et « conventionnel » pour le protocole classique dans lesquels on administre, par voie sous-cutanée, une quantité de venin pendant une durée déterminée en respectant un intervalle entre chaque dose d'entretien (100 µg de venin). A savoir que cette dose correspond à la quantité de venin reçue lors de deux piqûres d'abeille (22).

h. L'utilisation des toxines animales en médecine

Historiquement, les médicaments issus des animaux ont toujours suscité un intérêt dans la recherche en cancérologie, majoritairement dans les pays asiatiques. La toxicité des venins d'insecte est la source de nombreux principes actifs présents dans la composition de certains médicaments, et il en existe à ce jour six sur le marché (hors cancérologie) et de nombreuses molécules sont en face d'essai cliniques :

- Bivalirudine (ANGIOX®) : Anticoagulant, inhibiteur de la thrombine. Il dérive de la sécrétion salivaire des sangsues.
- Exénatide (BYETTA®) : Antidiabétique, analogue des incrétines. Il provient d'une protéine isolée à partir de la salive d'un lézard.
- Captopril (LOPRIL®) : Antihypertenseur, inhibiteur de l'enzyme de conversion. Il dérive du venin d'une vipère brésilienne.
- Ziconotide (PRIALT®) : Analgésique, anit-glutamatergique par inhibiteur des canaux calciques. Il est issu d'un escargot marin.
- Tirofiban (AGRASTAT®) : Antiagrégant plaquettaire, inhibiteur de la glycoprotéine IIB/IIIA. Il provient du venin d'une vipère indienne.
- Eptifibatide (INTEGRILIN ®) : Antiagrégant plaquettaire, inhibiteur de la glycoprotéine IIB/IIIA. Il est extrait à partir d'un venin de crotal (23).

La limite à ces recherches se trouve dans la difficulté d'extraction, de purification et d'isolement de la molécule cible. Malgré les avancées technologiques, la rareté de certains animaux freine les recherches bien que les médicaments actuellement sur le marché ne contiennent pas directement la toxine mais bien des principes actifs synthétisés en laboratoire. La quantité produite par les animaux serait trop infime à l'échelle de l'industrie mondiale.

De plus, les délais pour arriver à une éventuelle mise sur le marché sont très longs et les coûts considérables.

Par ailleurs, on estime à plusieurs milliers le nombre de toxines potentiellement exploitables, ce qui ouvre le champ des possibles en matière de recherche médicale, et qui nous sensibilise aussi à l'importance de la protection de la biodiversité animale pour espérer soigner les hommes.

PARTIE 2 :

LA MELITTINE : INTÉRÊT EN
CANCÉROLOGIE ET AUTRES DOMAINES
THÉRAPEUTIQUES

I. Rappels d'oncologie

1. DÉFINITION DU CANCER

D'après Jacques Robert, « les cancers sont des néoformations de cellules prolifératrices et envahissantes, acquérant une autonomie biologique par rapport à l'organisme » (24).

Le point de départ du cancer est l'instabilité génomique d'une cellule qui engendre une perturbation des voies de signalisation et des mécanismes biochimiques, pour aboutir à une dissémination anarchique des cellules. Les gènes responsables de cette dérégulation sont appelés des oncogènes. Ils sont présents dans les organes ou les tissus et ils codent pour des oncoprotéines, qui seront alors les protéines du phénotype de la cellule cancéreuse. L'accumulation de ces altérations génomiques aboutit in fine au stade métastatique.

Parallèlement, on a identifié des anti-oncogènes, qui sont des gènes suppresseurs de tumeurs. Ils vont, à l'inverse des oncogènes, ralentir la division cellulaire et la prolifération. Ces gènes subissent des mutations activatrices ou inhibitrices. Leurs fonctions seront donc exacerbées ou limitées pour aboutir à une progression de la tumeur.

La cellule cancéreuse est très invasive, et elle va essayer de s'approprier l'homéostasie du corps pour en tirer profit et se multiplier. Elle va ainsi détourner les voies de la signalisation cellulaire pour migrer, proliférer, se différencier et survivre.

2. ÉTAT DES LIEUX ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET PRISE EN CHARGE ACTUELLE DES CANCERS

D'après l'OMS, le cancer est la deuxième cause de mortalité dans le monde en 2020. Il représente environ un décès sur six. Il s'agit d'un enjeu majeur pour la santé mais c'est aussi un enjeu économique considérable et en constante augmentation.

En France, il s'agit de la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme.

Le cancer le plus répandu en 2020 est le cancer du sein avec un incidence de 2,26 millions de cas suivi du cancer du poumon et du cancer colorectal.

Le nombre de nouveaux cas augmente avec l'âge mais aussi avec l'addition de facteur de risques tels que le tabagisme, l'alcool, le manque d'activité physique ou l'alimentation. L'incidence est plus élevée chez l'homme que chez la femme.

Il existe actuellement plusieurs protocoles visant à soigner le cancer (radiothérapie, chirurgie, chimiothérapie, thérapie ciblée). Ils sont plus ou moins spécifiques et la recherche en oncologie ne cesse de s'intensifier.

Actuellement, le taux de guérison dépend du type de cancer et de la précocité du diagnostic (25). Ces dernières années, les scientifiques s'orientent vers de nouvelles stratégies et les recherches actuelles se multiplient autour du venin d'abeille, une source à matière première attrayante pour l'oncologie.

3. LES VOIES DE SIGNALISATION

a. La voie NF- κ B

Le NF- κ B est un complexe de facteurs de transcription, participant au processus d'inflammation, à la réponse immunitaire, à la prolifération cellulaire et enfin au processus anti-apoptotique.

Le NF- κ B est un hétérodimère comprenant un facteur NF- κ B et un facteur REL. Sa formation est médiée par plusieurs voies de signalisation cellulaire : la voie des TNF (tumor necrosis factors), la voie RANKL, la voie des kinases AKT, la voie des TLR, et la voie des lymphocytes B. Pour être transloqué dans le noyau, sa protéine inhibitrice I κ B doit être phosphorylée dans le cytoplasme pour accéder au protéasome après ubiquitinylation et aboutir au complexe NF- κ B. Cette cascade de phosphorylation est déclenchée par la fixation de plusieurs ligands tels que le TNF- α ou l'interleukine 1 sur leur récepteur respectif. Dans le noyau, le NF- κ B va transcrire des gènes anti-apoptotiques.

Il s'agit d'une cible potentielle pour les traitements des cancers car il est anormalement actif lorsqu'il est impliqué dans certains cancers (26). Son inhibition pourrait contribuer au freinage de la progression des cancers en empêchant l'annulation de l'apoptose normalement induite par le TNF- α .

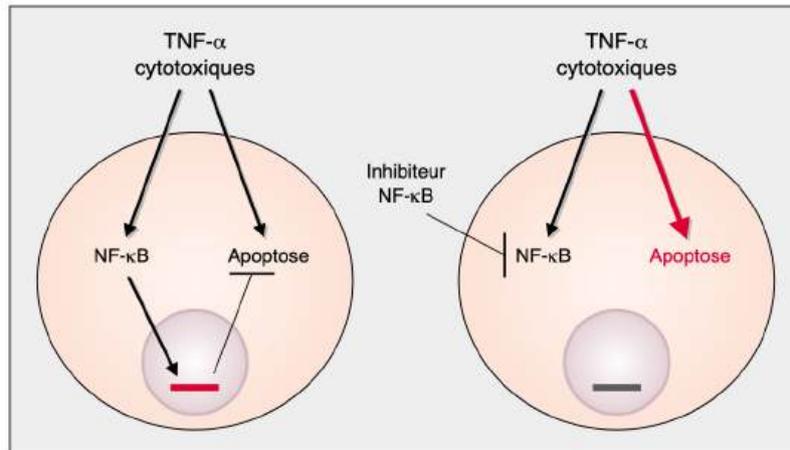


Figure 16 : Rôle du TNF dans la voie NF- κ B

https://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/1094/1998_5_566.pdf?sequence=5

b. La voie Ras/MAPK

La voie RAS/MAPK, autrement dit la voie des MAP kinases est une voie de signalisation intracellulaire impliquée dans la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire, et l'angiogenèse (27). Elle est la cible de nombreuses recherches en oncologie car elle active de nombreux facteurs de transcriptions impliqués dans la réplication de l'ADN (28).

Cette voie est activée dans presque 1 cancer sur 2 (24). Son activation débute pour la fixation d'un ligand, tel qu'un facteur de croissance ou une cytokine, à un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase (EGFR, HER2, FGFR, IGFR, PDGFR).

Ce récepteur va s'auto-phosphoryler et déclencher une cascade de phosphorylation d'autres kinases. Ensuite, des protéines dites adaptatrices vont repérer l'activation du récepteur et coupler le récepteur à la protéine RAS qui est une protéine à activité GTPasique. L'échange GDP-GTP par les facteurs d'échange GEF va changer la conformation de RAS et cette dernière va pouvoir activer la protéine RAF.

La suite de la cascade est l'activation d'une protéine MEK, puis d'une protéine ERK par phosphorylation pour aboutir à l'activation d'un facteur de transcription dans le noyau de la cellule. RAS représente un carrefour important dans les voies de signalisation et ses mutations sont fréquemment retrouvées dans les cancers (24).

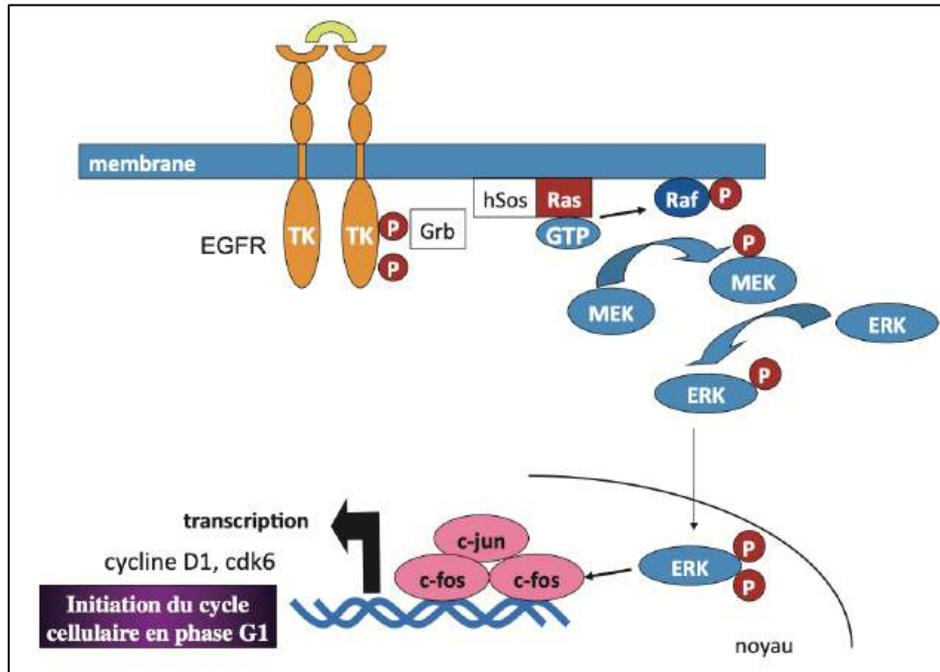


Figure 17 : Voie de signalisation RAS

La voie de signalisation RAS/MAPK, Lièvre et Laurent, 2010

(29)

c. La voie PI3K/AKT

La voie de la PI3 kinase fonctionne parallèlement à celle des MAP kinases. Elle est également fréquemment altérée lors des cancers et est donc une cible intéressante en oncologie. En effet, elle est impliquée dans la prolifération, la différenciation et la survie des cellules.

La PI3 kinase est étroitement liée à la voie des MAP kinases car elle peut être activée par la protéine RAS mais dans la voie classique, la cascade commence par l'activation d'un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase après la fixation d'un facteur de croissance. La PI3 kinase va ensuite phosphoryler un lipide membranaire et cette phosphorylation va permettre le recrutement de deux protéines kinases, PDK1 et AKT, à la membrane.

C'est la protéine AKT, phosphorylée par PDK1, qui va activer ou inhiber un grand nombre de protéines par phosphorylation (28), notamment MTOR qui favorise la survie cellulaire et la croissance cellulaire en régulant la traduction de la synthèse protéique (30).

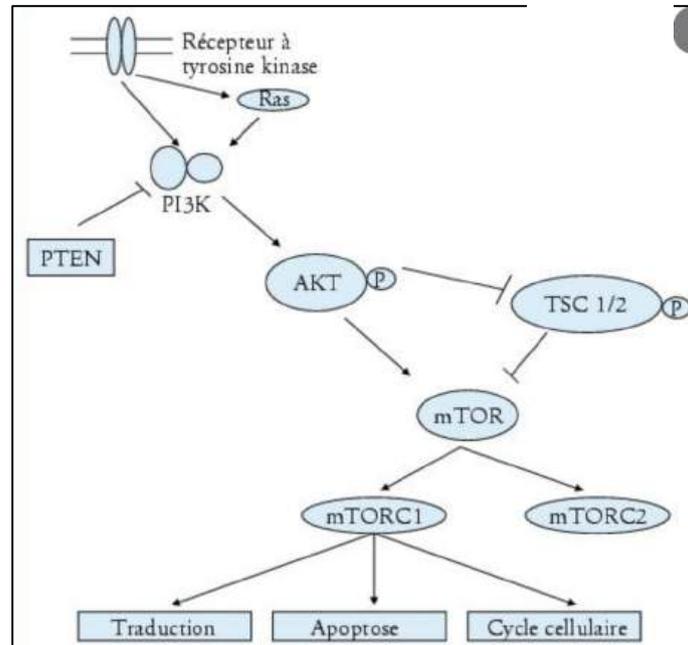


Figure 18 : Voie de signalisation PI3K/AKT

https://www.jle.com/fr/revues/bdc/e-docs/actualites_sur_la_voie_mtor_et_ses_inhibiteurs_279992/article.phtml

d. La voie JAK/STAT

Dans cette voie de signalisation, ce sont des cytokines qui activent les récepteurs à activité tyrosine kinase. Ces récepteurs sont couplés à une protéine kinase JAK. Une fois son autophosphorylation, JAK va se dimériser et va activer des facteurs de croissance nommés STAT qui seront recrutés à la membrane.

Les STAT vont ainsi jouer leur rôle de facteur de transcription après migration dans le noyau en stimulant des gènes d'intérêt pour la différenciation, la prolifération, et le développement cellulaire. Par ailleurs, JAK stimule aussi l'activation de la voie des MAP kinases et la voie du PI3K (31).

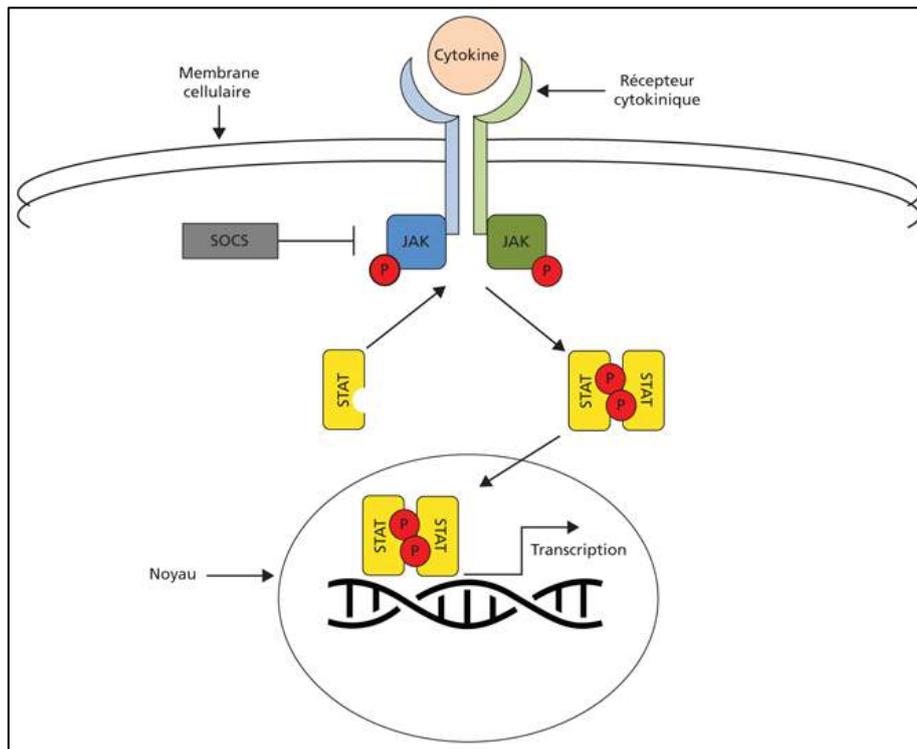


Figure 19 : Voie de signalisation JAK/STAT

https://www.google.com/url?sa=i&url=http%3A%2F%2Fwww.jle.com%2Ffr%2Frevues%2Fhpg%2Fdocs%2Fimplication_de_la_voie_jak_stat_dans_la_pathogenie_des_maladies_inflammatoires_chroniques_de_lintestin_315464%2Farticle.phtml%3Ftab%3Dimages&psig=AOvAw2ONUNbUOKFIWJv3A_MiZ-&ust=163359322592000&source=images&cd=vfe&ved=0CAsQjRxqFwoTCiB0ZOntfMCFQAAAAAdAAAAABAD

e. La voie de la calmoduline

L'ion calcium (Ca^{2+}) est indispensable dans la vie cellulaire. Il joue un rôle de messenger secondaire dans la signalisation. Le calcium se lie à de nombreuses protéines dans le cytoplasme lorsqu'il sort des réserves du réticulum endoplasmique ou qu'il provient du milieu extracellulaire, en particulier la calmoduline qui va changer de conformation une fois liée au calcium. La calmoduline piège le calcium et joue un rôle de tampon.

Ce complexe Ca^{2+} -CaM va avoir plusieurs rôles notamment dans la contraction musculaire mais ce qui nous intéresse surtout c'est son rôle dans l'interaction entre les voies de signalisation cellulaires qui activent la prolifération et la différenciation cellulaire (28). Le complexe peut aussi stimuler l'angiogenèse via le facteur de transcription HIF-1. Ce facteur contrôle l'expression du VEGF et ainsi augmenter l'angiogenèse, ce qui est défavorable en cas de tumeur.

