



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 25/11/14

par

M. GACHE Damien

Né le 06/03/1991

à Saint Vallier (26240)

**LES TOXINES CIBLANT LES CANAUX SODIQUES VOLTAGE DÉPENDANTS :
OUTILS D'ÉTUDES ET APPLICATIONS POTENTIELLES**

JURY

Pr. Luc ZIMMER, Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Pharmacologie

Dr. Bruno FOUILLET, Maître de conférences des Universités, Toxicologie

Dr. Patrick BRETON, Expert toxicologue, Direction Générale de l'Armement

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Président de l'Université	M. François-Noël GILLY
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil Scientifique	M. Germain GILLET
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe LALLE

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : M. Jérôme ETIENNE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directeur : Mme Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directeur : M. Denis BOURGEOIS
Institut des Techniques de Réadaptation	Directeur : M. Yves MATILLON
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directeur : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Fabien DE MARCHI
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL)	Directeur : M. Pascal FOURNIER
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon

Directrice : Madame la Professeure Christine VINCIGUERRA

**Directeurs Adjoints : Madame S. BRIANCON, Monsieur P. LAWTON, Monsieur P. NEBOIS
Madame S. SENTIS, Monsieur M. TOD**

Directrice Administrative : Madame P. GABRIELE

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET
PHARMACIE GALENIQUE**

CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU)
Madame Christelle MACHON (AHU)

PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE

Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Madame Joëlle BARDON (MCU - HDR)
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (MCU - HDR)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU - HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Monsieur Fabrice PIROT (MCU - PH - HDR)
Monsieur Patrice SEBERT (MCU - HDR)

BIOPHYSIQUE

Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

DROIT DE LA SANTE

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

ECONOMIE DE LA SANTE

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)

INFORMATION ET DOCUMENTATION

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)

Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)

Monsieur François COMET (MCU)

Monsieur Vincent GROS (MCU PAST)

Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

MATHEMATIQUES – STATISTIQUES

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU)

Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)

Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

CHIMIE ORGANIQUE

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)

Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)

Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)

Madame Christelle MARMINON (MCU)

Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)

Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Monsieur Roland BARRET (Pr)

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)

Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)

Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)

Madame Isabelle KERZAON (MCU)

Monsieur Serge MICHALET (MCU)

PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)

Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)

Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)

Madame Catherine RIOUFOL (MCU - PH - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

TOXICOLOGIE

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)
Madame Léa PAYEN (MCU -HDR)

PHYSIOLOGIE

Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

PHARMACOLOGIE

Monsieur Bernard RENAUD (Pr)
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Madame Bernadette ASTIER (MCU - HDR)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Monsieur Olivier CATALA (Pr PAST)
Monsieur Pascal THOLLOT (MCU PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

IMMUNOLOGIE

Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)

HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE

Madame Christine TROUILLOT-VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Olivier ROUALDES (AHU)

MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (AHU)

PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)

Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)

Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE

Madame Pascale COHEN (Pr)

Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)

Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)

Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH)

Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)

Madame Angélique MULARONI (MCU)

Madame Stéphanie SENTIS (MCU)

Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)

Monsieur Benoit DUMONT (AHU)

BIOLOGIE CELLULAIRE

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)

Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Monsieur Philippe LAWTON (Pr - HDR)

Madame Angélique MULARONI (MCU)

Monsieur Patrice SEBERT (MCU – HDR)

Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques

Madame Emilie BLOND

Madame Christelle MOUCHOUX

Madame Florence RANCHON

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Monsieur Eyad AL MOUAZEN 85ème section

Monsieur Boyan GRIGOROV 87ème section

Madame Mylène HONORAT 85ème section

Monsieur Abdalah LAOUINI 85ème section

Madame Marine CROZE 86ème section

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

SOMMAIRE

Liste des figures	14
Introduction	15
Partie I : Les canaux sodiques voltage dépendants	17
1. Découverte et historique.....	18
2. Description du canal	18
2.1 Rôle et localisation	18
2.2 Structure.....	19
2.2.1 La sous unité alpha.....	19
2.2.2 La sous unité beta.....	20
* Beta 1 et Beta 3.....	20
* Beta 2 et Beta 4	20
2.3 Nomenclature.....	21
* Les isoformes sensibles à la TTX.....	21
* Les isoformes résistants à la TTX.....	21
2.4. Propriétés du canal.....	22
2.4.1. Sélectivité.....	22
2.4.2. La sensibilité au voltage	23
2.4.3. Inactivation	23
*Inactivation rapide	23
*Inactivation lente	24
3. Pharmacologie du canal: sites d'interaction du canal avec des toxines et des médicaments	24
3.1. Sites d'interaction avec les neurotoxines	25
*Interaction au niveau du pore du canal : le site récepteur 1.....	25
*Interaction altérant la dépendance au voltage	26
** Toxines se fixant sur des sites intra membranaires	26
***Le site 2	26
***Le site 5	27
** Toxines se fixant sur des sites extracellulaires	27
***Le site 3	28
***Le site 4	28
***Le site 6	29

3.3 Tableau récapitulant les sites d'interactions avec les neurotoxines.....	30
3.3 Site d'interaction avec les médicaments: ou "site 9"	31
3.4 Site d'interaction avec les insecticides: ou " site 7"	31