Ce complexe est donc une cible intéressante notamment pour freiner l'angiogenèse en inhibant les cascades de signalisation qu'il engendre.

4. VUE D'ENSEMBLE DES CIBLES POTENTIELLES DU VENIN D'ABEILLE

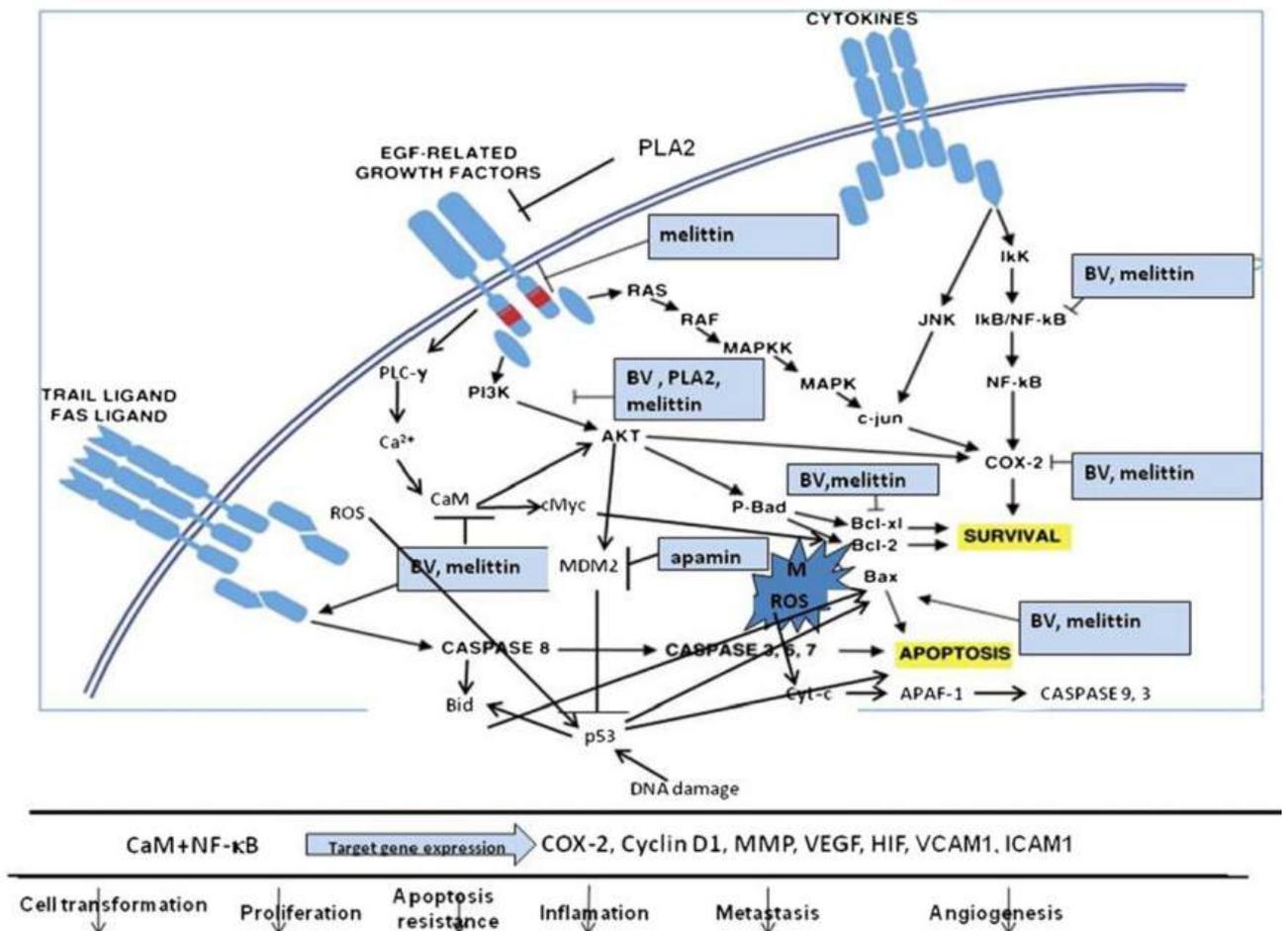


Figure 20 : Cibles potentielles de la melittine

(32)

Cette figure montre le champ d'action du venin d'abeille pour lutter contre la cancérogénèse. Les composants du venin peuvent cibler différentes voies de signalisation en les inhibant ou en les activant pour induire l'apoptose ou bloquer l'angiogenèse et la prolifération cellulaire. Nous avons décrit précédemment que ces voies de signalisation sont activées via des récepteurs membranaires. Ils sont ainsi une cible potentielle pour le venin car ce dernier va venir bloquer la phosphorylation de ces récepteurs ou directement les altérer.

Cela va avoir un impact sur les voies de signalisation qui en découlent. Le venin peut aussi produire des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) qui vont indirectement, via la protéine p53, agir sur le cycle cellulaire en le stoppant, induisant par conséquent l'apoptose. Nous détaillerons ultérieurement les mécanismes pharmacologiques du venin d'abeille et plus précisément de la melittine impliqués dans chaque voie de signalisation cellulaire (32).

II. La melittine

La melittine est le principal composant du venin d'abeille, d'autant par sa quantité ; la moitié du venin déshydraté est composée de melittine ; que par ses propriétés multiples. C'est ainsi qu'elle suscite l'intérêt de nombreux scientifiques. Dans cette partie, nous allons décrire de la manière la plus exhaustive possible cette protéine et ses diverses propriétés anti-tumorales.

1. BIOSYNTHÈSE DE LA MELITTINE

Lorsque l'abeille synthétise la melittine, elle n'est pas directement active. Elle synthétise d'abord un précurseur, la promelittine, qui sera ensuite activée par clivage protéolytique (33).

Une étude menée par l'institut de biologie moléculaire de Vienne a permis de décrire cette synthèse dans la glande à venin. Dans cette étude, on a étudié la synthèse de la melittine en donnant aux abeilles des acides aminés radiomarqués. Le radiomarquage sera donc détecté en premier lieu dans le précurseur, la promelittine, puis dans la melittine. Dans cette expérience, le radiomarqueur est la leucine marquée au tritium et les quantités de promelittine et de melittine ont été déduites par chromatographie.

Premièrement, l'étude confirme que la production de venin et donc de melittine se produit lorsque les abeilles sont âgées d'environ huit jours, avec un pic au dixième jour, puis les quantités diminuent.

Cette étude a mis en évidence le fait que la quantité de promelittine n'est pas proportionnelle à la quantité de melittine. Cela est notamment dû à l'âge de l'abeille.

On relèvera aussi que ce processus n'est pas identique chez la reine, il est accéléré car la glande à venin d'une reine est mature et efficace bien avant celui d'une ouvrière. Par conséquent, chez la reine, il y a une synthèse plus rapide de la melittine, ce qui corrèle avec le besoin vital de se défendre en cas de combat de reine de la colonie. (34)

2. STRUCTURE CHIMIQUE

La melittine est une protéine constituée d'un enchainement de vingt-six acides aminés. Elle a pour formule chimique $C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$. Sa structure a été découverte par la méthode de la résonance magnétique nucléaire il y a environ 40 ans (35). C'est une protéine basique, amphotère, et hémolytique (33).

En effet, les vingt premiers acides aminés du côté N-ter (de la glycine à l'isoleucine) sont hydrophobes et les six derniers acides aminés du côté C-ter sont hydrophiles (de la lysine à la glutamine) et responsable de l'activité lytique. Elle est retrouvée sous forme d'homotétramère en milieu biologique. Sa masse atomique est de 2847,5 Da. Il s'agit d'un peptide considéré comme court avec la séquence d'acides aminés suivante :

Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln (36).

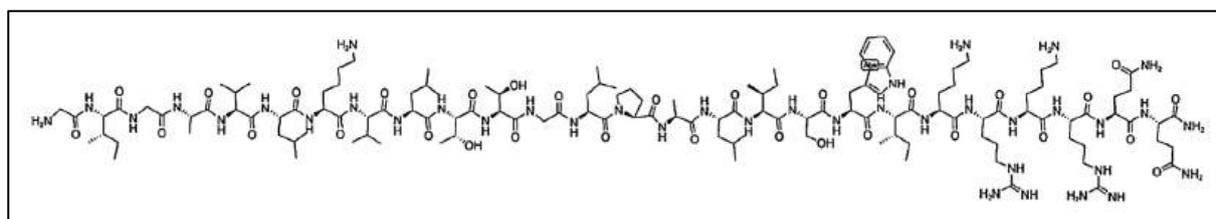


Figure 21 : Structure chimique de la melittine

(37)

On retrouve un groupement NH_2 en position N-terminale et un groupement $CONH_2$ en position C-terminale. Les chaînes de la melittine sont structurées en deux segments hélicoïdaux prenant la forme d'une tige coudée. C'est sous sa structure secondaire hélicoïdale que la melittine se lie aux molécules et aux membranes (38).

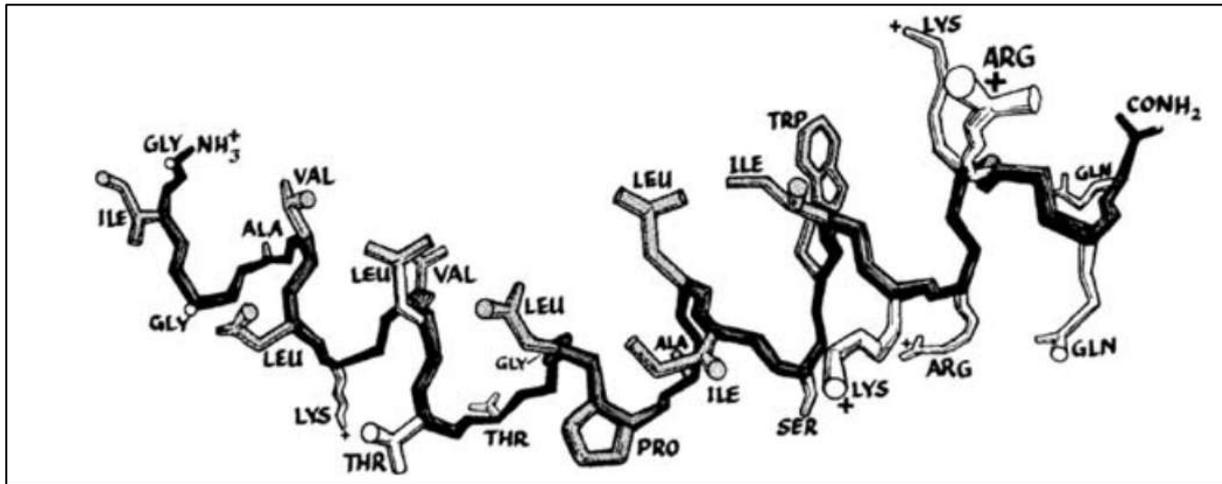


Figure 22 : Structure quaternaire de la melittine

(33)

Même si la majorité des acides aminés présents dans la melittine sont hydrophobes, elle reste une protéine amphiphile par le biais de l'asymétrie de sa structure hélicoïdale.

3. ACTION DE LA MELITTINE SUR LES MEMBRANES

La majorité des acides aminés étant hydrophiles, la melittine est soluble en milieu aqueux mais sa partie hydrophobe lui confère la possibilité de s'immiscer au sein des structures bi-lipidiques des membranes cellulaires et d'en perturber l'organisation.

En effet, en s'insérant dans la membrane de cellules eucaryotes et procaryotes, la melittine, sous forme de tétramère, forme des pores non définitifs permettant le passage d'ions, voire de molécules plus importantes comme le glucose, à travers la membrane.

Elle est ainsi considérée comme détergente, avec une tension superficielle élevée (37)(20). L'insertion dans la membrane est complexe et pas encore totalement élucidée mais une étude réalisée par Huang et al. explique le phénomène selon lequel la melittine s'insère dans la membrane de façon verticale et en s'insérant, la première couche lipidique forme des plis vers l'intérieur de la cellule de façon à ce que le pore formé soit entouré de melittine et de la partie hydrophile d'un phospholipide (autrement dit la tête lipidique) (39).

A noter que l'insertion d'une protéine au sein d'une membrane est décomposée en deux étapes : la liaison à la membrane puis l'insertion au sein de la bicouche lipidique, et que ces deux phases dépendent principalement de la quantité de peptide et de la composition lipidique de la membrane en cause. Ainsi, une grande quantité de peptide rend l'insertion membranaire plus facile (39).

Des simulations informatiques ont permis de décrire qu'il fallait un minimum de trois molécules de melittine pour aboutir à l'insertion dans la membrane. Lors de la phase de liaison et d'insertion, la melittine se positionnerait en forme de « U » afin d'en faciliter le passage et la création d'un pore, quelle qu'en soit la composition lipidique de la membrane sélectionnée par la protéine (39).

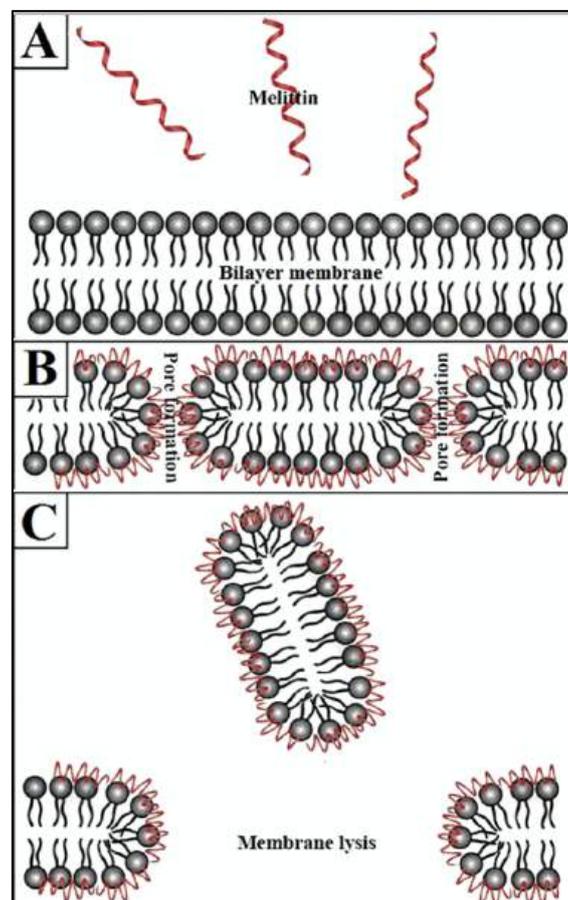


Figure 22 : Perturbation membranaire par la melittine

(40)

Son action sur les membranes n'est pas sélective, ce qui rend la melittine d'autant plus toxique car elle attaque toutes les membranes.

Cependant, cette absence de sélectivité est un avantage en thérapeutique et actuellement, son action serait démontrée sur certaines cellules notamment les lymphocytes, les érythrocytes, les thymocytes et les cellules intestinales (37).

Le rôle majeur de la melittine au niveau des membranes est un rôle hémolytique ciblant les érythrocytes. En effet, en s'insérant dans les membranes des globules rouges, la melittine va engendrer la libération d'hémoglobine dans le milieu extracellulaire (41) et ainsi la destruction de la cellule. La melittine a donc pour action première, après une piqûre et donc sur une zone où elle est fortement concentrée, de lyser les membres cellulaires des tissus alentours et ainsi provoquer une sensation de douleur chez le prédateur de l'abeille. Cette toxicité est donc dépendante de la quantité de melittine et peut être mortelle à fort dose. (42)

A noter que la melittine a servi et sert encore de modèle pour étudier les interactions entre les lipides et les protéines au sein des membranes, c'est une petite protéine, pratique à exploiter en recherche (33). Le seul frein à son utilisation est lié à la présence de phospholipase A2 dans le venin d'abeille, qui peut persister sous forme de trace lorsqu'on extrait la melittine pour l'étudier. La melittine, sans purification de l'enzyme, garde alors une activité phospholipase, source d'artefacts. C'est pourquoi il est fréquent d'utiliser des tampons avec de l'EDTA pour neutraliser toute action de la phospholipase lors des expériences (36).

Actuellement, des chercheurs évoquent l'utilisation des nanotechnologies pour améliorer la perforation de la membrane par la melittine. Les nanomatériaux permettraient d'augmenter la vitesse de poration tout en s'affranchissant de la barrière du rapport peptide/lipide qui peut freiner l'insertion (39).

4. PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES

Bien que le principal mécanisme d'action de la melittine soit son interaction avec les membranes, cette dernière interagit également avec un certain nombre de protéines impliquées dans des voies de signalisation cellulaires. En découleront des propriétés diverses et fondamentalement intéressantes pour la recherche, notamment en oncologie, en bactériologie et dans le traitement de la douleur inflammatoire.

a. Propriétés anticancéreuses

Aujourd'hui, de nombreuses études démontrent une activité antiproliférative et pro-apoptotique de la melittine par inhibition de la croissance des cellules cancéreuses et de la formation de métastases.

Premièrement, la melittine joue un rôle aux seins des voies de signalisation du cancer, en stimulant des enzymes notamment les phospholipase C et D, la protéine kinase C, l'adényl-cyclase. Au niveau des protéines G, la melittine inhibe l'action des protéines Gs qui sont stimulantes et donc freine l'interaction du GTP et du GDP pour la protéine Gs. Parallèlement, elle stimule l'activité des protéines Gi, inhibitrices.

Ensuite, des travaux montrent que les voies de signalisation cellulaires sont une des cibles de la melittine. Parmi elles, nous avons la voie NF- κ B, la voie RAS/MAPK, la voie PI3/AKT, la voie JAK/STAT et la voie de la calmoduline, toutes décrites de manière plus approfondie en amont. Dans un contexte de tumeur, ces voies de signalisation seront inhibées ou au contraire amplifiées par le biais de l'activation anarchique de leurs récepteurs, déclenchant des cascades de signalisation. La melittine va intervenir de façon à freiner la cancérogenèse en empêchant l'activation de ces récepteurs par déphosphorylation ou bien en les neutralisant.

Au niveau du complexe Ca^{2+} /calmoduline, une étude de l'université du Maryland explique que la melittine a une haute affinité pour la calmoduline, qui a un rôle déterminant dans la prolifération. La formation d'un complexe melittine/calmoduline est responsable d'un changement de conformation de la calmoduline. En présence de calcium, la melittine modifie la structure hélicoïdale en reliant les terminaisons N et C-terminales de la calmoduline (42), engendrant une perturbation des cascades enzymatiques en aval, et donc une inhibition de la prolifération cellulaire.