Partie II : Les toxines ciblant les canaux sodiques voltage dépendants..... 32

A) Les neurotoxines marines..... 33

1. Les toxines guanidiques accumulées dans la chaîne alimentaire marine..... 33

1.1) La Tetrodotoxine (TTX)..... 33

1.1.1 Historique..... 33

1.1.2 Répartition..... 34

1.1.3 Origine..... 34

1.1.4 Structure..... 35

1.1.5 Analogues de la TTX..... 36

1.1.6 Mode d'action..... 36

1.1.7 Intérêt de la TTX chez l'animal..... 36

1.1.8 Résistance à la TTX..... 37

1.1.9 Dose toxique..... 37

1.1.10 Clinique de l'intoxication

1.1.11 Prise en charge..... 39

1.1.12 Prévention..... 39

1.2) La Saxitoxine (STX)..... 40

1.2.1 Historique..... 40

1.2.2 Répartition..... 40

1.2.3 Structure de la STX et de ses analogues..... 41

1.2.4 Biosynthèse et synthèse chimique..... 42

1.2.5 Toxicité..... 42

1.2.6 Détection et quantification

1.2.7 Mode d'action..... 43

1.2.8 Clinique du PSP (Paralytic Shellfish Poisoning)..... 44

1.2.9 Intoxication par contact

1.2.10 Prise en charge

1.2.11 La STX comme potentielle arme de bioterrorisme..... 45

1.2.11.1 Historique et classification.....	45
1.2.11.2 Voies potentielles d'intoxication.....	45
1.2.11.3 Diagnostic et traitement.....	45
1.2.11.4 Prévention.....	46
2) Les brévétoxines et les ciguatoxines.....	47
2.1) Les ciguatoxines (CTX).....	47
2.1.1 Répartition et Origine.....	47
2.1.2 Structure.....	48
2.1.3 Toxicologie.....	49
2.1.4 Clinique aigüe de l'intoxication.....	49
2.1.5 Symptômes chroniques et récurrence.....	50
2.1.6 Prise en charge.....	50
2.1.7 Diagnostic et analyse.....	51
2.1.8 Prévention.....	52
2.2) Les brévétoxines.....	53
2.2.1 Origine.....	53
2.2.2 Structure.....	53
2.2.3 Intérêt biologique des brévétoxines.....	55
2.2.4 Pharmacocinétique et Toxicité.....	56
2.2.5 Intoxications Humaines.....	56
2.2.5.1 NSP : Neurotoxic Shellfish Poisoning.....	56
2.2.5.2 Intoxication par aérosol.....	57
2.2.6 Le brevenal.....	58
2.2.7 Prévention.....	59
3) Les conotoxines.....	61
3.1 Les cônes.....	61
3.2 Clinique de l'envenimation chez l'homme.....	61
3.3 Le venin de cône.....	61
3.4 Structure et caractéristiques des conotoxines.....	62
3.5 Nomenclature des conotoxines.....	63
3.6 Classification des conotoxines.....	63

3.6.1 la super famille M: Les μ -conotoxines	63
3.6.2 La super famille O.....	64
* Les μ O-conotoxines.....	64
*Les δ -conotoxines.....	65
3.6.3 Les ι -conotoxines.....	65
3.7 Intérêt des conotoxines.....	65
3.8 Synthèse.....	66
4) Les toxines d'anémone de mer.....	67
4.1 Historique.....	67
4.2 Venin des anémones.....	67
4.3 Recueil du venin et purification des toxines:.....	68
4.4 Structure.....	68
4.5 Classification des toxines.....	68
4.5.1 Type I et II.....	69
4.5.2 Type III.....	69
4.5.3 Type IV.....	69
4.6 Structure activité.....	69
4.7 Cible des toxines.....	70
4.8 Toxicité.....	70
4.9 Clinique de l'envenimation.....	70
<u>B) Les Toxines extraites des plantes.....</u>	72
1) La veratridine.....	72
1.1 Origine.....	72
1.2 Structure.....	72
1.3 Mécanisme d'action.....	73
1.4 Obtention	73
1.5 Analyse	74
1.6 Toxicité.....	74
1.7 Clinique de l'intoxication.....	74
1.8 Prise en charge.....	74

2) L'aconitine	76
2.1 Origine.....	76
2.2 Structure et Mécanisme d'action.....	76
2.3 Obtention.....	77
2.4 Analyse.....	77
2.5 Toxicité.....	77
2.6 Clinique de l'intoxication.....	77
2.7 Prise en charge.....	78
3) Les grayanotoxines	79
3.1 Origine	79
3.2 Intoxication chez l'homme.....	79
3.3 Structure.....	79
3.4 Mécanisme d'action.....	80
3.5 Toxicité.....	80
3.6 Clinique de l'intoxication.....	80
3.7 Prise en charge.....	81
3.8 Détection	81
3.9 Prévention.....	82
<u>C) Les toxines de venins d'animaux terrestres</u>	83
1) Les batrachotoxines	83
1.1 Origine.....	83
1.2 Structure.....	84
1.3 Mécanisme d'action.....	84
1.4 Toxicité.....	85
1.5 Clinique de l'intoxication.....	85
2) Les toxines de scorpions	86
2.1 Les scorpions.....	86
2.2 Le venin de scorpion.....	86
2.3 Structure et classification des toxines.....	87
2.3.1 Les toxines α de scorpion.....	87
2.3.2 Les toxines β de scorpion.....	88

2.4 Structure tridimensionnelle.....	88
2.5 Extraction.....	89
2.6 Synthèse.....	89
2.7 Toxicité.....	90
2.8 Clinique de l'envenimation.....	90
2.9 Prise en charge.....	91
2.10 Prévention.....	91
3) Les toxines d'araignées.....	92
3.1 Les araignées.....	92
3.2 Le venin d'araignée.....	93
3.3 Récupération du venin.....	94
3.4 Synthèse.....	94
3.5 Structure des toxines.....	95
3.6 Clasification des toxines d'araignées.....	95
3.6.1 Toxines occluant le pore: potentiels ligands du site 1.....	95
3.6.2 Toxines modifiant les cinétiques d'inactivation rapide: ligands du site 3.....	96
3.6.3 Toxines modifiant le potentiel d'activation: ligands du site 4.....	96
3.6.4 Le cas des delta palutoxines.....	97
3.6.5 Toxines dont le site d'interaction reste encore à identifier.....	97
3.7 Toxicité.....	98
3.8 Clinique de l'envenimation.....	98
3.9 Prise en charge.....	98
<u>Partie III : Application des toxines ciblant les canaux sodiques voltage dépendants</u>.....	100
1) Applications biomédicales.....	101
1.1 La douleur chronique.....	101
1.1.1 Les canaux sodiques voltage dépendants dans les mécanismes nociceptifs.....	101
1.1.2 Physiopathologie de la douleur.....	102
1.1.3 Rôle des différents isoformes.....	103
1.1.3.1 L'isoforme Nav1.7.....	103
1.1.3.2 L'isoforme Nav1.8.....	105
1.1.3.3 L'isoforme Nav1.9.....	106