Concernant la voie PI3/AKT/mTor, qui régule aussi la prolifération et l'invasion cellulaire, la melittine intervient en empêchant la phosphorylation des molécules de cette voie de signalisation. D'après une étude de Lim et al. sur des cellules de mélanome, qui utilisait la méthode du western-blot pour montrer la diminution de l'activation par phosphorylation de PI3K, AKT, mTor, ERK et p38 en présence de melittine (43), on en conclut qu'en inhibant cette voie, la melittine déclenche l'apoptose.

C'est à partir d'une étude sur des cellules de cancer ovarien réalisée par Jo et al. que nous allons détailler l'action de la melittine sur la voie JAK/STAT. Lorsque la protéine STAT est phosphorylée, cela engendre une cascade de signalisation qui stimule la prolifération des cellules cancéreuses. En présence de melittine, l'expression de STAT et de JAK est diminuée, la melittine exerce donc son effet pro-apoptotique (43).

Pour la voie NF- κ B qui est une voie anti-apoptotique, la melittine va intervenir via une régulation négative ce qui aura pour conséquence de diminuer l'expression des gènes pro-apoptotiques qui découlent de cette voie. Il s'agit des gènes bcl-2, cIAP2, iNOS, COX-2 et cPLA2 (44).

Enfin, une étude réalisée par Liu et al. a mis en évidence le rôle de la melittine dans la régulation de la GTPase Rac1 dans un contexte de carcinome hépatocellulaire (45). La GTPase Rac1 est une protéine de la famille des GTPase Rho présente dans tous les tissus, impliquée dans la prolifération et le développement cellulaire. Elle régule notamment la polymérisation du cytosquelette et donc la migration cellulaire, la production de cytokines et le cycle cellulaire. Lors d'un processus de cancérogenèse, cette protéine est dérégulée de la même façon que les cascades de signalisation qui en découlent (46).

Pour revenir à l'étude sur la melittine dans le carcinome hépatocellulaire, on a remarqué qu'elle exerçait son rôle anti-métastatique en bloquant la voie de Rac1, ce qui engendre une dépolymérisation des microfilaments d'actine et donc un frein de la motilité de la cellule cancéreuse. L'étude a également montré que la melittine était d'autant plus efficace comme anticancéreux sur la viabilité des cellules lorsque la cellule présentait un taux élevé de protéine Rac1, c'est à dire fortement métastatique dans ce cas. Cette corrélation est aussi valable pour le rôle inhibiteur de la melittine sur la motilité cellulaire.

Tumor Type	Cell Lines	Treatment	Result or Mechanism
Lung cancer	A549 and NCI-H460 cell	MEL	IC ₅₀ values were 2 µg/mL, 3 µg/mL, respectively
	A549 cell	Antinucleolin aptamer-MEL conjugate	Viability for A549 cells after treatment was 51.2 ± 3.5%, MEL inhibits G0/G1 cell cycle progression by down-regulating MeCP2 through Shh signaling.
Hepatocellular carcinoma	SMMC-7721 cells	MEL	HDAC2-mediated PTEN upregulation, Akt inactivation, and inhibition of PI3K/Akt signaling pathways.
	HepG2 cells	MEL	MEL sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting IκB kinase-NFκB.
	SMMC-7721 and BEL-7402 cells	MEL	MEL inhibits the EGF-induced MMP-9 expression via blocking the NF-κB and
Breast cancer	MDA-MB-231 cells	MEL	PI3K/Akt/mTOR pathway
	SUM159 and SKBR3	BV or MEL	MEL reduces the level of the PD-L1 immune-checkpoint protein and the immune-suppressive effects of the tumor microenvironment. IC ₅₀ values for MEL was 4.24 ng/µL for SUM159 and 3.59 ng/µL for SKBR3. MEL induces cell apoptosis by activating the caspase pathway via NF-κB inactivation.
Prostate cancer	LNCaP, DU145, and PC-3 cells	BV or MEL	IC ₅₀ for LNCaP cells: MEL 2.9 and BV 14.2 µg/mL, DU145 cells: MEL 1.5 and BV 6.3 µg/mL
Leukemia	CCRF-CEM and K-562 cells	MEL	IC ₅₀ for PC-3 cells: MEL 1.8 and BV 6.1 µg/mL, respectively MEL induces apoptosis via the intrinsic/mitochondrial pathway.

Figure 23 : Étude des propriétés cancéreuse de la melittine

(47)

b. Propriétés antimicrobiennes

En se basant sur la propriété majeure de la melittine qui est la lyse des membranes cellulaires, il en découle des propriétés antibactériennes et antivirales en formant des pores dans les membranes microbiologiques.

Pour prouver ces propriétés, et dans un premier temps sur les bactéries, nous nous basons sur une étude brésilienne réalisée par Leandro et al., qui traite des propriétés antimicrobiennes de la melittine seule ou en association avec un autre composant du venin d'abeille, la phospholipase A2, dans un contexte de carie dentaire. Pour déterminer le potentiel antibactérien, c'est la méthode des concentrations minimales inhibitrices qui a été utilisée et le travail a été effectué sur sept bactéries différentes (*S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *Lactobacillus casei* et *Enterococcus faecalis*).

Pour rappel, la concentration minimale inhibitrice ou CMI est la concentration d'antibiotique la plus basse inhibant visiblement la croissance d'une bactérie.

Dans notre étude, les résultats de CMI obtenus concernant la melittine sont situés entre 4 et 40 $\mu\text{g/mL}$, ce qui signifie que l'activité antibactérienne est significative. Associée à la phospholipase A2, la melittine a alors une CMI allant de 6 à 80 $\mu\text{g/mL}$. La melittine est donc bien active sur ces bactéries grâce à son pouvoir cytolytique, par ailleurs, la phospholipase A2 n'a pas montré de résultats satisfaisants (48).

En ce qui concerne l'activité antivirale, nous nous appuyons sur une étude de Sarhan et al. qui teste le potentiel virucide de la melittine sur le virus de l'hépatite C. Pour évaluer les effets de la melittine sur le cycle de réplication du virus, l'étude se base sur deux outils : la concentration inhibitrice à 50% (CI50) et la concentration cytotoxique à 50% (CC50).

Il a ainsi été démontré dans l'étude que la melittine empêche le virus de rentrer dans la cellule, elle n'agit en aucun cas sur sa réplication ni sur la sortie de la cellule. Le blocage de l'entrée est dose-dépendante et la melittine agit donc directement sur les particules virales mais pas sur les cellules infectées (48).

Type of Microbial		Treatment or Method	Result
Virus	HIV-1	MEL	ID ₅₀ values was in the range 0.9–1.5 μM
	HSV-1 and HSV-2	MEL	CC ₅₀ ranges 1.35–2.05 μM
	SARS-CoV-2	Sitagliptin-MEL nano-conjugate	IC ₅₀ values 8.439 μM
Bacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MEL	MIC 10 μg/mL and MBC 20 μg/mL
	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	MEL	MIC 6.7 μg/mL and MBC 26 μg/mL.
	Multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i>	MEL	MIC ranges 0.50–32 μg/mL
	<i>E. coli</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>	MEL and ionic liquids combination	<i>E. coli</i> : MIC value was 0.52 μM MEL with 10 μM [Pyr C ₁₂]Br ⁻ <i>S. aureus</i> : MIC value was 0.62 μM MEL with 20 μM [Pyr C ₁₀] Br ⁻ .
	Multidrug-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Combination of MEL and conventional antibiotics	MDR <i>A. baumannii</i> isolates: MIC for MEL and doripenem were reduced by 61.5 and 51.5 folds, respectively. MDR <i>P. aeruginosa</i> isolates: MIC was reduced by 63.5 and 58 folds for MEL–doripenem, respectively, and by 16 and 11 folds for MEL–ceftazidime, respectively. MIC values was 1.25 μM, 1.25 μM, and 2.5 μM for <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , and <i>Aspergillus parasiticus</i> strains respectively. MIC values for different strains of <i>Candida albicans</i> ranges from 8 μM to 32 μM.
Fungus	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , and <i>Aspergillus parasiticus</i>	MEL	
	<i>Candida albicans</i>	MEL	

Figure 24 : Étude des propriétés antimicrobiennes de la melittine

(47)

Le potentiel antimicrobien de la melittine est amplifié lorsqu'elle est administrée en association avec un antibiotique par synergie.

c. Propriétés anti-inflammatoires

Le venin d'abeille est utilisé depuis des siècles comme remède empirique contre l'inflammation. Il est principalement utilisé pour traiter les douleurs des maladies inflammatoires chroniques. Historiquement, Hippocrate considérait déjà le venin d'abeille comme traitement idéal des douleurs rhumatismales et de l'arthrite.

Pour rappel, l'inflammation regroupe un ensemble de mécanismes de défense déclenchés par l'organisme afin de répondre à une agression quelconque. C'est la réaction qui initie la réponse immunitaire primaire. On classe l'inflammation en deux catégories : aiguë et chronique.

Les signes cliniques d'une inflammation aiguë sont la rougeur, la douleur, la chaleur et un gonflement. L'inflammation se décompose en plusieurs étapes successives :

- La phase vasculaire qui comprend une phase de vasodilatation et une augmentation de la perméabilité des vaisseaux,
- La phase cellulaire qui correspond au recrutement des leucocytes sur le site de la lésion et qui aboutit à la phagocytose,
- La phase tissulaire qui est une étape de réparation des tissus par remplacement ou régénération.

Actuellement, de nombreuses études sont menées afin de prouver l'intérêt thérapeutique de la melittine dans les pathologies inflammatoires chroniques. C'est à partir d'une étude coréenne réalisée par Lee et al. que nous allons en détailler le mécanisme. Bien que la melittine, utilisée par les abeilles pour se défendre de l'ennemi, provoque des réactions inflammatoires à forte dose, à contrario, à doses minimales, elle exercerait un effet anti-inflammatoire et les mécanismes d'action sont multiples.

Premièrement, la melittine va bloquer les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des pathogènes. Il s'agit des récepteurs Toll, TLR2 et TLR4 qui ont pour rôle de stimuler la production d'interleukine 6 qui est une cytokine pro-inflammatoire et l'activation des macrophages, qui serviront à la phagocytose.

Parallèlement, la melittine bloque NEMO (NF- κ b essential modulator), une sous-unité de la voie NF- κ b impliquée dans la réaction inflammatoire en plus de son rôle dans l'oncogenèse.

En troisième lieu, la melittine agit négativement sur la voie de signalisation PDGF qui est la voie des facteurs de croissance dérivés des plaquettes. En bloquant son récepteur, le PDGF-c, la melittine empêche l'angiogenèse. De plus, elle diminue l'activation des protéines ERK1 et ERK2, AKT et PLC γ 1 qui ont une activité pro-inflammatoire (46).

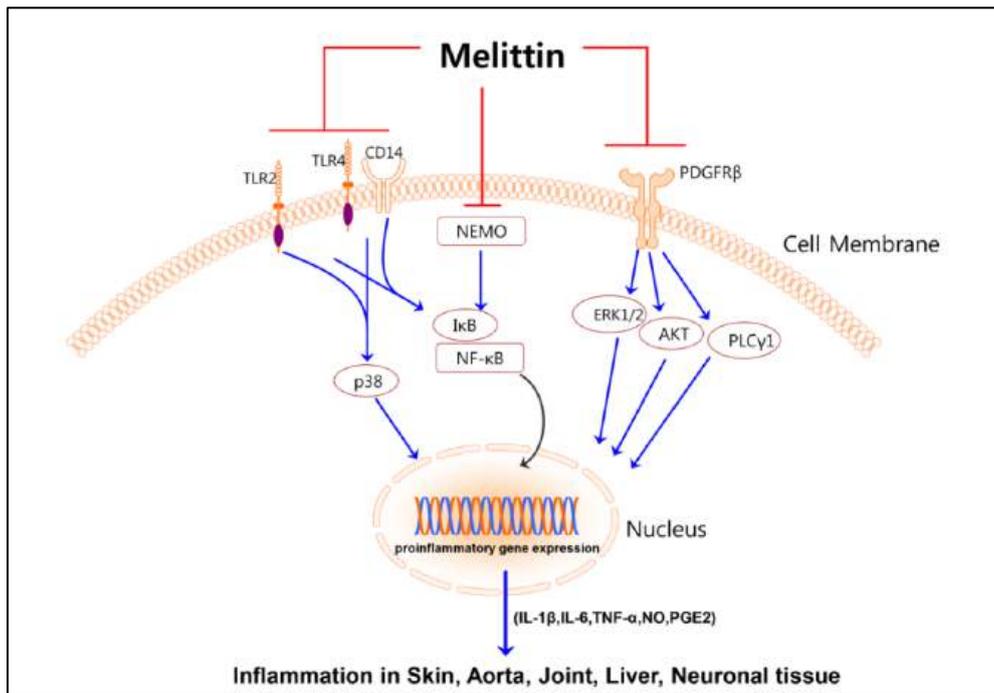


Figure 25 : Propriétés anti-inflammatoires de la melittine

(49)

L'étude recense six pathologies concernées par les effets anti-inflammatoires de la melittine avec les mécanismes d'action décrits précédemment (voir tableau ci-dessous). Pour chaque pathologie, on retrouve notamment l'effet suppresseur de l'expression des cytokines pro-inflammatoires.

Cependant, à ce jour, l'administration de melittine à des fins anti-inflammatoires n'est pas sans risque et peut causer l'apparition d'effets indésirables. Son utilisation à grande échelle nécessite des précautions. Par ailleurs, l'utilisation concomitante de la phospholipase A2 avec la melittine serait une piste prometteuse pour traiter les maladies inflammatoires on se basant sur leur synergie (49).

Disease Model	Specific Effects
Acne vulgaris	<ul style="list-style-type: none"> • Reduced IKK, IκB, NF-κB and p38 phosphorylation • Reduced swelling and granulomatous responses • Suppressed TLR2 and CD14 • Inhibited mRNA expression of TNF-α, IL-1β, IL-8, and IFN-γ. • Decreased expression of TNF-α and IL-1β by regulation of TLR2 and 4 • Inhibited apoptosis and cleavage of caspase-3, -8, and PARP
Neuro inflammation	<ul style="list-style-type: none"> • Suppressed NO and iNOS expression • Suppressed NF-κB activation by blocking degradation of IκBα and phosphorylation JNK and Akt • Suppressed expression IL-1β, IL-6, TNF-α, PGE2 • Increased cell viability and decrease apoptosis
Amyotrophic lateral sclerosis	<ul style="list-style-type: none"> • Decreased number of microglia and phospo-p38 in the spinal cord and brainstem • Improved motor function and inhibit neuronal death in the spinal cord • Inhibited a-synuclein misfolding • Suppressed expression of Iba-1 and CD14 in the lung • Suppressed expression of CD14 and COX-2 in spleen • Increased pERK and Bcl-2 in spleen
Atherosclerosis	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibited PDGR β-tyrosine phosphorylation and its intracellular signal transduction • Decreased total cholesterol and triglyceride but increased HDL in serum • Decreased expression of TNF-α, IL-1β, VCAM-1, ICAM-1, and TGF-β1 • Inhibited expression IL-1β, TNF-α and NF-κB activation • Increased prohibitin, annexin-1 expression • Inhibited calreticulin expression reduced the phosphorylation of EGFR, and ERK and the expression of NF-κB in nuclear
Arthritis	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibited expression of LPS-induced COX-2, PGE2, cPLA2, NO and iNOS • Inhibited JUK and NF-κB activation, release of IκB, and nuclear translocation of the p50 subunit
Liver inflammation	<ul style="list-style-type: none"> • Suppressed inflammation, fibrosis, and expression of VCAM-1, IL-6 and TNF-α in the liver • Suppressed expression of IL-1β, IL-6 and TNF-α • Suppressed apoptosis and TNF-α, IL-1β and NF-κB signaling in GalN/LPS induced acute hepatic failure • Suppressed apoptotic pathway and NF-κB activation • Suppressed expressions of TNF-α, IL-6 and p-STAT3 in chronic liver injury

Figure 26 : Voie de signalisation impliqué dans l'effet anti-inflammatoire de la melittine
(49)

5. EFFETS INDÉSIRABLES DE LA MELITTINE

La melittine, principal composant du venin d'abeille, a pour première fonction de défendre la colonie d'un ennemi. C'est avant tout un peptide allergène pouvant provoquer des réactions plus ou moins importante chez la cible.

Comme décrit précédemment, la melittine agit en lysant les membranes cellulaires et intracellulaires par perturbation de l'organisation lipidique, ce qui aboutit à la mort des cellules.

a. Réaction hémolytique

Il s'avère que la melittine a une forte affinité pour les érythrocytes qu'elle lyse en libérant ainsi de l'hémoglobine (49), pouvant entraîner des anémies hémolytiques. Cette lyse des globules rouges aura donc des conséquences biologiques et cliniques, correspondant à une baisse du taux d'hémoglobine et des manifestations cliniques telles que la pâleur, la fatigue, des vertiges et une baisse de tension.

b. Réaction allergique

La melittine est une protéine ayant un pouvoir allergène, mais les réactions qu'elle engendre peuvent être dues à d'autres allergènes présents dans le venin d'abeille, qui seraient présents sous forme de trace avec une purification incomplète de la melittine. Ce sont notamment des résidus d'apamine, de MCD-peptide, de phospholipase A2 ou d'adolapine qui peuvent, en plus de la melittine, déclencher une dégranulation des mastocytes, et ainsi libérer des médiateurs de l'allergie tels que l'histamine car ce sont des allergènes puissants.

Actuellement, la purification de la melittine n'est pas optimale, on obtient des taux de purification entre 65 et 85% ce qui n'est pas suffisant pour rendre la melittine responsable de réactions allergiques à elle seule. L'utilisation d'une melittine synthétique serait une piste pour contourner les effets indésirables liés à la réaction allergique (49).

c. Douleur

Par ailleurs, le venin d'abeille étant produit pour faire fuir l'ennemi via la piqûre d'abeille, il provoque, par conséquent, une douleur chez la cible. Nous allons ainsi voir par quel mécanisme il provoque cet effet.