1.1.3.4 L'isoforme Nav1.3.....	107
1.1.3.5 Les autres isoformes sodiques.....	107
1.1.4. Les toxines d'intérêt.....	108
1.1.4.1 Les μ -conotoxines.....	108
1.1.4.2 Les toxines d'araignées et de scorpions.....	109
1.1.4.3 Les batrachotoxines.....	109
1.1.4.4 La tétrodotoxine.....	109
1.1.5 Mise au point de dérivés.....	111
1.1.6 Stratégie d'administration des toxines.....	111
1.2 La dysfonction érectile : Les toxines Tx2-5 et Tx2-6.....	113
1.2.1 La dysfonction érectile.....	113
1.2.1.1 Prévalence.....	113
1.2.1.2 Physiopathologie.....	113
1.2.1.3 La voie du NO.....	113
1.2.1.4 Traitement actuel disponible.....	114
1.2.2 Les toxines d'intérêt : PnTx2-6, PnTx2-5.....	114
1.2.2.1 Observations cliniques.....	114
1.2.2.2 La fraction PhTx2 du venin de Phoneutria nigriventer.....	114
1.2.2.3 Pharmacocinétique : distribution des toxines.....	115
1.2.3 Données toxicologiques expérimentales.....	115
1.2.4 Détermination du mécanisme d'action des toxines.....	116
1.2.4.1 Implication de la voie du NO.....	116
1.2.4.2 Non implication des récepteurs muscariniques.....	117
1.2.4.3 Importance des canaux calciques.....	117
1.2.4.4 Indépendance des PDE5.....	117
1.2.4.5 Mécanisme d'action actuellement proposé pour ces toxines.....	117
1.2.4.6 Action au niveau périphérique et/ou central.....	118
1.2.5 Etudes sur des groupes d'animaux souffrant de dysfonction érectile.....	118
1.2.5.1 Les sujets âgés.....	118
1.2.5.2 Les sujets diabétiques.....	118
1.2.5.3 Les sujets souffrant d'hypertension artérielle.....	118
1.2.6 Synthèse des toxines.....	119
1.2.7 Conclusion.....	119

2) Les toxines sodiques comme insecticides	120
2.1 Les canaux sodiques d'insectes.....	120
2.2 Les insecticides actuels.....	120
2.2.1 Les pyréthriinoïdes.....	121
2.2.2 Les oxadiazines avec l'indoxacarbe.....	121
2.3 La résistance aux insecticides.....	121
2.4 Les études réalisées sur ces toxines.....	123
2.5 Les toxines d'intérêt.....	123
2.5.1 Les toxines d'araignées.....	123
2.5.2 Les toxines de scorpions.....	123
2.5.3 Les toxines d'anémone de mer.....	123
2.6 Stratégies d'utilisation.....	123
2.6.1 Les baculovirus recombinants.....	124
2.6.2 Les plantes transgéniques.....	124
2.6.3 Mise au point de dérivés synthétiques.....	125
2.7 Conclusion.....	125
Conclusion	126
Bibliographie	128

Liste des figures

- Figure 1 : Structure de la sous unité α
- Figure 2 : Structure de la sous unité β
- Figure 3 : Tableau présentant les neurotoxines ciblant les différents sites d'interactions
- Figure 4 : Structure de la TTX
- Figure 5 : Structure de la STX
- Figure 6 : Exemple de ciguatoxines : la ciguatoxine 3C
- Figure 7 : Structure des brevetoxines de type A
- Figure 8 : Structure des brevetoxines de type B
- Figure 9 : Structure du brevenal
- Figure 10 : Structure de la veratridine
- Figure 11 : Structure de l'aconitine
- Figure 12 : Structure de la Grayanotoxine I
- Figure 13 : Structure de la Grayanotoxine II
- Figure 14 : Structure de la Grayanotoxine III
- Figure 15 : Structure de la batrachotoxine
- Figure 16 : Structure de l'homobatrachotoxine

INTRODUCTION

Présents dans la membrane de nos cellules nerveuses, les canaux sodiques voltage dépendants tiennent un rôle majeur dans la régulation de nombreuses fonctions de l'organisme. En permettant l'entrée massive d'ions sodium en réponse à une modification du voltage membranaire, ces canaux sont responsables de l'initiation mais surtout de la propagation des potentiels d'actions électriques, signaux majeurs essentiels au bon fonctionnement du système nerveux. Ils sont toujours à l'heure actuelle peu connus et de nombreuses interrogations restent encore à lever sur leur structures tridimensionnelles, leurs interactions avec les autres acteurs des cellules nerveuses, ainsi que sur leurs véritables fonctions dans l'organisme. Les études se multiplient donc afin de mieux connaître ces canaux qui jouent un rôle déterminant dans l'influx nerveux.

Cependant, bien avant d'être la cible d'études de chercheurs, ces canaux sont depuis très longtemps la cible de neurotoxines. En effet de nombreuses molécules naturelles, de tailles et de structures chimiques différentes, se lient à ces canaux afin de perturber leurs fonctions. En liant le canal sur des sites d'interactions impliquant divers résidus, ces neurotoxines modifient alors les propriétés du canal ce qui aboutit à un ensemble de signes cliniques, principalement neurologiques, qui diffèrent selon les neurotoxines impliquées. Retrouvées fréquemment dans les venins, ces toxines sont utilisées en tant qu'arme biologique par de nombreux organismes terrestres et marins, animaux, végétaux ou bactéries.

Ces neurotoxines sont une source importante de compréhension du canal. En étudiant la clinique engendrée par l'administration d'une toxine, et en analysant les interactions moléculaires entre les sites du canal et les toxines, il est ainsi possible de mieux connaître la structure et les différents rôles physiologiques et pathologiques des canaux sodiques voltage dépendants. En comprenant mieux l'implication du canal dans certains processus pathologiques et en s'inspirant de la structure moléculaire de ces toxines, il serait envisageable de développer ainsi de nouveaux outils pharmacologiques. C'est en s'appuyant sur ce constat que des recherches sont menées à l'heure actuelle afin d'avoir plus de données sur les canaux sodiques voltage dépendants ainsi que sur les neurotoxines ciblant ces canaux.

Au travers de cette thèse, nous tenterons de faire le point sur les connaissances actuelles concernant ces neurotoxines. La première partie sera consacrée aux données collectées sur les canaux sodiques voltage dépendants en présentant leurs structures ainsi que leurs propriétés et leur pharmacologie en abordant le concept de sites d'interactions. Les neurotoxines seront abordées dans un deuxième temps en détaillant leur origines, leurs rôles biologiques, leur structures, les voies d'obtention possibles ainsi que les données toxicologiques et cliniques lors d'administrations accidentelles ou intentionnelles chez l'homme ou chez l'animal. Enfin il sera détaillé dans la dernière partie certains domaines dans lesquels les neurotoxines peuvent être utile en tant qu'outils pharmacologiques. Nous aborderons leur potentiel développement en tant qu'insecticide, ainsi que leur utilité en pathologie humaine, notamment dans le domaine de la douleur et de la dysfonction érectile.