Premièrement, il agit indirectement via la melittine. En effet, lors de la formation de pores à travers les membranes, la melittine va engendrer la libération de médiateurs pro-inflammatoires qui vont activer des nocicepteurs. Ces médiateurs sont des substances dites « algogènes », productrice de douleur et correspondent notamment aux protons H⁺, à l'ATP et à la sérotonine (5-HT).

Ils sont libérés suite à la lyse membranaire et la dégradation des mastocytes et de la matrice tissulaire. Ces substances algogènes vont entraîner l'ouverture de canaux (P2X3, ASICs, 5-HT₃), et ainsi faire rentrer des cations dans la cellule.

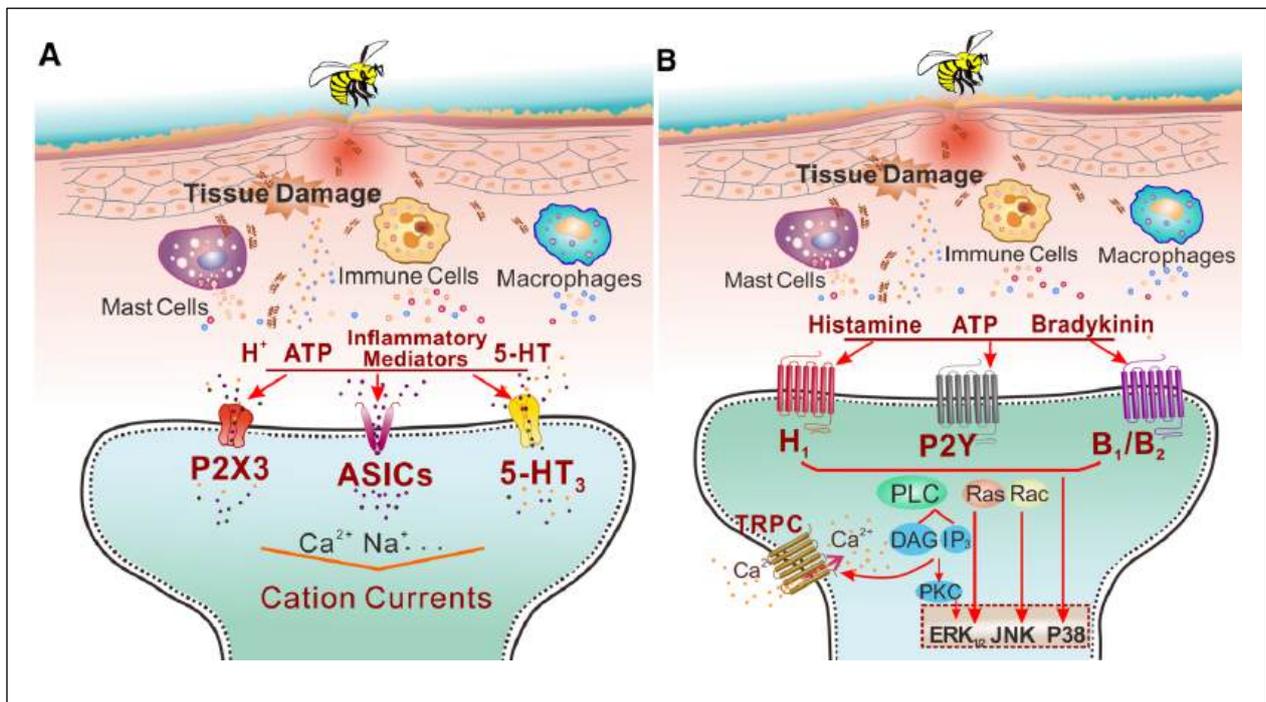


Figure 27 : Intervention de la melittine dans les voies de signalisation de la douleur (50)

De plus, au niveau sous-cutané, la melittine provoque une augmentation des sous-unités du canal sodique, générant ainsi un potentiel d'action allongé, ce qui par conséquent, entrainera une augmentation de calcium au niveau présynaptique et ainsi la libération des neuromodulateurs dans la fente synaptique.

Parallèlement, des médiateurs seront également libérés à la suite de la perturbation de la membrane provoquée par la melittine, il s'agit de l'histamine, de l'ATP et de la bradykinine. Ils vont activer des récepteurs couplés aux protéines G, qui vont d'une part induire l'entrée de

calcium dans la cellule via la voie DAG/IP₃, et d'une autre part activer les voies de signalisation ERK, JNK et la MAP kinase P38 qui sont des voies impliquées dans le processus de la douleur.

La melittine aura également une action directe en activant de manière sélective les récepteurs vanilloïdes, qui sont des récepteurs ionotropiques régulant l'entrée de calcium et de sodium dans la cellule. Leur activation entraîne alors la dépolarisation des nocicepteurs.

Son action directe passe donc par l'activation de la phospholipase A2 (PLA₂), ce qui va déclencher la production d'acides arachidoniques (AA). Ces derniers vont activer, via les lipooxygénases (LOXs), les récepteurs TRPV1 qui sont donc les récepteurs vanilloïdes, responsables de l'entrée de calcium et donc de la dépolarisation de la cellule et l'activation des nocicepteurs.

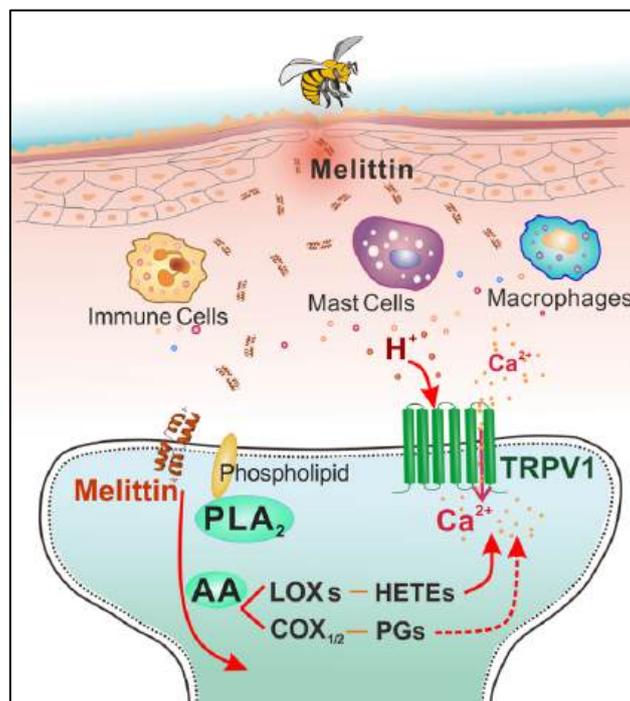


Figure 28 : Implication de la melittine dans l'activation des nocicepteurs

(50)

Pour étudier les effets algiques de la melittine, une étude menée par Chen et al. a été mise en place. On a introduit à des personnes saines de la melittine par voie intradermique et la douleur a été évaluée via une échelle numérique allant de 0 à 10. Sur huit participants, sept d'entre eux ont immédiatement perçu une douleur à 8 soit une douleur aiguë. Cette douleur a persisté pendant 3 minutes après l'injection. Par ailleurs, la réaction inflammatoire provoquée par la melittine a été visuellement constatée avec une augmentation de la température autour du site

d'injection après 10 minutes ainsi qu'un gonflement. Il a été démontré via cette étude que la douleur était dose dépendante, et il n'y a eu aucun choc anaphylactique ni aucune démangeaison dans le groupe d'individus. Cependant, la dose utilisée restait inférieure à la quantité de melittine libérée par la poche à venin lors d'une vraie piqûre (sachant que l'appareil vulnérant libère 140 µg de venin sec soit environ 56 à 84 µg de melittine en situation naturelle) (50).

En conclusion, la melittine est bien la substance active du venin d'abeille responsable de la sensation de douleur à l'injection, via différents mécanismes, directs et indirects.

Ces différents effets indésirables ne sont pas négligeables et sont la conséquence, d'une part, d'une absence de sélectivité de la melittine sur les cellules cibles, et d'autre part, de la présence de résidus à l'origine d'effets indésirables, liés à la méthode de purification. C'est pour cette raison que les méthodes d'isolement, d'obtention et d'administration de la melittine sont au cœur des recherches afin d'obtenir une melittine la plus pure possible, et de façon la plus ciblée possible. Le coût de production est évidemment un critère non négligeable dont nous discuterons ultérieurement.

6. NANOTECHNOLOGIE

La melittine, malgré la richesse de ses propriétés et ses perspectives dans le traitement du cancer entre autres domaines, reste problématique par son activité lytique non sélective et sa cytotoxicité, pouvant endommager un grand nombre de cellules saines.

Aujourd'hui, une solution a été trouvée pour espérer pallier ce problème, il s'agit de l'utilisation des nanotechnologies. Pour rappel, d'après l'INSERM, les nanotechnologies correspondent à « l'ensemble des techniques et des outils qui permettent d'étudier ou d'interagir avec les phénomènes particuliers qui existent au niveau nanométrique ou nanoscopique ». Cette technique permettrait d'améliorer la sélectivité sans endommager l'organisme.

Actuellement, en cancérologie, il existe différentes stratégies ayant pour but d'amener la melittine à sa cible de manière sélective pour éviter d'endommager l'environnement sain.

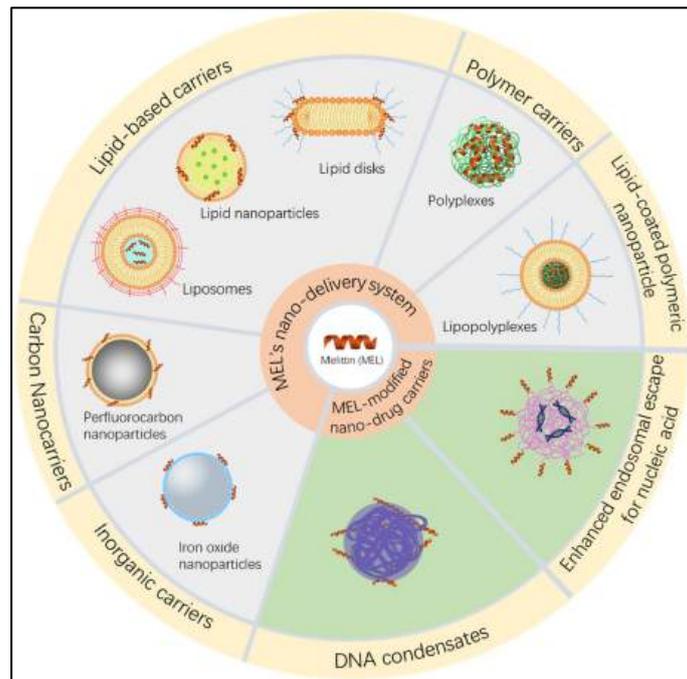


Figure 28 : Formes potentielles de nanoparticules contenant de la melittine
(47)

On classe globalement les systèmes de libération de la melittine en trois groupes : les supports lipidiques, les polymères et les supports inorganiques.

Dans les supports lipidiques, on retrouve les liposomes qui sont des vésicules composées d'une bicouche phospholipidique entourant une phase aqueuse. Leur taille est d'environ 140 nanomètres. Communément, le principe actif est placé dans la partie hydrophile mais la melittine étant amphiphile, elle ne restera pas en zone aqueuse sans interaction, la problématique est donc d'empêcher la melittine de dénaturer la bicouche lipidique du liposome et de la maintenir uniquement au centre en zone hydrophile. Pour pallier ce problème, on utilise des tensio-actifs qui formeront une émulsion entre la melittine et l'eau et freineront ainsi la lyse de la bicouche phospholipidique.

In vivo, les liposomes atteignent leur cible, une étude a été réalisée avec ce type de système et les cellules cibles (contexte de cancer hépatique) étaient sensibles aux liposomes et on retrouvait un effet anti-tumoral similaire à la melittine seule bien qu'il reste encore de nombreuses améliorations à faire in vivo (46).

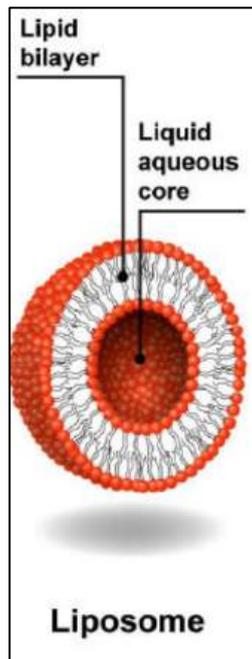


Figure 29 : Structure d'un liposome

(51)

Toujours dans la même catégorie, on rencontre les nanoparticules lipidiques qui sont des vecteurs fréquemment utilisés dans la fabrication des vaccins. Ce sont aussi des vésicules composées de lipides stabilisés par des tensio-actifs. Contrairement aux liposomes, les nanoparticules lipidiques ont un cœur hydrophobe (51). La taille est également différente car une nanoparticule lipidique mesure environ 14 nanomètres.

Ainsi, la melittine s'encapsule plus facilement dans ces vecteurs grâce à sa nature amphiphile. Ces nanoparticules sont très stables *in vivo* et garantissent l'effet anti-tumoral de la melittine. De plus, bien que les nanoparticules soient limitées par leur capacité d'encapsulation, la melittine semble bien compatible avec ce système d'après une étude sur des cellules de mélanome malin, avec des résultats significatifs sur l'effet antiprolifératif (47).

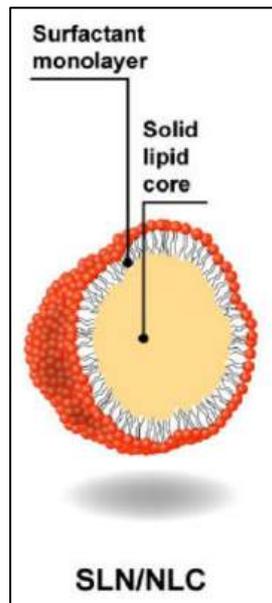


Figure 30 : Structure d'une nanoparticule lipidique
(51)

Pour finir avec les supports lipidiques, il existe des disques lipidiques qui sont également des vésicules mais planes et entourées de polyéthylène glycol, d'environ 50 nanomètres. Ce système est moins utilisé car il présente, conjugué à la melittine, des risques de toxicité (47).

Nous allons ensuite nous intéresser aux supports inorganiques. Dans un premier temps, on retrouve l'utilisation de boîtes quantiques, plus connues sous le nom de « quantum dots », qui sont des structures de la taille du nanomètre, et composées de matériaux semi-conducteurs qui émettent une fluorescence lors d'une excitation par la lumière. Leur comportement est donc exploité pour être utilisé comme une sonde fluorescente. Leur intérêt en cancérologie expérimentale est leur pouvoir de reconnaissance des cellules cancéreuses. C'est pour cette raison qu'on a conjugué la melittine à des boîtes quantiques pour cibler des cellules tumorales. Cependant, la melittine n'est pas assez stable pour être véhiculée par les boîtes quantiques sans provoquer une hémolyse. Les recherches continuent de progresser mais il est trop tôt pour parler des résultats significatifs (47) .

D'une autre part, on retrouve des nanoparticules qui ont une structure se rapprochant des structures lipidiques vues précédemment. Il s'agit des nanoparticules de perfluorocarbène au centre, de nature hydrophobe, entouré d'une couche de phospholipide. L'avantage de cette composition est de diminuer la toxicité tout en vectorisant la melittine de façon stable.

Nonobstant, ces structures sont relativement encombrantes bien que de l'ordre du nanomètre (environ 250 nanomètres), ce qui rends la ciblage et l'atteinte des cellules cancéreuses moins efficace.

En dernier lieu concernant les vecteurs nanométriques de la melittine, on retrouve les nanoparticules de polymères. Le matériau utilisé est le PLGA (acide polylactique co glycolique), qui est biodégradable. Une fois conjugué, le complexe PLGA-melittine permet d'augmenter la demi-vie de la melittine et donc cette dernière peut exercer l'effet souhaité plus longtemps sans pour autant augmenter les effets indésirables car la capsule de PLGA contrôle la libération de melittine. Néanmoins, l'interaction entre le polymère et la melittine peut être perturbé dans la circulation sanguine, notamment aux niveaux des charges, ce qui en fait une limite à son utilisation à ce jour.

Nous avons donc vu un échantillon non exhaustif des différentes possibilités qu'offrent les nanotechnologies pour amener la melittine à son site d'action de façon plus ciblée et plus précise en passant outre les obstacles biologiques que pourraient rencontrer la molécule seule et en évitant sa dégradation prématurée. Cependant, les travaux sur ces vecteurs sont encore en cours et doivent garantir une meilleure stabilité et moins de toxicité pour être utilisés à grande échelle en thérapeutique.

7. STANDARDISATION DE LA MÉTHODE D'OBTENTION DE LA MELITTINE

La melittine n'est pas une matière première qui est facile d'accès. En effet, le processus est long et onéreux avant d'avoir dans les mains une melittine pure, prête à l'emploi pour, dans un premier lieu, effectuer des travaux de recherche, en sachant que nous ne parlons pas encore d'une commercialisation à grande échelle. Bien que le venin soit utilisé traditionnellement depuis des centaines d'années, il semble indispensable de standardiser les méthodes de récolte à des fins de recherche pour obtenir une melittine la plus pure possible et d'en décrire toutes ses propriétés, plus intéressantes les unes que les autres.

Nous allons tenter de détailler les étapes successives qui aboutissent à l'obtention de notre molécule d'intérêt.

Premièrement, il faut sélectionner les abeilles. Rappelons que seules les abeilles femelles sont pourvues d'un appareil à venin. Fort heureusement, elles sont majoritaires dans une colonie. Il faut donc élever une ou plusieurs ruches pour commencer. La méthode classique pour récolter le venin reste l'électrostimulation décrite précédemment, car cette technique préserve les abeilles en n'induisant aucun arrachement abdominal.

La meilleure période de récolte du venin est logiquement l'été, c'est à dire le moment où la colonie est la plus nombreuse, avec une activité à son paroxysme. Les collecteurs actuels, que l'on trouve facilement dans le commerce apicole, sont constitués de quatre parties distinctes : une batterie, un générateur, un stimulateur et une lame de verre. Les paramètres de l'appareil doivent être bien réglés et surveillés afin de ne pas endommager les abeilles et de garantir la meilleure efficacité. La récolte doit se faire à l'extérieur de la ruche pour ne pas augmenter inutilement la température interne de la ruche, maîtrisée déjà difficilement par les ventileuses en période de forte chaleur.

Il existe par ailleurs des appareils de récolte individuel de venin d'abeille, qui, comme l'électro stimulateur, n'endommage pas l'appareil à venin. Il s'agit d'un tube alimenté par une batterie, dans lequel l'abeille se déplace en marchant, sans voler, et en se déplaçant va toucher deux fils de cuivre provoquant un courant qui traverse le corps de l'abeille et déclenche la piqûre sur un support en plastique.

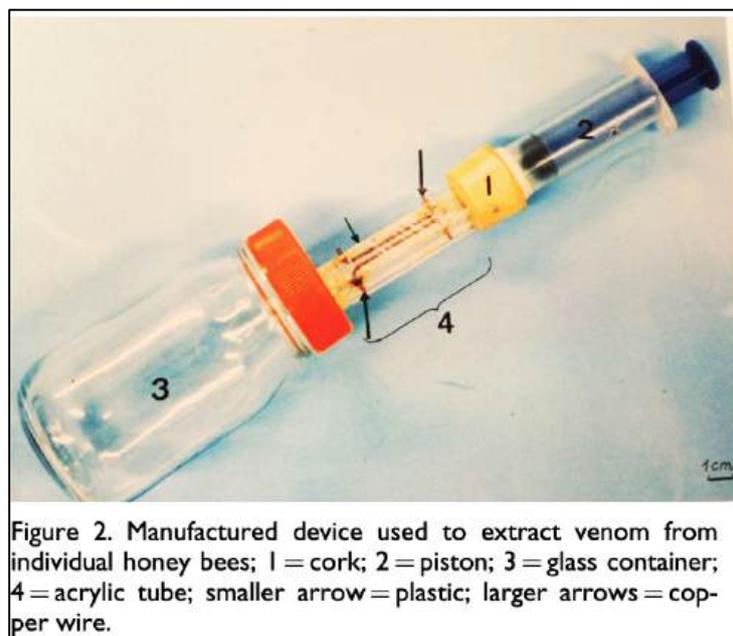


Figure 31 : Extracteur de venin

(52)

Une fois le mécanisme de défense enclenché, l'abeille éjecte son venin, il faut donc le récolter. Il faut attendre que le venin soit sec pour venir le gratter sur la lame de verre, il aura, à ce moment-là, l'aspect d'une poudre blanche. Le venin doit être conservé à l'abri de la lumière pour éviter toute dégradation avant de l'exploiter. La quantité moyenne récoltée est de 1g de venin par ruche pour 40 minutes d'électrostimulation.

Il est judicieux de préciser qu'il existe une méthode plus invasive, que l'on pourrait considérer comme chirurgicale pour récolter le venin à petite échelle. Cela permet d'éviter les biais liés à la récupération quelque peu aléatoire du venin sur la lame de verre. Pour cela, il existe un protocole bien précis consistant à anesthésier l'abeille par le froid, puis de tirer l'organe à venin à l'extérieur du corps à l'aide d'une pince sans le détacher complètement. Il faut ensuite séparer délicatement l'appareil à venin de son réservoir. Le réservoir est ensuite lyophilisé ou mis en suspension après un rinçage et un séchage. Le stockage se fait à très basse température, soit -20°C pour une utilisation dans les six mois ou -80°C pour une utilisation dépassant une année.

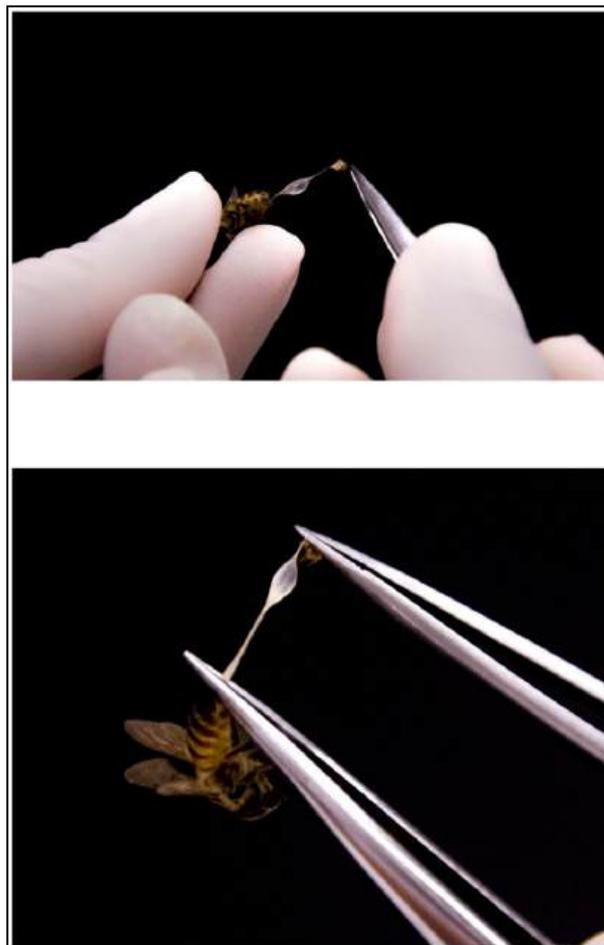


Figure 32 : Technique chirurgicale d'extraction du venin (52)

Une fois le venin récolté, il peut subir des phénomènes d'oxydation et de protéolyse, c'est pourquoi il est toujours conservé après avoir été mélangé à un inhibiteur de protéases pour éviter ces phénomènes. L'ajout de glycérol est également une technique permettant de contrer les phénomènes de protéolyse.

Ensuite, il faut déterminer la composition en protéine du venin d'abeille. Pour cela, deux techniques d'analyse sont utilisées : la spectrométrie de masse et la chromatographie liquide haute performance.

La spectrométrie de masse est une méthode permettant de déterminer la masse moléculaire des protéines afin de les identifier. Pour déterminer cette masse, les molécules sont séparées et volatilisées (passage à l'état de gaz), ensuite elles sont ionisées grâce à un champ magnétique, puis on obtient la masse moléculaire en divisant la masse par le nombre de charges (53). On lit les résultats au travers d'un spectre représentant le rapport masse/valence des ions. Ainsi, un grand nombre de spectres sont caractéristiques d'une molécule et il est donc possible de les identifier en les comparant aux spectres déjà connus.

Cette technique est utilisée en complément de la chromatographie liquide en raison de la trop grande différence de concentration au sein du venin d'abeille. Il est donc nécessaire de fractionner en amont l'échantillon, et d'égaliser les concentrations. Pour cela, on utilise un échantillon de peptides couplés à des billes qui vont se combiner aux protéines d'intérêt du venin. Le complexe subit ensuite un lavage et les protéines en surnombre qui n'auront formé aucun complexe seront éliminées par saturation. Les protéines restantes sont ensuite analysées par spectrométrie de masse.

En utilisant cette technique pour la melittine, nous aurons uniquement une information qualitative sur la composition du venin. L'analyse nécessite de récolter le venin d'environ cent abeilles pour être regroupé et obtenir une concentration de soixante mg/ml de protéines (52).

Néanmoins, la méthode de choix pour identifier chaque composant présent dans le venin d'abeille est la chromatographie liquide haute performance. Cette technique analytique permet de séparer, d'identifier et de purifier les principaux composants, notamment la melittine pour pouvoir ainsi les quantifier.

Le principe est de mettre le venin en solution en le mélangeant avec un solvant, puis de l'introduire dans la phase mobile liquide.

Les molécules vont interagir avec la phase stationnaire en fonction de leur nature. On parle de chromatographie liquide haute performance car la phase mobile est poussée par une pompe mise sous pression. A la sortie de la colonne chromatographique, un détecteur va analyser les différents composés et un pic apparaîtra, il s'agit du chromatogramme, qui servira pour l'interprétation (54).

La problématique avec le venin d'abeille est le manque de référence. Cela complique l'interprétation des résultats avec certitude. Pour pallier ce problème, il est indispensable d'utiliser un étalon interne. Il permet ainsi de corriger les pertes lors de la préparation et de s'affranchir des effets matrices et des interférences analytiques. Les étapes décrites dans le rapport du « journal of apicultural research » sont bien précises concernant la purification par HPLC : on cherchera à identifier principalement quatre protéines : la phospholipase A2, l'apamine, le MCD-peptide et la melittine. On aura donc un étalon interne pour chacune de ces molécules, correspondant à peu près à leur répartition dans le venin.

L'étalon de l'apamine a une concentration située entre 2 et 20 mg/ml, la concentration pour le MCD-peptide est d'environ 5 à 30 mg/ml, celle de la phospholipase A2 est d'environ 10 à 100 mg/ml et enfin 30 à 300 mg/ml pour la melittine.

Les différents composants sont identifiés qualitativement à partir de leur temps de rétention et ensuite on se base sur la surface sous les pics de chaque composant pour construire la courbe d'étalonnage avec l'absorbance en fonction de la concentration. Cette courbe permet de déterminer les concentrations respectives (52).

Pour avoir une idée de l'aspect d'un chromatogramme de melittine, nous allons nous appuyer sur une étude réalisée à partir d'abeilles iraniennes ayant pour but d'expliquer l'isolement de la melittine réalisée en 2015. Dans cette étude, le venin a été récolté par stimulation électrique avec pour seule différence le placement de la plaque de verre qui était située dans la ruche et non pas à l'extérieur. La récolte du venin s'est faite classiquement par grattage du venin séché. La méthode d'analyse utilisée ici est la chromatographie liquide haute performance. Le chromatogramme obtenu donne un temps de rétention à 42 minutes pour la melittine, soit le même temps de rétention que l'étalon interne (21) :

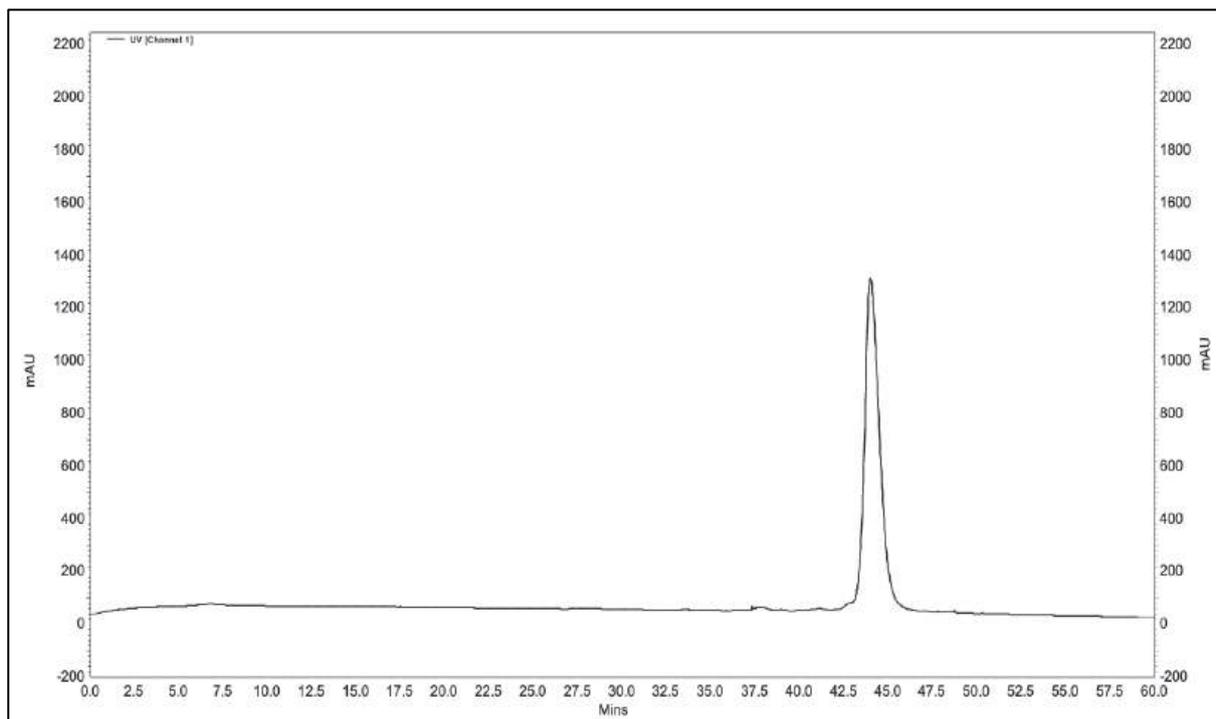


Figure 33 : Chromatogramme de la melittine en LCMS

(21)

Pour conclure sur les méthodes d'isolement de la melittine, il faut retenir que le venin est extrait majoritairement par stimulation électrique, une méthode qui épargne la mort de l'abeille lors de l'extraction. Puis, le stockage du venin doit se faire rigoureusement de façon à éviter sa dégradation, par l'ajout de cocktails évitant l'activité enzymatique interne du venin. Le conditionnement doit également protéger le venin de la lumière.

La méthode de choix pour séparer et identifier les composants du venin est la chromatographie liquide haute performance et il faut absolument utiliser un étalon interne pour l'identification par manque de références dans les banques de chromatogrammes. Enfin, le venin doit être stocké à basse température après avoir été lyophilisé.

PARTIE 3 : LA MELITTINE EN
CANCÉROLOGIE EXPÉRIMENTALE

Étude: Honeybee venom and melittin suppress growth factor receptor activation in HER2-enriched and triple-negative breast cancer

Il s'agit d'une étude australienne réalisée en 2020 par Duffy et al. et publiée dans le journal « nature ».

Actuellement, de nombreuses pistes sont étudiées pour démontrer les propriétés anticancéreuses de la melittine mais les résultats concrets sont peu nombreux et ne permettent pas de la retrouver sur le marché du médicament. Cette étude a donc voulu prouver les effets anti-tumoraux de la melittine sur des cellules cancéreuses retrouvées dans le cancer du sein triple négatif et le cancer du sein HER2 positif, le cancer du sein étant le cancer le plus répandu chez la femme au niveau mondial.

Les cellules ciblées dans cette étude sont dans un premier temps les cellules du cancer triple négatif, c'est à dire un cancer du sein qui n'exprime pas les récepteurs hormonaux à la progestérone et aux œstrogènes, ni le récepteur de la protéine HER2, ce type de cancer ne peut donc pas être traité par des thérapies qui ciblent ces récepteurs. Il s'agit par conséquent d'un cancer avec un taux de survie faible en comparaison aux autres cancers du sein car l'arsenal thérapeutique est moins varié. La recherche de thérapies plus ciblées dans ce cancer est primordiale pour améliorer la survie des patientes ; et dans un second temps, le cancer du sein HER2 positif, qui signifie que les cellules cancéreuses surexpriment le gène HER2. Les sous-unités dans le cancer triple-négatif sont les cellules « SUM », pour le cancer HER2+ il s'agit des cellules « SKBR » et pour les cellules normales il s'agit des sous-unités « HDF ».

En ce qui concerne la melittine, on recense une activité anticancéreuse dans le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer de l'ovaire et de l'utérus, le cancer du pancréas et le glioblastome par son effet cytotoxique sur les cellules tumorales. De plus, la melittine serait intéressante en association avec des thérapies anticancéreuses plus classiques, par un effet synergique. Cela a été démontré dans le cancer du col de l'utérus et du larynx en association avec le cisplatine et dans le cancer du poumon avec le docétaxel. Comme décrit précédemment, l'action de la melittine ne passe pas uniquement par la lyse membranaire, on peut aussi compter sur son inhibition des voies de signalisation impliquées dans la cancérogénèse.

Dans le cancer du sein HER2+, c'est majoritairement la voie PI3K/Akt/mTOR qui est impliquée par le biais du récepteur HER2 surexprimé qui engendre l'activation de cette voie, aboutissant à l'oncogénèse.

Dans l'étude, on veut démontrer la sélectivité et l'efficacité de la melittine dans le cancer en la testant sur des lignées cellulaires qui représentent les deux sous-types de cancer cités précédemment ainsi que des cellules cancéreuses luminales et des cellules non transformées.

On a comparé dans un premier temps le taux de cellules viables après traitement d'une part par du venin d'abeille, et d'autre part par de la melittine seule sur des cellules cancéreuses et saines.

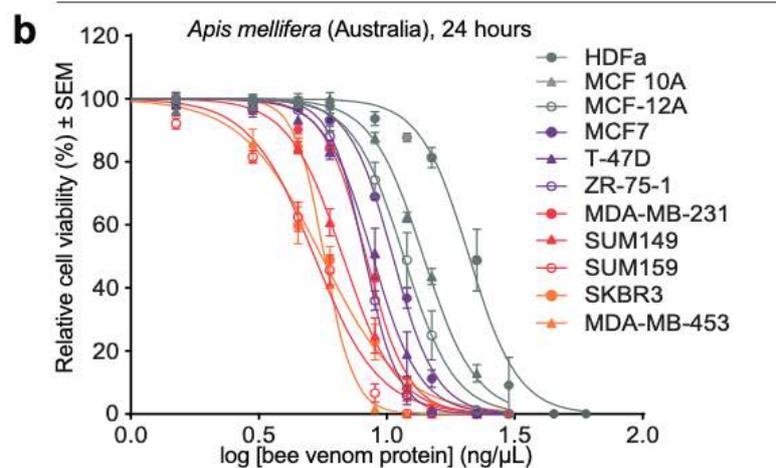


Figure 34 : Évolution des taux de viabilité cellulaire après traitement au venin d'abeille (55)

La sélectivité du venin d'abeille est élevée significativement pour les cellules du cancer triple négatif et du cancer HER2+, ensuite elle l'est un peu moins dans les cellules cancéreuses luminales et elle est faible dans les cellules normales. On remarque ici que le pourcentage de cellules viables est plus faible chez les cellules cancéreuses.

On a ensuite étudié la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}), qui mesure l'efficacité de la melittine à inhiber une fonction biologique spécifique. A partir de cet indicateur, on sait quelle quantité de melittine il faut pour inhiber de moitié l'effet tumoral.