Partie I : Les canaux sodiques **voltage dépendants**

1. Découverte et historique :

L'étude des courants au niveau d'une cellule a été développée grâce à la technique du patch clamp, qui a permis de mettre à jour la diversité des courants ioniques et leurs fonctions dans les organismes vivants. C'est en utilisant la technique du voltage-clamp que Hodgkin et Huxley en 1952 furent les premiers à décrire le courant sodique comme initiateur du potentiel d'action de l'influx nerveux [1]. Ils décrivent l'initiation du courant électrique par une activation du courant sodique voltage dépendant, entraînant une entrée d'ion sodium Na^+ . Ce courant sodique est alors inactivé après 1 à 2 ms, puis pour rétablir la balance électrique des charges à travers la membrane, un courant potassique est mis en jeu par la sortie des ions potassium K^+ .

En 1960, Hille et Armstrong décrivent des canaux ioniques spécifiques pour porter les courants sodiques et potassiques. De nombreuses études dans les années suivantes virent le jour afin de déterminer les propriétés fonctionnelles de ces canaux (sélectivité ionique, blocage de la conduction...).

Dans les années 70, de nombreux travaux, utilisant notamment des neurotoxines agissant sur ces canaux ioniques, ont permis de décrire plus précisément la structure de ce canal, ses localisations, et ses caractéristiques électrophysiologiques.

Récemment en 2011, l'équipe de Payandeh a pour la première fois présenté une représentation de la structure cristallographique en trois dimensions d'un canal sodique bactérien NavAb en haute définition. Cette découverte a permis de faire avancer la recherche sur les bases structurelles des fonctions des canaux sodiques voltages dépendants [2].

2. Description du canal :

2.1 Rôle et localisation :

Les canaux sodium voltage dépendants jouent donc un rôle majeur dans l'initiation et la propagation du potentiel d'action puisqu'ils sont responsables de la phase initiale de la dépolarisation membranaire. Ils sont retrouvés au niveau des neurones et des cellules électriquement excitables tels que les myocytes et les cellules endocrines [3]. Ils sont aussi exprimés à plus faible niveau dans des cellules non excitables, ils sont ainsi présents par exemple dans les lymphocytes, les cellules endothéliales, les cellules gliales, les fibroblastes ou encore dans les ostéoblastes. Cependant leur rôle physiologique dans ces tissus reste aujourd'hui incertain [4].

2.2 Structure :

Le canal est un complexe multimérique composé d'une sous unité alpha d'environ 260kDa associée à une ou plus fréquemment deux sous unités beta de 30 à 40kDa (complexes hétérodimérique ou hétérotrimérique) [2].

2.2.1 La sous unité alpha :

Exprimée seule, la sous unité alpha est suffisante pour la fonctionnalité du canal sodique (expérience menée par Noda en 1984).

La sous unité alpha est une protéine transmembranaire d'environ 260 kDa, soit approximativement 2000 acides aminés qui contient quatre domaines homologues mais non identiques (DI-DIV), chacun composé de six segments transmembranaires (S1-S6). Les quatre domaines s'assemblent entre eux au niveau de la membrane afin de former un pore central [2].

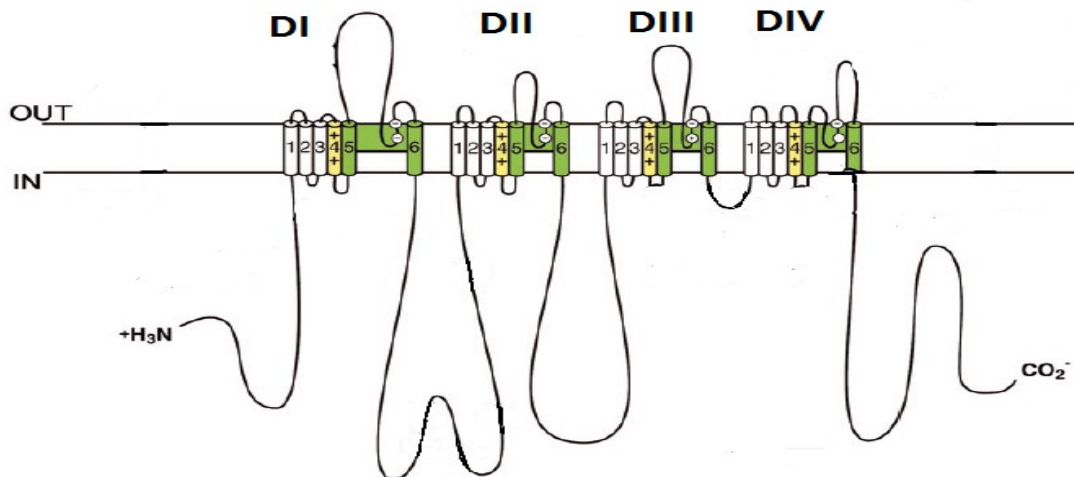


Figure 1 : Structure de la sous unité α [2]

Les parties N-terminale et C-terminale sont intracellulaires. La partie extérieure du canal est composée des boucles extracellulaires reliant les segments transmembranaires entre eux. Il existe également une boucle extracellulaire de grande taille, située entre les segments S5 et S6, appelée boucle P. Ces résidus exposés à l'extérieur sont le siège de modulations par glycosilation. De même des boucles entre chaque segment sont présentes du côté intracellulaire, permettant la régulation du canal notamment par phosphorylation [5].

2.2.2 La sous unité beta :

La sous unité beta consiste en un seul segment transmembranaire, avec un grand domaine extracellulaire glycosylé comportant une partie immunoglobuline like et un petit domaine intracellulaire C-terminal [5].

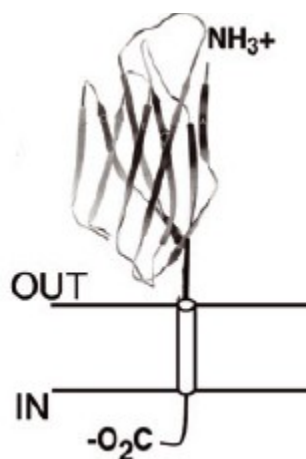


Figure 2 : Structure de la sous unité β [2]

Il existe quatre isoformes de sous unité beta : Beta 1 (36kDa), Beta 2 (33kDa), Beta 3 (25kDa) et Beta 4 (38kDa) [6]. Ces isoformes sont codés par 4 gènes différents, respectivement SCN1B, SCN2B, SCN3B, SCN4B. SCN1B est localisé sur le chromosome 19 alors que les trois autres se situent sur le chromosome 11. Ces isoformes peuvent être classés en 2 groupes:

* Beta 1 et Beta 3 :

La sous unité Beta 1 est retrouvée dans le cerveau, les muscles squelettiques et le muscle cardiaque ; et Beta 3 est présente au niveau des tissus neuronaux mais aussi au niveau du cœur.