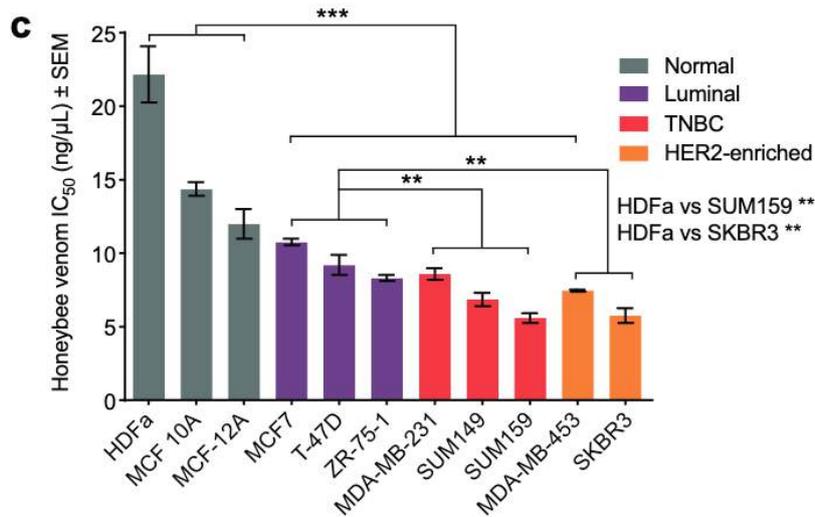


Figure 34 : Évolution de la concentration inhibitrice médiane selon les lignées cellulaires (55)

Ainsi, on observe une diminution significative de l'IC₅₀ sur les cellules cancéreuses en particulier dans le cancer HER2+ et triple négatif en comparaison avec les lignées de cellules saines.

Plusieurs tests ont été effectués pour évaluer l'efficacité du venin provenant de différentes colonies d'abeilles, notamment des abeilles irlandaises et anglaises, et aussi chez le bourdon *Bombus* d'Angleterre. On a remarqué que le pourcentage de cellules viables était significativement plus faible dans les cellules cancéreuses en comparaison avec les cellules normales. Néanmoins, la viabilité des cellules testées avec le venin de bourdon n'est pas significativement diminuée en comparaison avec le venin d'abeille.

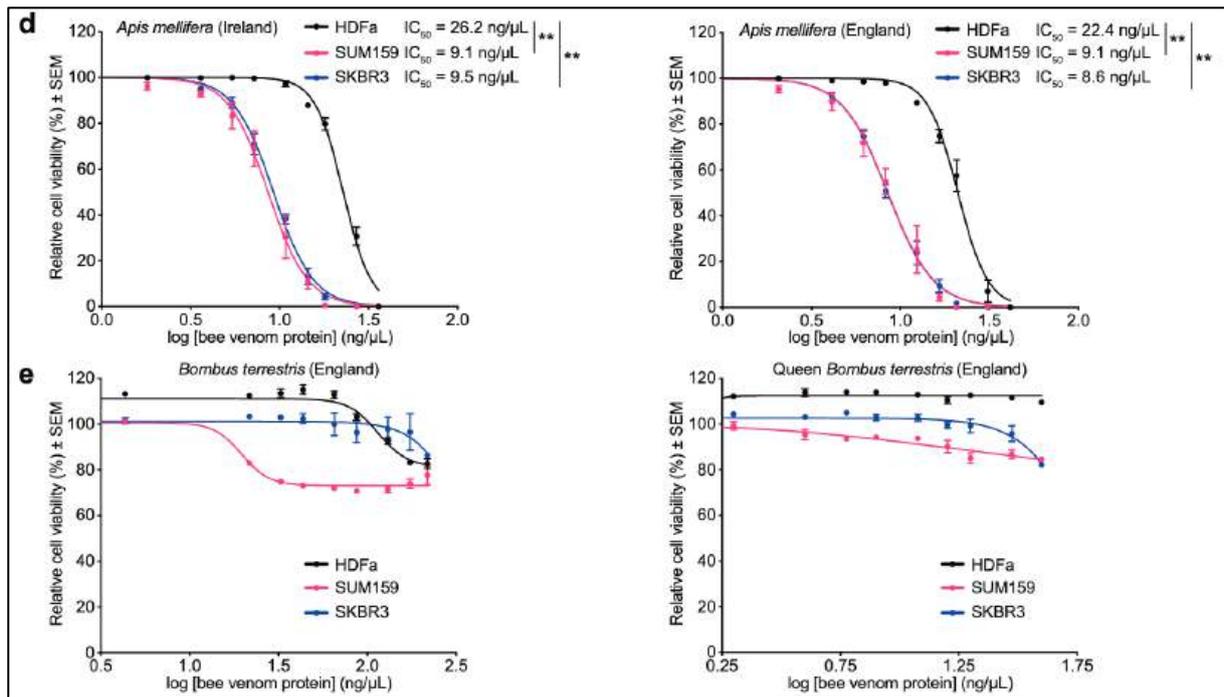


Figure 35 : Comparaison du taux de viabilité selon le type de venin utilisé (55)

Ensuite, on a réalisé un test ELISA à partir d'un anticorps monoclonal murin qui reconnaît la melittine, pour en mesurer la quantité relative dans le venin d'abeille et dans le venin de bourdon. On mesure ainsi par le test ELISA l'absorbance des solutions de melittine et de venin. Les résultats sont nettement significatifs et cohérents avec les résultats précédents, c'est à dire qu'il y a significativement plus de melittine dans le venin d'abeille que dans le venin de bourdon.

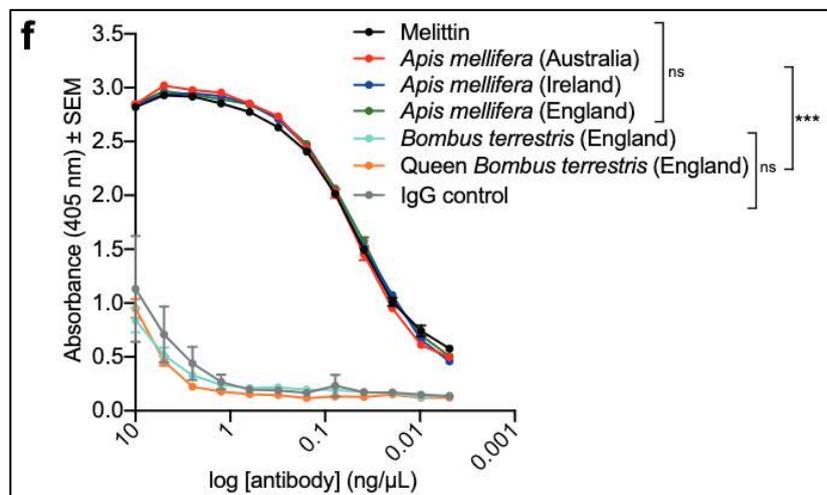


Figure 36 : Quantification du taux de melittine selon l'origine du venin (55)

Pour continuer sur la démonstration des effets anticancéreux de la melittine, un test *in vitro* a été réalisé, en bloquant la melittine grâce à l'anticorps murin anti-melittine pour ainsi protéger la viabilité cellulaire et on a mesuré ce blocage en comparant cet effet avec des cellules traitées par de la melittine ou du venin d'abeille, en ajoutant des quantités croissantes d'anticorps. Ce test a été réalisé sur deux lignées cellulaires, celles du cancer triple négatif et des cellules normales.

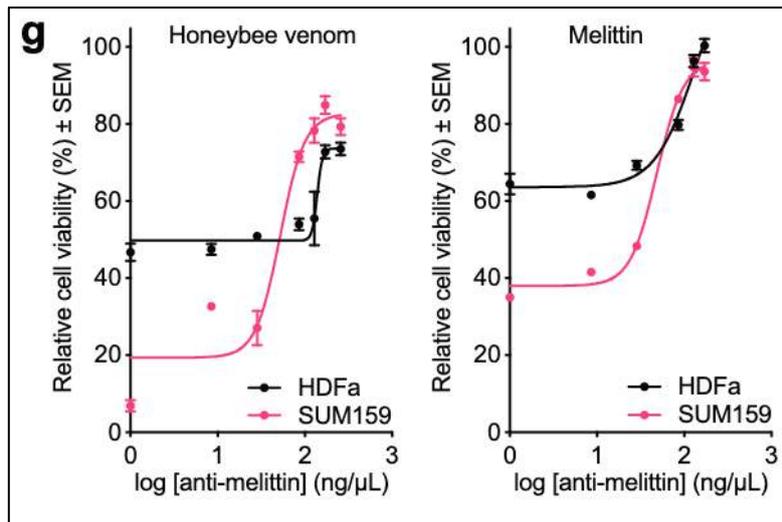


Figure 37 : Taux de survie cellulaire en fonction de la concentration d'anticorps anti-melittine
(55)

On observe ainsi que la viabilité des cellules augmente de façon significative et concomitante avec l'augmentation de la concentration d'anticorps anti-melittine, c'est à dire lorsque la melittine est bloquée, dans les deux situations (traitement par venin ou melittine). Cela signifie que la melittine est responsable de la baisse de la viabilité cellulaire et qu'en plus c'est bien le composant majeur du venin qui est responsable de l'effet anti-cancéreux.

Dans un second temps, on a voulu démontrer l'effet pro-apoptotique de la melittine et du venin d'abeille dans les cellules cancéreuses. Pour cela, on a traité les lignées cellulaires du cancer triple négatif avec une concentration inhibitrice médiane de melittine ou de venin, puis on a réalisé le test des caspases-3 clivées pour quantifier l'effet pro-apoptotique. Les caspases-3 sont des protéases qui, lorsqu'elles sont clivées, entraînent le déclenchement de l'apoptose.

Un western blot a été réalisé pour détecter les caspases clivées dans les cellules du cancer triple négatif traitées par le venin ou la melittine 18 heures ou 24 heures après. Le témoin de charge utilisé est l' α -tubuline.

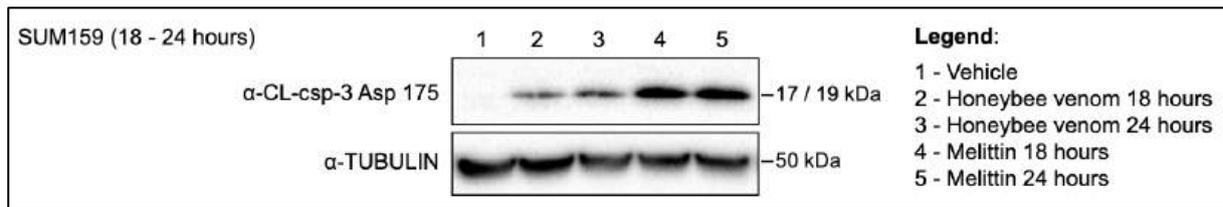


Figure 38 : Western blot

(55)

On observe que la melittine, aux deux temps, induit un niveau d'apoptose supérieur au venin d'abeille, bien que dans les deux cas, on observe bien qu'il y a eu un clivage des caspases et donc un déclenchement de l'apoptose, via la présence des quatre bandes sur le western blot.

On a ensuite réalisé un test de détection à l'annexine pour quantifier les cellules apoptotiques, nécrotiques et mortes après un traitement par l'IC₅₀ de melittine ou de venin d'abeille sur les cellules du cancer triple négatif. En effet, l'annexine, couplée à un marqueur fluorescent, est une protéine ayant une affinité pour les cellules pré-apoptotiques. Les cellules ont ensuite été traitées par cytométrie en flux, qui est une technique permettant de compter les cellules après leur passage devant un faisceau laser.

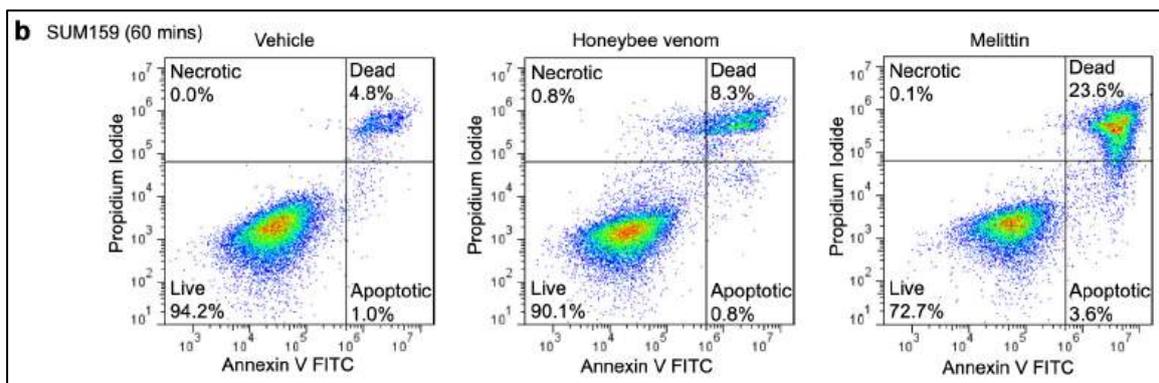


Figure 39 : Cytométrie de flux et quantification des cellules traitées par melittine ou par venin d'abeille.

(55)

On observe une quantité de cellules mortes et apoptotiques significativement plus importante dans l'échantillon traité par melittine en comparaison avec le traitement par le venin.

Pour étudier la cinétique de l'apoptose, on a mesuré la viabilité cellulaire dans des lignées cellulaires de cancer triple négatif, HER2+ et dans des lignées cellulaires normales. On a ainsi représenté la viabilité cellulaire en fonction du temps en comparant des échantillons traités par la melittine et par le venin d'abeille.

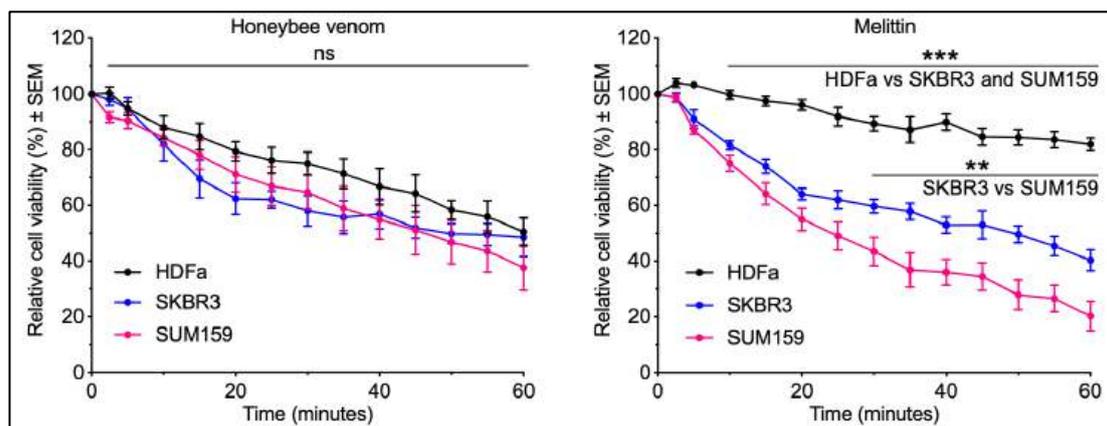


Figure 40 : Comparaison de la viabilité cellulaire après traitement par melittine ou par venin d'abeille.

(55)

Concernant le venin, il n'y a pas de différence significative dans la cinétique de mort cellulaire dans les trois lignées. En revanche, pour la melittine, la cinétique est plus rapide dans les lignées de cellules cancéreuses, notamment pour le cancer triple négatif, et on observe une cinétique plus lente pour les cellules normales. Cette figure va dans le sens d'une efficacité pro-apoptotique significative de la melittine seule ainsi que sa spécificité pour les cellules cancéreuses.

Dans la suite de l'étude, on a cherché à améliorer le ciblage de la melittine pour les cellules du cancer du sein. En partant du principe que c'est l'extrémité C-terminale de la melittine, chargée positivement, qui est responsable de la liaison et de la dégradation de la membrane cellulaire, on a tronqué cette terminaison et on l'a remplacé par une séquence négative (DEDE-melittine). On a observé que lors de l'absence de cette séquence positive en C-terminale, la melittine n'avait significativement plus d'impact sur la viabilité des cellules et que cette séquence était donc fondamentale dans les propriétés anticancéreuses de la melittine grâce à sa capacité à interagir avec la membrane cellulaire.

Il faut savoir que la séquence RGD (arginine, glycine, sérine) est un motif permettant la fixation de certaines intégrines qui sont des protéines transmembranaires permettant la transduction de signaux cellulaires. De ce fait, ce tripeptide a été fixé à la melittine pour améliorer sa sélectivité. On a donc traité des lignées cellulaires normales et issues du cancer du sein triple négatif avec de la melittine seule ou de la melittine liée au motif RGD et on a observé la viabilité cellulaire.

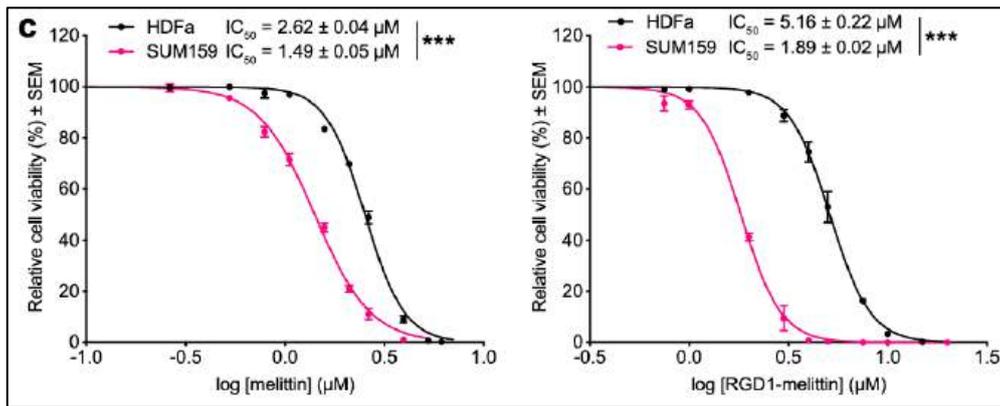


Figure 41 : Étude de l'effet d'une liaison RGD à la melittine sur le taux de survie cellulaire (55)

Par la lecture du graphique, on constate une diminution significative de la viabilité des cellules du cancer triple négatif en comparaison avec les cellules saines, ce qui permet de valider le principe selon lequel le motif RGD améliore la sélectivité pour les cellules cancéreuses mais dans la suite de l'étude on démontre par immunofluorescence que ce motif certes, rends la melittine plus sélective mais le motif c-terminal positif reste néanmoins indispensable à l'activité anticancéreuse.