Ces deux sous unités ont une séquence proche et sont associées de manière non covalente aux sous unités alpha.

* Beta 2 et Beta 4 :

D'autre part, Beta 2 est retrouvée dans le système nerveux central et le muscle cardiaque et Beta 4 dans le cerveau, le cœur et les muscles squelettiques. Ces sous unités sont en revanche reliées aux sous unités alpha par un pont disulfure: la partie extracellulaire immunoglobuline like des sous unités beta se lie à la boucle extracellulaire entre les segments S5 et S6 du domaine IV de la sous unité alpha [4].

Puisque la sous unité alpha est suffisante à la fonctionnalité du canal, les sous unités beta ont essentiellement une fonction régulatrice sur ces canaux. Elles exercent un contrôle des changements de conformations du canal (elles modifient la cinétique et le voltage nécessaire à l'activation du canal) [3], et régulent le niveau d'expression de la sous unité alpha dans la membrane plasmique. Elles exercent également un rôle dans l'interaction avec le cytosquelette, la matrice extracellulaire et d'autres molécules d'adhésion cellulaire [7].

2.3 Nomenclature :

Contrairement aux canaux calciques et potassiques dépendants du potentiel, les canaux sodiques ont des caractéristiques fonctionnelles et structurales très similaires.

Afin de nommer chaque isoforme du canal sodique, la nomenclature suivante a été retenue, calquée sur celle des autres canaux ioniques: Symbole chimique du canal (Na) suivi en indice par le principal régulateur physiologique (Nav pour voltage), le numéro suivant indique la sous-famille, puis un dernier numéro après un point permet de définir l'isoforme en question (par ordre d'identification) [8].

Actuellement, dans les cellules de mammifères, neuf isoformes de canaux sodiques voltage dépendants appartenant à une seule et même famille (Nav1) ont été caractérisés. Ces isoformes se distinguent par leurs propriétés biophysiques et par leur distribution tissulaire. Ils sont codés par 9 gènes différents, dont la séquence a été très conservée entre les différentes espèces [9]. Ces isoformes peuvent être classés par leur localisation ou par leur sensibilité à la tétrodotoxine (TTX).

*** Les isoformes sensibles à la TTX :**

Les isoformes Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6 et Nav1.7 sont dit sensibles à la TTX (la toxine bloque l'activité du canal et l'entrée du sodium dans la cellule).

Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, et Nav1.6 sont principalement retrouvés au niveau neuronal dans le système nerveux central [2]. Ils sont codés respectivement par les gènes SCN1A, SCN2A, SCN3A et SCN8A, tous localisés sur le chromosome 2 [9].

Nav1.7 est retrouvé au niveau du système nerveux périphérique et est codé par le gène SCN9A.

Nav1.4 est quant à lui retrouvé au niveau des muscles squelettiques et est codé par le gène SCN4A.

*** Les isoformes résistants à la TTX :**

D'autre part Nav1.5, Nav1.8, Nav1.9 sont dit TTX résistant (la présence de la neurotoxine n'empêche pas l'activité du canal et l'entrée d'ions sodium dans la cellule). Ils sont codés

respectivement par les gènes SCN5A, SCN10A, et SCN11A [9].

Nav1.8 et Nav1.9 sont exprimés comme Nav1.7 au niveau du système nerveux périphérique (notamment au niveau des ganglions rachidiens).

Nav1.5 est retrouvé au niveau du muscle cardiaque et est également retrouvé dans le muscle squelettique embryonnaire, avant de laisser la place à Nav1.4.

Remarque: Il est à noter que même si ces isoformes ont une localisation principale, leur distribution dans l'organisme est large et ils peuvent être localisés dans de nombreux autres tissus à des niveaux d'expression plus faibles [2].

Un 10^{ème} canal sodique apparenté (Nax) est exprimé au niveau du cœur, de l'utérus, des muscles lisses, des astrocytes et des neurones de l'hypothalamus et du système nerveux périphérique. Malgré environ 50% de correspondance dans leur séquences d'acide aminés, il est possible qu'il ne soit pas hautement sélectif au sodium ni entièrement voltage dépendant. Il serait impliqué notamment dans la sensibilité au sel [10].

2.4 Propriétés du canal :

2.4.1 Sélectivité :

Le canal sodique est très sélectif des ions Na⁺. La sélectivité de ce canal est reliée à la région du pore du canal, formé par les segments S5, S6 et la boucle P des quatre domaines qui se replient ensemble dans la membrane. Cette région correspond à la partie extérieure du pore. Deux anneaux situés au niveau du pore sont impliqués dans le mécanisme.

L'anneau de sélectivité interne, l'anneau DEKA (ou "DEKA-ring") est formé de 4 acides aminés : acide aspartique (D), acide glutamique (E), lysine (K) et alanine (A) appartenant respectivement aux domaines DI, DII, DIII et DIV.

De même, l'anneau de sélectivité externe, l'anneau EEDD est formé de quatre acides aminés, deux acides glutamiques et deux acides aspartiques, appartenant respectivement aux domaines DI, DII, DIII et DIV [1].

Au niveau du centre du pore, une cavité centrale est présente accueillant des molécules d'eau. L'interaction entre les résidus chargés négativement du canal, les molécules d'eau et les ions sodium entrant permettent d'obtenir la sélectivité du canal [2].

2.4.2 La sensibilité au voltage :

L'ouverture du pore du canal est déclenchée par l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau du canal sodium. On observe alors une dépolarisation membranaire, qui est détectée au niveau du canal afin de créer un influx entrant d'ions sodium, et ainsi propager le potentiel d'action.

La dépolarisation membranaire est détectée par la présence du "voltage sensor" ou "détecteur de voltage", formé par les quatre segments S4 de chaque domaine du canal. Le segment S4 comporte de quatre à huit motifs répétés [2] constitués d'acides aminés chargés positivement (fréquemment l'arginine, mais aussi la lysine) tous les trois résidus, suivi par deux acides aminés hydrophobes. Sur le plan tridimensionnel, le segment S4 peut être représenté sous forme d'un cylindre entouré d'un ruban en hélice de charge positive (on retrouve dans la littérature les termes de modèle en "sliding helix" (Catterall 1986) ou en "helical screw" (Guy et Seetharamulu 1986)). Cette hélice est stabilisée dans la membrane par la présence adjacente de résidus chargés négativement appartenant aux autres segments transmembranaires (notamment S1, S2 et/ou S3) [1].