Enfin, le western blot confirme l'activité anti-cancéreuse de la melittine seule ou fixée au motif RGD, mais aussi l'annulation de cette activité lorsque la melittine est dépourvue de son extrémité C-terminale positive (DEDE-melittine) par absence d'immunotransfert.

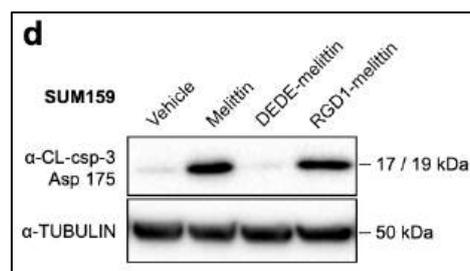


Figure 42 : Modifications structurales et conséquences sur l'activité anticancéreuse de la melittine (55)

Par ailleurs, il a été prouvé que les modifications structurales de la melittine, qu'il s'agisse de la modification des extrémités ou du changement de charge, ne perturbe pas la structure en hélice alpha, conformation responsable de la formation de pores au sein de la membrane plasmique.

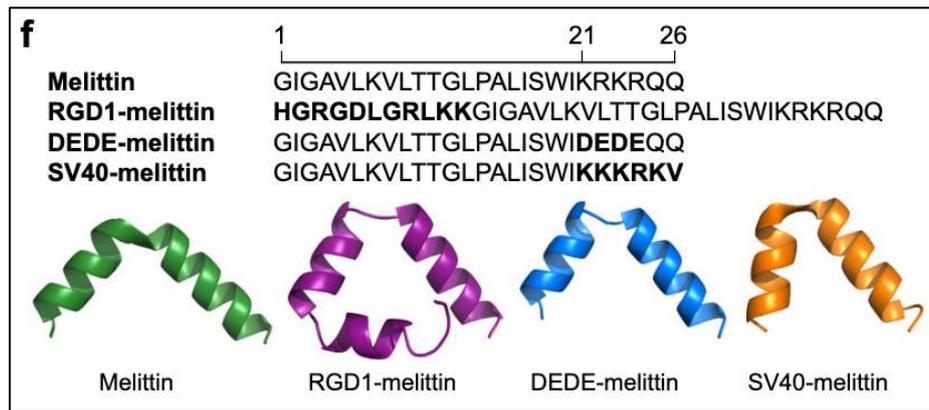


Figure 42 : Structures quaternaires de la melittine

(55)

On observe ci-dessus que dans les structures tridimensionnelles de la melittine, la RGD1-melittine, la DEDE-melittine et la SV40-melittine (ajout d'une séquence positive issue du virus simien 40 pour améliorer la pénétration dans la cellule), l'hélice est préservée. Cependant, on a vu que l'activité anti-cancéreuse n'était pas la même, et cela serait dû non pas aux modifications des peptides au sein de la structure mais plutôt à cause de l'influence électrostatique de la membrane vis-à-vis des protéines et inversement. Les perturbations proviendraient donc des différences de charge et non d'acides aminés.

Après avoir démontré l'activité anticancéreuse de la melittine via son interaction plus ou moins sélective sur la membrane selon le type de cellule, cancéreuse ou non, attardons-nous désormais sur l'action anticancéreuse de la melittine via son effet sur les voies de signalisation cellulaires et plus particulièrement sur l'inactivation de certains récepteurs membranaires.

Dans les types de cancer du sein exprimant les récepteurs tyrosine kinase HER2 et EGFR, la melittine exerce une action inhibitrice en empêchant la phosphorylation de ces derniers, et par conséquent leur activation ainsi que la cascade de signalisation en aval. Ce sont les voies de signalisation ras/MAPK et PI3K/aKT qui sont concernées.

Pour le démontrer, un western blot a été réalisé sur les cellules qui expriment les deux récepteurs (SKRB) et sur des cellules qui expriment l'EGFR (SUM) traitées par le venin ou la melittine seule.

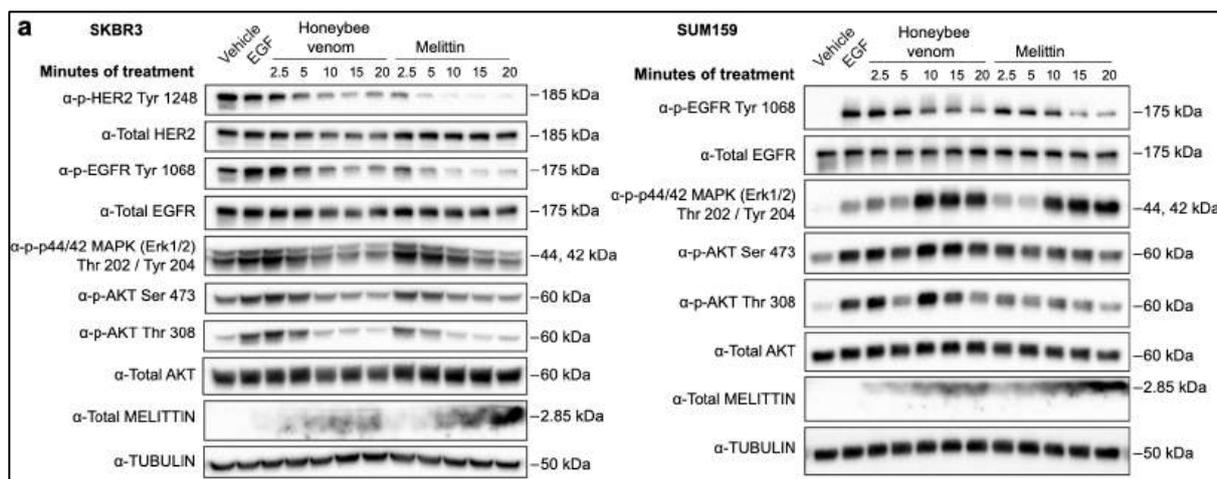


Figure 43 : Comparaison des effets de la melittine et du venin d'abeille sur plusieurs lignées.

(55)

Pour les cellules SKBR (HER2+ et EGFR+), la phosphorylation des récepteurs est nettement diminuée avec une baisse plus significative pour la melittine seule que pour le venin d'abeille, et cela est constaté pour les deux récepteurs. Il y a également une baisse de l'expression d'AKT.

Pour les cellules SUM (EGFR+), la phosphorylation du récepteur est diminuée par le traitement du venin et de la melittine et l'expression de AKT est aussi régulée négativement, cependant on observe une hausse de l'expression de MAPK. Cela serait expliqué par la mise en place par la cellule d'un rétrocontrôle négatif qui déclencherait la voie de signalisation MEK/ERK pour contrer l'apoptose provoquée par la melittine ou le venin d'abeille.

Toujours dans le but de prouver que la melittine interfère avec l'activation des récepteurs, une expérience a été réalisée en mesurant le blocage de la liaison de l'EGF à son récepteur en mesurant le transfert d'énergie par résonance de bioluminescence ou BRET. Le principe est de mesurer ainsi le transfert d'énergie entre une molécule fluorescente et une molécule électroluminescente. On a donc fusionné la molécule électroluminescente à l'EGFR et on a étudié la cinétique et la saturation du récepteur avec les molécules fluorescentes réceptrices d'énergie qui sont TAMRA-EGF (le contrôle positif), FITC-mélittine et FITC-DEDE-mélittine (les contrôles négatifs). Lorsqu'il y a un transfert d'énergie, cela signifie qu'il y a bien une interaction entre les molécules.

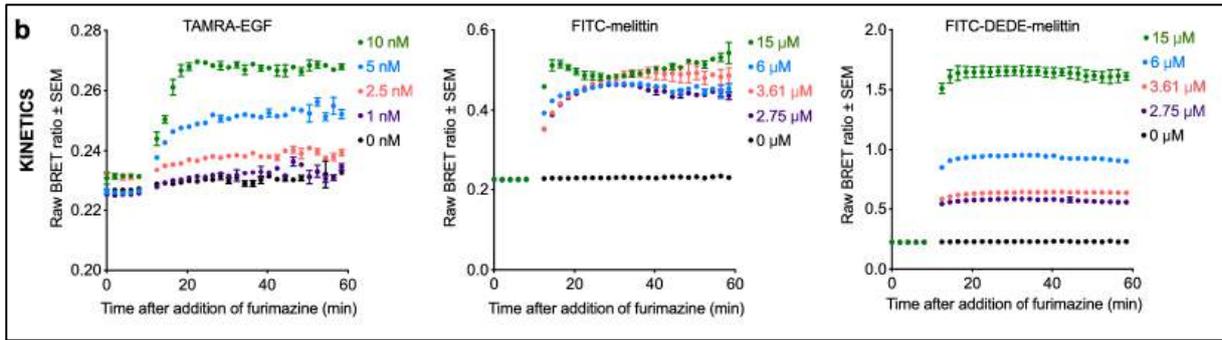


Figure 44 : Étude par technique BRET de la liaison melittine-récepteur

(55)

On observe ainsi que le signal BRET est augmenté en fonction de la dose pour TAMRA-EGF et FITC-melittine et qu'il est presque constant pour FITC-melittine.

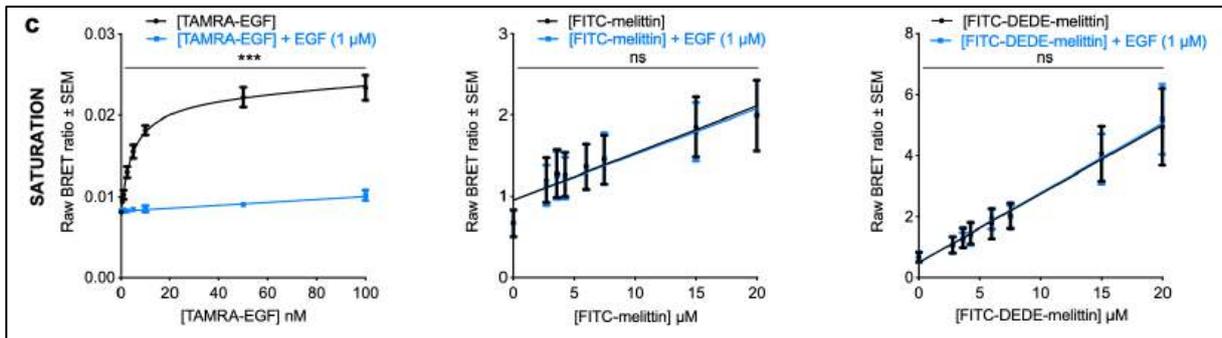


Figure 45 : Étude par technique BRET de la saturation au récepteur EGFR

(55)

Dans un second temps, la saturation a été étudiée pour déterminer la spécificité de la liaison de la melittine au récepteur EGFR et ainsi voir le niveau de compétition entre la melittine et le ligand naturel EGF. Pour TAMRA-EGF, en présence d'EGF, la liaison est significativement diminuée. Concernant FITC-melittine et FITC-DEDE-melittine, avec ou sans EGF, la liaison n'est pas saturable et il n'y a aucune différence significative. Cela signifie que la melittine et la DEDE-melittine ne rentrent pas en compétition avec l'EGF.

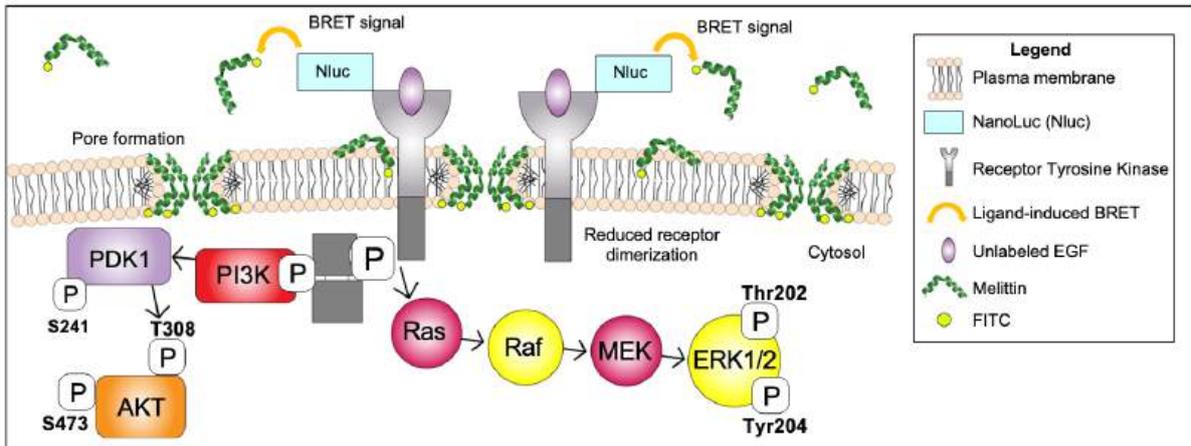


Figure 46 : Figure récapitulative des actions de la melittine.

(55)

Pour résumer, on retient que la melittine exerce son action anticancéreuse en s'incorporant au sein de la membrane plasmique grâce à son extrémité C-terminale chargée positivement pour y former des pores, provoquant ainsi une lyse membranaire. En parallèle, elle interagit indirectement sur les voies de signalisation intracellulaire en se fixant sur des récepteurs tyrosine-kinase sans compétitivité, engendrant un défaut de signalisation et une action pro-apoptotique en aval.

La dernière partie de cette étude met en évidence le fait que la melittine sensibiliserait les cellules vis-à-vis des traitements du cancer triple négatif par le docétaxel, par effet de synergie. Pour cette partie, on a utilisé des cellules murines traitées par une association docétaxel/melittine ou docétaxel/venin d'abeille et on a mesuré leur viabilité.

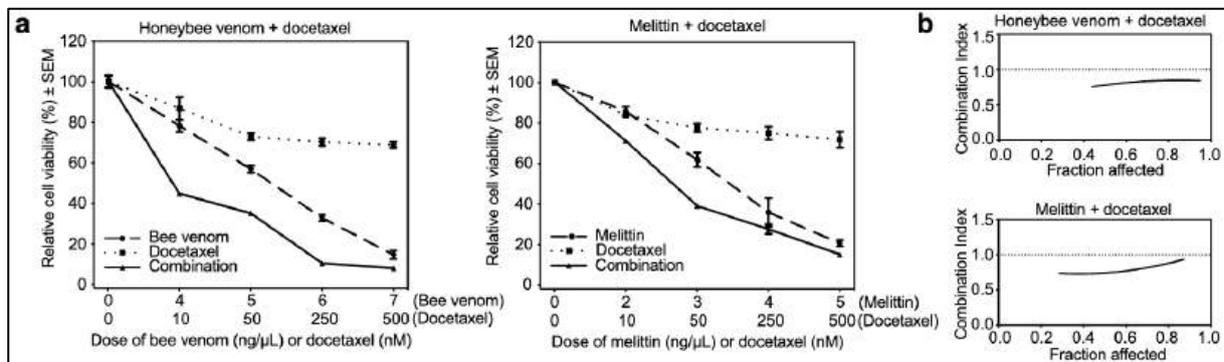


Figure 47 : Comparaison du taux de survie cellulaire après traitement melittine/docétaxel ou venin d'abeille/docétaxel.

(55)

On observe une diminution significative de la viabilité pour les cellules traitées par la combinaison, que ce soit avec le venin ou la melittine seule. De plus, un logiciel a permis de déterminer l'indice de combinaison (IC) entre les différents traitements. L'IC étant inférieur à 1, cela signifie qu'il y a une synergie importante dans les deux situations.

Toujours dans le but de prouver l'efficacité de l'association, des expériences *in vivo* ont été réalisées, plus précisément sur des souris sur lesquelles on a réalisé une allogreffe de cellules cancéreuses (cancer triple négatif).

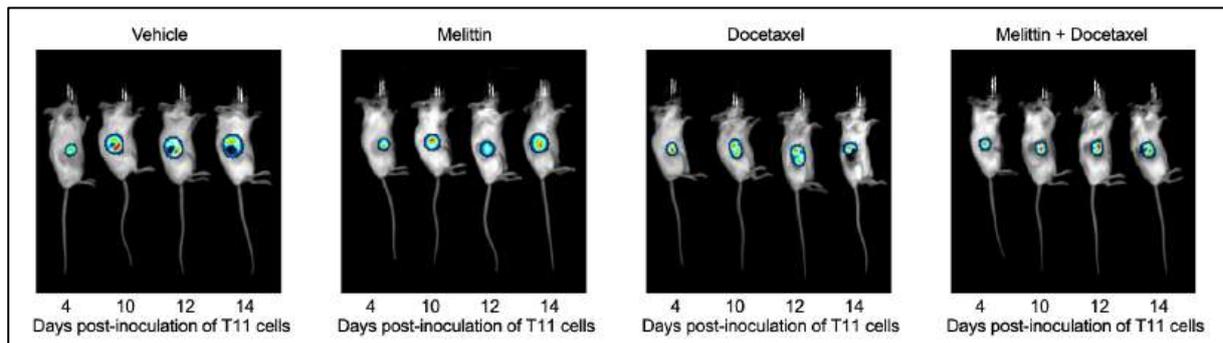


Figure 48 : Comparaison de la taille de tumeur chez des groupes de souris placebo ou traités (55)

On a créé quatre groupes de souris : un groupe témoin, un groupe traité par le docétaxel seul, un groupe traité par la melittine seule et enfin un groupe traité par la combinaison docétaxel/melittine pour un total de sept traitements administrés par voie intra tumorale. Les résultats ont été observés grâce à l'imagerie par bioluminescence, après avoir marqué les tumeurs à la luciférase. On a ainsi pu constater qu'il y avait une diminution significative de la taille de la tumeur dans le groupe traité par la combinaison. Cela sous-entend qu'une tumeur résistante au docétaxel pourrait devenir sensible au traitement grâce à l'ajout de la melittine.

On a enfin réalisé une immunohistochimie et de l'immunofluorescence sur des biopsies de tumeurs récupérées après 14 jours d'inoculation par l'anticorps anti-melittine, l'anticorps Ki-67 (l'antigène Ki-67 est un marqueur de prolifération), le test TUNEL (qui détecte les cellules en apoptose), la coloration Hoeschst (qui permet de marquer l'ADN), et pour finir l'anticorps anti-PD-L1 (PD-L1 est un marqueur tumoral). Cela a pour but de localiser ces protéines dans les tissus grâce à la détection d'antigènes au moyen d'anticorps.