Lorsque la membrane se dépolarise, les liaisons électrostatiques stabilisant les charges positives du segment S4 sont rompues, et le segment S4 se déplacerait vers l'extérieur via un mouvement en spirale pour induire un changement conformationnel du canal et une ouverture du pore aux ions sodium [5].

2.4.3 Inactivation :

Le canal sodium voltage dépendant peut être dans plusieurs états. Lors de la dépolarisation membranaire, il est dit ouvert ou activé ; après la phase de repolarisation membranaire il est fermé ou désactivé ; et certains processus peuvent l'inactiver. Dans ce dernier cas, le canal est dit réfractaire, c'est à dire qu'il est incapable de s'ouvrir pendant cette période. On distingue deux types d'inactivation: l'activation rapide et l'activation lente.

*** Inactivation rapide :**

L'inactivation rapide est un mécanisme essentiel pour le contrôle de l'excitabilité des cellules nerveuses et musculaires. Elle entraîne la fermeture du canal et stoppe ainsi temporairement l'influx entrant de sodium (ce qui est primordial afin d'obtenir une répétition des potentiels d'actions, au lieu d'une activation continue constante).

La structure du canal vraisemblablement responsable de l'inactivation rapide se situe sur la petite boucle intracellulaire entre les domaines III et IV. Il a été mis en évidence le rôle central du motif IFM (soit Ile-Phe-Met, c'est à dire l'enchaînement de 3 acides aminés Isoleucine,

Phénylalanine et Méthionine) [3]. Ce motif IFM se lierait par des interactions hydrophobes à deux résidus glycine présents au niveau du pore, entraînant avec lui la boucle entre les segments DIII et DIV. Le motif IFM jouerait alors le rôle de loquet pour positionner un couvercle formé par la boucle entre les domaines DIII et DIV, qui occlurait le pore, et stopperait ainsi l'influx des ions sodium.

Ce mécanisme est possible uniquement lorsque le canal est dans un état activé: le changement conformationnel induit par le détecteur de voltage libère les structures jouant un rôle dans l'inactivation [11].

Également, l'extrémité COOH terminal du canal semblerait jouer un rôle dans l'inactivation rapide (expérimentalement, la suppression de sa partie proximale diminue la fraction de canaux inactivés). En interagissant avec la boucle intracellulaire, il maintiendrait le canal dans son état inactivé. Enfin, les sous unités beta peuvent également moduler l'inactivation rapide du canal.

*** Inactivation lente :**

Le mécanisme de l'inactivation lente est plus complexe, il est encore aujourd'hui peu compris. Différentes mutations ont été testées grâce à l'étude expérimentale de canaux chimériques; les quatre domaines semblent moduler l'inactivation lente, mais les domaines DI et DII semblent jouer un rôle prépondérant. Les structures impliquées semblent être distinctes de celles responsables de l'inactivation rapide (les canaux mutants dépourvus d'inactivation rapide conservent l'inactivation lente) [11].

3. Pharmacologie du canal : sites d'interaction du canal avec des toxines et des médicaments :

De nombreuses études ont été menées sur les interactions du canal sodique avec différents toxines et médicaments, afin d'une part de mieux comprendre la structure et les propriétés électrophysiologiques du canal, mais également de déterminer de futures probables applications thérapeutiques. A ce jour, 9 sites récepteurs distincts d'interaction avec des médicaments ou des neurotoxines ont été caractérisés, uniquement sur la sous unité alpha du canal.

Ces différents sites d'interactions se différencient non seulement par leur localisation sur le canal, mais également par leur mécanisme d'action: on distingue les molécules qui interagissent sur la sensibilité au voltage, celles qui obstruent le pore et celles qui modulent l'ouverture du canal par

activation ou inhibition de l'activation, via des sites intracellulaires ou extracellulaires.

Il faut noter que ces sites ont un couplage allostérique: la fixation d'une molécule sur son récepteur entraîne généralement un changement conformationnel, altérant l'équilibre du canal entre ces états ouvert, fermé ou inactivé ; mais aussi entraînant parfois une modification de l'affinité pour un autre site récepteur [12].

3.1 Sites d'interaction avec les neurotoxines :

Actuellement, six sites d'interactions avec des neurotoxines ont été caractérisés sur le canal sodium.

*** Interaction au niveau du pore du canal : le site récepteur 1 :**

Ce site est la cible de la tétrodotoxine (TTX), de la saxitoxine (STX) et des μ -conotoxines. Il s'agit d'un site extracellulaire. La liaison des neurotoxines entraîne le blocage de la conduction des ions sodium: la partie extérieure du pore est bouchée, bloquant ainsi l'influx sodique entrant. La fixation des neurotoxines au site 1 est compétitive.

Il s'agit d'un des sites les mieux connus à l'heure actuelle. Le site est constitué des deux anneaux de sélectivité du canal, localisés sur le côté N-terminal des segments S6 des 4 domaines: Les acides glutamiques E387 du domaine I et E395 du domaine II, avec les acides aspartiques D1426 du domaine III et D1717 du domaine IV forment le premier anneau EEDD. Pour le deuxième anneau DEKA, les résidus impliqués sont l'acide aspartique D384 appartenant au domaine I, l'acide glutamique E942 au domaine II, la lysine K1422 au domaine III, et l'alanine A1714 au domaine IV [12].

D'autres acides aminés interagissent avec les neurotoxines au niveau du site 1, mais ils peuvent être différents suivants les neurotoxines: ainsi les neurotoxines se fixent sur des récepteurs qui se chevauchent, mais pas sur un unique "site 1". Par exemple la cystéine 385 est importante pour la liaison de la TTX, alors que pour les μ -conotoxines sont impliqués de nombreux autres résidus (D400, Y401, W402, et E403 du domaine I, E758 du domaine II, W1239 et D1214 du domaine III, W1531 et D1532 du domaine IV ainsi que A728 et D730 sur le segment S5-S6 du domaine II).

Selon ce modèle, il a été suggéré que la TTX lie un micro-site sur le pore, chevauché par un site de fixation plus important dans l'espace pour les μ -conotoxines.

*** Interaction altérant la dépendance au voltage :**

*** Toxines se fixant sur des sites intra membranaires :**

Ces toxines modifient les fonctions du canal par des modulations allostériques. Elles se lient à des régions distinctes du pore ou du voltage sensor et favorise l'état ouvert du canal par des interactions allostériques, indirectes.

*** Le Site 2 :**

Ce site est la cible de certains alcaloïdes végétaux (veratridine, aconitine), des grayanotoxines et des batrachotoxines.

Le site 2 est principalement constitué d'acides aminés situés sur le segment S6 du domaine I, ainsi que sur le segment S6 du domaine IV (d'autres résidus situés sur les segments S6 des autres domaines seraient également impliqués [1]). Il s'agit d'un site localisé dans la membrane, sur les segments transmembranaires de la sous unité alpha.

Pour la fixation des batrachotoxines, les principaux résidus invoqués sont: I433, N434, L437 pour le domaine I et F1569 et N1584 pour le domaine IV (sur un modèle de canal sodique musculaire Nav1.4) [12]. Les grayanotoxines partagent les mêmes résidus impliqués sur le site, mais également Y1586 sur le domaine IV, qui lorsqu'il est muté n'affecte pas l'action des batrachotoxines, mais qui éradique totalement l'effet des grayanotoxines. Comme pour le site 1, le site 2 est donc constitué de différents sites récepteurs différents pour chaque classe de neurotoxines, mais qui se chevauchent.

La liaison sur le site entraîne un changement allostérique qui induit un blocage de l'inactivation rapide et qui diminue le voltage nécessaire à une activation vers des potentiels plus négatifs: le canal s'ouvre alors plus facilement (s'active même pour des potentiels faibles) et reste ouvert plus longtemps (état activé persistant).

Il a été suggéré que le blocage de l'inactivation rapide serait lié à l'interaction avec le segment S6 du domaine IV, et que le changement allostérique perturberait le fonctionnement du segment S4 du domaine IV ("détecteur de voltage" du canal) altérant alors la dépendance au voltage [12].

Plus récemment, il a été suggéré que la sélectivité aux ions soit altérée (il a été observé une diminution de la discrimination des ions entrants) et que l'influx sodique soit ralenti [1].

Concernant l'accès des neurotoxines au site 2, différents modèles sont discutés à ce jour, mais il reste encore peu compris. Un modèle propose en premier lieu une fixation des toxines sur

des résidus lipophiles exposés vers l'extérieur avant l'entrée dans la membrane. Un modèle plus récent pose l'hypothèse de l'entrée des batrachotoxines via le pore, interagissant alors avec les résidus du segment S6DIV. Ce mécanisme pourrait expliquer d'une part la diminution de la conductance sodique (le flux est ralenti par la présence de la toxine dans le pore), mais également la diminution de la sélectivité aux ions (la présence de la toxine diminue l'efficacité de l'anneau de sélectivité DEKA). De plus ces toxines lient plus facilement le site lorsque le canal est dans un état activé, ce qui va encore dans le sens du deuxième modèle (le pore est ouvert donc plus apte à accueillir les neurotoxines) [1].

Parmi ces neurotoxines, on classe les batrachotoxines comme étant des activateurs entiers, alors que la veratridine et l'aconitine sont considérés comme des activateurs partiels (les batrachotoxines ne se dissocient pas de leur récepteurs, contrairement aux deux autres toxines) [13].

*** Le site 5 :**

Les neurotoxines agissant sur ce site sont les brevetoxines et les ciguatoxines, qui ont une fixation compétitive entre elles. Le site 5 est formé par certains acides aminés localisés sur les segments S6 du domaine I et S5 du domaine IV [12]. En revanche les résidus précis impliqués dans l'interaction sont encore à ce jour inconnus.

Le mécanisme d'action semble être proche de celui décrit pour le site 2. On retrouve après injection de la neurotoxine: une diminution voir un blocage de l'inactivation rapide, un état ouvert du canal prolongé dans le temps, et un potentiel d'activation déplacé vers des potentiels plus négatifs.

Cependant même si elles fixent un récepteur commun, les brevetoxines et les ciguatoxines semblent agir selon un mécanisme d'action différent: alors que les brevetoxines sont capables de créer une augmentation de l'amplitude du courant sodique sur les neurones sensoriels des mammifères, les ciguatoxines provoquent plutôt une diminution de l'amplitude [1].

*** Toxines se fixant sur des sites extracellulaires: Altération du détecteur de voltage :**

Ces toxines ont toutes la particularité de bloquer directement les mouvements du détecteur de voltage (formation d'un "piège à détecteur").

*** Le site 3 :**

Ce site est ciblé par les toxines alpha de scorpions, les toxines d'anémones de mer et certaines toxines d'araignées.

Les parties du canal impliquées dans la formation du site récepteur 3 sont d'une part les boucles extracellulaires reliant les segments S5 et S6 des domaines I et IV et d'autre part la boucle extracellulaire reliant les segments S3 et S4 du domaine IV.

On retrouve parmi les résidus impliqués dans l'interaction avec les toxines des acides aminés principalement de nature basique: E1613, D1612 (dans les sous types cardiaques Nav1.5, ou D1428 pour les canaux des muscles squelettiques Nav1.4). Pour les toxines d'anémones de mer, on retrouve spécifiquement les résidus E1616, V1620, L1624 dont les mutations n'affectent pas la fixation des toxines alpha de scorpions. Comme pour les autres sites du canal, il s'agit de sites récepteurs qui se chevauchent [12].

Le mécanisme d'action global de ces neurotoxines serait le ralentissement jusqu'au blocage de l'inactivation rapide des canaux sodiques voltages dépendants. Il a été proposé que la liaison de la toxine sur le domaine IV prévient le changement conformationnel du segment S4 du domaine IV, nécessaire pour provoquer l'inactivation rapide du canal [1]. En d'autres termes, la liaison de la neurotoxine stabilise le détecteur de voltage S4 dans sa position désactivée. Il a été observé que l'affinité pour le site récepteur 3 est diminuée en cas de dépolarisation de la membrane. En cas de dépolarisation prolongée, le mouvement de IVS3 est alors forcé, causant la dissociation avec la toxine.

*** Le site 4 :**

Ce site est visé par un autre groupe de toxines de scorpions: les toxines beta de scorpions. Certaines toxines d'araignées fixent également ce site [1].

La liaison des toxines au site 4 donne lieu à deux phénomènes: une réduction du pic d'amplitude du courant sodique ainsi qu'un déplacement du voltage d'activation du canal vers des potentiels de membranes plus négatifs. Il faut noter que ces neurotoxines sont actives sur les isoformes cérébraux et musculaires, mais pas sur les isoformes cardiaques Nav1.5.