On a donc pu confirmer grâce à l'immunohistochimie que la mélittine est bien localisée au sein de la tumeur lors d'administration de melittine seule ou associée. Ensuite, via l'expression de l'antigène Ki-67, on constate qu'il y a une diminution significative de la prolifération cellulaire

dans le groupe traité par l'association melittine/docétaxel. La coloration TUNEL montre que la melittine et le docétaxel entraîne de façon individuelle l'apoptose mais on observe que l'association des deux engendre l'apoptose de façon plus significative par rapport au témoin.

La protéine PD-L1 est une protéine présente à la surface des cellules tumorales, elle se lie à une autre protéine de surface, PD-1, présente sur les cellules immunitaires et leur liaison inactive les mécanismes de défense du système immunitaire (56). Par conséquent, en immunothérapie, on tente de bloquer cette liaison pour que la tumeur ne contrôle le système immunitaire. A travers l'immunohistochimie, on constate que le docétaxel ne modifie pas l'expression de PD-L1 au sein de la tumeur, à la différence de la melittine qui la fait diminuer significativement, seule ou en association par rapport au témoin.

Par conséquent, on retient que la melittine est un atout majeur dans le blocage des points de contrôles immunitaires et qu'associée au docétaxel, l'induction de l'apoptose est amplifiée et le but thérapeutique recherché est atteint (57).

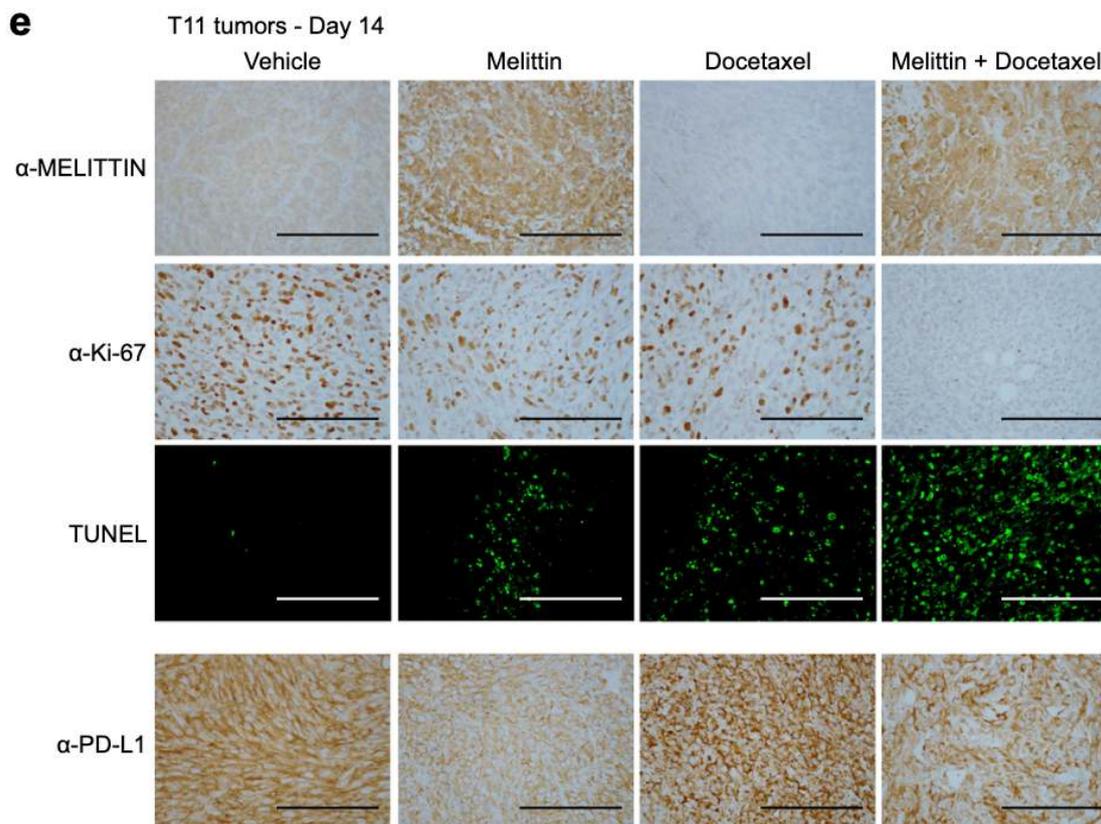


Figure 49 : Immunohistochimie et de l'immunofluorescence sur des biopsies de tumeurs

(55)

Cette étude a finalement mis en évidence la sélectivité de la melittine pour les cellules tumorales et notamment des cellules retrouvées dans des cancers particulièrement agressifs comme le cancer du sein triple négatif.

Il a été montré que la melittine inhibe les voies de signalisation qui découlent de l'activation de l'EGFR et de l'HER2, provoquant un effet pro-apoptotique.

L'étude a mis en évidence les parties structurales indispensables à la melittine pour exercer son effet anti-tumoral.

Enfin, l'étude a prouvé la capacité de la melittine à agir en synergie avec des traitements plus classiques en sensibilisant les cellules cancéreuses, en amplifiant l'effet du traitement associé et en diminuant l'immunosuppression provoquée par la micro-atmosphère de la tumeur.

L'utilisation du venin d'abeille à plus grande échelle semble prometteuse et cette étude considère cette matière première plutôt rentable et accessible notamment dans des zones où la recherche est moins développée. Cependant, des progrès restent à faire notamment sur l'étude des différents venins, afin de les comparer entre eux pour voir s'il y a une différence d'efficacité en fonction du type d'abeille à l'origine (58).

CONCLUSION

Le venin d'abeille est une substance incroyablement intéressante car, outre son action de défense indispensable à la vie de l'abeille, il est composé de protéines au spectre d'action très complexe et riche en propriétés.

Notre molécule d'intérêt, la melittine, se démarque par son double mécanisme d'action, la lyse cellulaire d'une part, et l'interaction avec les voies de signalisation cellulaire de l'autre. C'est un atout qui a forcément intrigué le monde scientifique pour l'exploiter à des fins thérapeutiques. Sa capacité à provoquer l'apoptose de cellules tumorales et agir en synergie avec des thérapies de première ligne positionne la melittine comme un bon candidat-médicament pour des études cliniques.

A ce jour, étudier la melittine n'est pas simple pour la recherche car c'est une matière première qui n'est pas facilement accessible. L'obtenir sans tuer les abeilles est une priorité, mais les méthodes décrites par électrostimulation ne garantissent pas une absence de perturbation de l'équilibre de la ruche. Nous n'avons pas encore assez de recul ni de données nous permettant de l'affirmer. De plus, l'élevage d'abeille n'est pas inné, il nécessite des connaissances fondamentales en apiculture et la production de venin n'est pas une science exacte.

Les études actuelles de l'effet de la melittine sur le cancer sont prometteuses et les premiers résultats sont significatifs vis-à-vis de l'effet recherché. Cependant, les études n'ont pas dépassé le stade préclinique, c'est-à-dire que l'on a testé la melittine uniquement in vivo sur des souris. De nombreux obstacles sont à franchir et il reste encore beaucoup de questionnement quant au coût financier que représenterait l'utilisation de la melittine à l'échelle de l'industrie pharmaceutique. En effet, une quantité colossale de melittine serait nécessaire et son obtention par des méthodes quelque peu artisanales bien que standardisées semble compliquée.

Espérons que la dynamique scientifique gravitant autour du venin d'abeille garde la même cadence et que l'on puisse peut-être un jour synthétiser la melittine en laboratoire sans solliciter les abeilles pour exploiter au maximum son potentiel et l'élargir à plusieurs types de cancer.

BIBLIOGRAPHIE

1. Darrigol J-L. Apithérapie : miel, pollen, propolis, gelée royale, apis mellifica, venin d'abeille & autres remèdes, hydromel, oxymels, mellites, cire, cérats, électuaires, aromiels. Escalquens: Dangles éditions; 2017. (Collection Référence).
2. Domerego R, Imbert G, Blanchard C. La médecine des abeilles: miel, pollen, propolis, gelée royale... au quotidien. Digne-les-Bains: Baroch éditions; 2016.
3. Henri Clément. Le traité Rustica de l'apiculture. 2015^e éd. Rustica éditions;
4. Comment fonctionne la trophallaxie chez l'abeille ? [Internet]. [cité 15 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.apiculture.net/blog/la-trophallaxie-chez-l-abeille-n283>
5. L'apithérapie [Internet]. [cité 14 avr 2021]. Disponible sur: <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01735147/document>
6. 1 - La carte d'identité du pollen [Internet]. Encyclo Pollens. [cité 22 juill 2021]. Disponible sur: <http://www.encyclopollens.fr/la-face-cachee-des-pollens/la-carte-didentite-du-pollen/>
7. Le transport du pollen - Manuel numérique max Belin [Internet]. [cité 22 juill 2021]. Disponible sur: https://manuelnumeriquemax.belin.education/svt-terminale/topics/svt-tle-c10-250-a_le-transport-du-pollen
8. Denisow et Denisow-Pietrzyk - 2016 - Biological and therapeutic properties of bee polle.pdf [Internet]. [cité 22 juill 2021].
9. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2017;2017:1-21.
10. La cire d'abeille | Apitherapie Francophone [Internet]. [cité 4 août 2021]. Disponible sur: <https://www.apitherapiefrancophone.com/la-cire-dabeille/>
11. ENCYCLOPEDIE UNIVERSELLE DE LA LANGUE FRANCAISE - ABEILLES - ANATOMIE - ABDOMEN 1 [Internet]. [cité 4 août 2021]. Disponible sur: <http://www.encyclopedie-universelle.net/abeille1/abeille-anatomie-abdomen.html#ancre2639665>
12. Pucca et al. - 2019 - Bee Updated Current Knowledge on Bee Venom and Be.pdf [Internet]. [cité 7 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6743376/pdf/fimmu-10-02090.pdf>
13. aiguillon texte definitif.pdf [Internet]. [cité 4 août 2021]. Disponible sur: <https://www.microscopies.com/DOSSIERS/Magazine/Articles/D-BIARRAT-Aiguillon/aiguillon%20texte%20definitif.pdf>
14. ENCYCLOPEDIE UNIVERSELLE DE LA LANGUE FRANCAISE - ABEILLES - ANATOMIE - ABDOMEN 1 [Internet]. [cité 4 août 2021]. Disponible sur: <http://www.encyclopedie-universelle.net/abeille1/abeille-anatomie-abdomen.html#ancre2639665>
15. Fayet A. Morphologie externe de l'abeille mellifère6. :2.
16. Wehbe R, Frangieh J, Rima M, El Obeid D, Sabatier J-M, Fajloun Z. Bee Venom: Overview of Main Compounds and Bioactivities for Therapeutic Interests. Molecules. 19 août 2019;24(16):2997.

17. Carpena et al. - 2020 - Bee Venom An Updating Review of Its Bioactive Mol.pdf [Internet]. [cité 6 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/11/3360/pdf>
18. Krell R, Nations F and AO of the U. Value-added Products from Beekeeping. Food & Agriculture Org.; 1996. 428 p.
19. Le venin d'abeille - une arme redoutable en apithérapie [Internet]. [cité 6 sept 2021]. Disponible sur: <https://apiscera.com/le-venin-dabeille/>
20. Wehbe R, Frangieh J, Rima M, El Obeid D, Sabatier J-M, Fajloun Z. Bee Venom: Overview of Main Compounds and Bioactivities for Therapeutic Interests. *Molecules*. 19 août 2019;24(16):2997.
21. Mahmoodzadeh et al. - 2015 - First report on the isolation of melittin from Ira.pdf.
22. stallergenes-immunotherapie-hymenopteres.pdf [Internet]. [cité 23 févr 2022]. Disponible sur: <https://fr.eallergo-refonte.elsevier.cc/files/stallergenes-immunotherapie-hymenopteres.pdf>
23. Goya C. 6 médicaments fabriqués à partir de venin de serpent et d'autres toxines animales [Internet]. Business Insider France. 2019 [cité 6 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.businessinsider.fr/6-medicaments-fabriques-a-partir-de-venin-de-serpent-et-dautres-toxines-animales/>
24. Robert J. Oncogénèse et progression des cancers: bases biologiques de la cancérologie. Paris: Lavoisier Médecine Sciences; 2020. (Oncologie).
25. Cancer [Internet]. [cité 6 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
26. Boutin et Vaganay - « Inhibition de NF-κB par des diterpénoides ».pdf [Internet]. [cité 17 sept 2021]. Disponible sur: <http://www.m2p-egpr.ups-tlse.fr/Documents%20archives/13-NFkBditerpenoides.pdf>
27. Lièvre et Laurent-Puig - 2010 - La voie de signalisation RASMAPK.pdf [Internet]. [cité 21 sept 2021]. Disponible sur: http://documents.irevues.inist.fr/bitstream/handle/2042/30747/Cancero_dig_2010_1_038_042.pdf
28. Robert J. Signalisation cellulaire et cancer: bases biologiques de la cancérologie. 2e édition. Paris: Lavoisier-Médecine Sciences; 2017. (Oncologie).
29. Lièvre A, Laurent-Puig P. La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancérologie* [Internet]. 2010 [cité 21 sept 2021];II(1). Disponible sur: <http://hdl.handle.net/2042/30747>
30. Chantal Dreyer, Eric Raymond, Sandrine Faivre. La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. *Cancérologie*. 2009;1(3):187.
31. Chap_7.pdf [Internet]. [cité 29 sept 2021]. Disponible sur: http://www.cri-net.com/ckfinder/userfiles/files/formation/fichesImmuno/Chap_7.pdf
32. Oršolić N. Bee venom in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev*. juin 2012;31(1-2):173-94.
33. Raghuraman H, Chattopadhyay A. Melittin: a Membrane-active Peptide with Diverse Functions. *Bioscience Reports*. 6 août 2007;27(4-5):189-223.
34. Bachmayer H, Kreil G, Suchanek G. Synthesis of promelittin and melittin in the venom gland of queen and worker bees: Patterns observed during maturation. *Journal of Insect Physiology*. 1 août 1972;18(8):1515-21.

35. Guha S, Ferrie RP, Ghimire J, Ventura CR, Wu E, Sun L, et al. Applications and evolution of melittin, the quintessential membrane active peptide. *Biochemical Pharmacology*. 1 nov 2021;193:114769.
36. Terwilliger TC, Weissman L, Eisenberg D. The structure of melittin in the form I crystals and its implication for melittin's lytic and surface activities. *Biophysical Journal*. janv 1982;37(1):353-61.
37. Gajski G, Garaj-Vrhovac V. Melittin: A lytic peptide with anticancer properties. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. sept 2013;36(2):697-705.
38. Ramirez LS, Pande J, Shekhtman A. Helical Structure of Recombinant Melittin. *J Phys Chem B*. 17 janv 2019;123(2):356-68.
39. Hong J, Lu X, Deng Z, Xiao S, Yuan B, Yang K. How Melittin Inserts into Cell Membrane: Conformational Changes, Inter-Peptide Cooperation, and Disturbance on the Membrane. *Molecules*. 7 mai 2019;24(9):1775.
40. Rady I, Siddiqui IA, Rady M, Mukhtar H. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Letters*. 28 août 2017;402:16-31.
41. Raghuraman et Chattopadhyay - 2007 - Melittin a Membrane-active Peptide with Diverse F.pdf [Internet]. [cité 12 oct 2021]. Disponible sur: https://journals.scholarsportal.info/pdf/01448463/v27i4-5/189_mampwdf.xml
42. Caday CG, Steiner RF. The interaction of calmodulin with melittin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 13 mars 1986;135(2):419-25.
43. Jo M, Park MH, Kollipara PS, An BJ, Song HS, Han SB, et al. Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1 janv 2012;258(1):72-81.
44. Wehbe et al. - 2019 - Bee Venom Overview of Main Compounds and Bioactiv.pdf.
45. Liu et al. - 2008 - Melittin prevents liver cancer cell metastasis thr.pdf [Internet]. [cité 14 janv 2022]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1002/hep.22240>
46. Lotte - Caractérisation des interactions moléculaires entr.pdf [Internet]. [cité 17 janv 2022]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01691548/document>
47. Wang et al. - 2022 - Melittin-Based Nano-Delivery Systems for Cancer Th.pdf.
48. Sarhan M, El-Bitar AMH, Hotta H. Potent virucidal activity of honeybee "Apis mellifera" venom against Hepatitis C Virus. *Toxicon*. 1 déc 2020;188:55-64.
49. Lee et Bae - 2016 - Anti-Inflammatory Applications of Melittin, a Majo.pdf.
50. Chen et al. - 2016 - Melittin, the Major Pain-Producing Substance of Be.pdf [Internet]. [cité 24 janv 2022]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5563768/pdf/12264_2016_Article_24.pdf
51. Hajjali - Assemblage nanoparticules lipidiques solides-polys.pdf [Internet]. [cité 9 févr 2022]. Disponible sur: <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754631/document>
52. de Graaf et al. - 2021 - Standard methods for Apis mellifera venom r.pdf [Internet]. [cité 23 févr 2022]. Disponible sur: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/00218839.2020.1801073>
53. Ingrand J. La spectrométrie de masse et ses principales applications en biologie médicale. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 1 avr 2012;27(2):47-53.

54. HPLC Principe et appareillage.pdf [Internet]. [cité 25 févr 2022]. Disponible sur: https://biotech.spip.ac-rouen.fr/IMG/article_PDF/HPLC-Principe-et-appareillage_a9.pdf
55. Duffy C, Sorolla A, Wang E, Golden E, Woodward E, Davern K, et al. Honeybee venom and melittin suppress growth factor receptor activation in HER2-enriched and triple-negative breast cancer. *npj Precis Onc.* déc 2020;4(1):24.
56. Comment fonctionne l'immunothérapie anti-PD1/anti-PDL1 ? [Internet]. *Mon cancer.* [cité 6 avr 2022]. Disponible sur: <https://mon-cancer.com/articles-blog/comment-fonctionne-limmunotherapie-anti-pd1-anti-pdl1/>
57. Duffy et al. - 2020 - Honeybee venom and melittin suppress growth factor.pdf [Internet]. [cité 14 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41698-020-00129-0.pdf>
58. Duffy et al. - 2020 - Honeybee venom and melittin suppress growth factor.pdf [Internet]. [cité 17 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41698-020-00129-0.pdf>