Quatre boucles extracellulaires ont été mises en évidence comme étant importantes pour la fixation de ces toxines: les boucles IS5-S1, IIS1-S2, IIS3-S4 et IIIS5-S6. Deux d'entre elles, les boucles situées sur le domaine II, semblent jouer la majeure partie de l'interaction avec les toxines beta de scorpions. Ces régions permettent d'ailleurs de différencier les isoformes cardiaques et cérébraux entre eux. Le résidu G845 serait un acide aminé critique dans la liaison avec la toxine [12]. Malgré tout, de récentes études ont également montré le rôle majeur de trois résidus du

domaine III, qui favoriserait la liaison des toxines au domaine II.

Concernant le mécanisme d'action, le segment S4 du domaine II se déplace vers l'extérieur lors d'une dépolarisation. Les toxines se lieraient alors sur des résidus nouvellement exposés de l'extrémité extracellulaire de IIS4. Cette liaison bloquerait et stabiliserait alors ce segment en position activée, ce qui faciliterait l'activation du canal, même pour des dépolarisations de plus faible intensité.

*** Le site 6 :**

Les δ -conotoxines ont permis d'identifier un 6ème site récepteur pour les neurotoxines sur les canaux sodiques voltage dépendants. Ce site reste actuellement le moins étudié et le moins connu de tous les sites présentés.

Après liaison au site récepteur, il a été observé un ralentissement de l'inactivation rapide provoquant une prolongation des potentiels d'action. Le mécanisme semble identique à celui observé pour le site 3, en revanche, la fixation reste indépendante du potentiel de membrane, et les modulations allostériques causées par des toxines liant d'autres sites affectent l'action des toxines fixant le site 3, mais pas l'action des δ -conotoxines. Ceci a permis de suggérer l'existence d'un sixième site [12].

Les résidus du canal mis en cause à ce jour dans la liaison aux toxines sont situés sur la boucle entre les segments S3 et S4 du domaine IV [1].

Remarque: on pourra noter que deux autres sites récepteurs (vraisemblablement proches des sites 3 et 4) ont été découverts chez les canaux d'insectes, ciblés par des toxines de scorpions:

- des toxines excitatrices: on retrouvera des symptômes chez l'animal tel que des contractions musculaires. Le mécanisme d'action consiste en une augmentation du pic de la conductance au sodium et à une diminution de l'inactivation.
- des toxines dépressives, induisant au contraire une forte dépolarisation membranaire et une disparition progressive du courant sodique. Elles provoquent ainsi des paralysies flasques.

3.2 Tableau récapitulant les sites d'interactions avec les neurotoxines :

Site d'interaction	Neurotoxines	Exemples	Origine	Conséquence de la liaison au site
Site 1	Toxines guanidiques	Tétradotoxine, Saxitoxine	Marine	Diminution de la conduction sodique
	μ -conotoxines	μ -GIIIA, μ -GIIIB	Venin de cône	
Site 2	Alcaloïdes liposolubles	Veratridine, Aconitine	Végétale	Activation du canal à des potentiels plus négatifs, Ralentissement de l'inactivation rapide, Altération de la sélectivité ionique, Diminution de la conduction sodique
	Grayanotoxines	Grayanotoxine II	Végétale	
	Batrachotoxines	Batrachotoxine	Venin de batracien	
Site 3	Toxines α de scorpions	Lqh2, Aah2	Venin de scorpion	Ralentissement de l'inactivation rapide
	Toxines d'anémones de mer	AETX-I, Bg-2, ATX-III	Venin d'anémone	
Site 4	Toxines β de scorpions	Css4, Ts1	Venin de scorpion	Diminution de la conduction sodique, Activation du canal à des potentiels plus négatifs
	Toxines d'araignées	Magi5	Venin d'araignée	
	μ O-conotoxines	μ O-MrVIA, μ O-MrVIB	Venin de cône	
Site 5	Polyethers cycliques	Ciguatoxines, Brévéttoxines	Marine	Ralentissement de l'inactivation rapide, Activation du canal à des potentiels plus négatifs
Site 6	δ -conotoxines	δ -TxVIA	Venin de cône	Ralentissement de l'inactivation rapide

Figure 3 : Tableau présentant les neurotoxines ciblant les différents sites d'interactions

3.3 Site d'interaction avec les médicaments ou "site 9" :

Le canal sodium est également de cible de médicaments déjà utilisés en thérapeutiques depuis de nombreuses années, tels que les antiarythmiques, les antiépileptiques, les anesthésiques locaux ou les antidépresseurs [13].

Ces médicaments lient un site récepteur commun qui implique des résidus situés au milieu des segments 6 des domaines I, III et IV. En représentation tridimensionnelle, il se situe sur la face interne du récepteur. Lorsque le site est occupé par ces ligands, le pore est bloqué. L'accès au site pour des molécules de grande taille ou hydrophiles, nécessite l'état ouvert du canal. De ce fait, ces médicaments se fixent plus rapidement quand le canal est fréquemment ouvert. Concernant les molécules lipophiles, elles peuvent se lier au canal quand celui-ci est dans un état de repos, grâce à un chemin d'accès hydrophobe. Ce chemin d'accès est notamment contrôlé par le résidu hydrophobe Phe 203 [2].

Leur mécanisme d'action passe par un blocage de la conductance sodique ainsi que par la stabilisation de l'état d'inactivation rapide.

Comme effets secondaires communs à ces médicaments, on peut retrouver des convulsions et des arrêts cardiaques lors de fortes posologies injectées en voie intraveineuse [13].

3.4 Site d'interaction avec les insecticides ou "site 7" :

On retrouve parmi les neurotoxines actives sur le site 7 les insecticides liposolubles tels que les pyréthrinoïdes et le DDT ainsi que ses analogues. Les pyréthrinoïdes paralysent les insectes volants et sont considérés comme des insecticides "knock down" [14].

Les canaux d'insectes possèdent un haut degré de similarité structurelle avec les canaux sodiques de mammifères (le gène para partage entre 50 et 60% d'homologie avec les différents types de canaux humains [15]). Cependant, les canaux sodiques des insectes sont plus sensibles aux insecticides que ceux des mammifères. Par exemple la deltaméthrine est 1000 fois plus active sur les canaux sodiques des insectes. L'action physiologique de cette classe de neurotoxines semble proche de celle provoquée par les molécules ciblant le site 2 telle que la veratridine [13].

La liaison au site provoque une altération de l'inactivation rapide: le canal reste ouvert pendant une période prolongée. De plus, les ligands lient également préférentiellement leur site récepteur quand le canal est fréquemment activé. Les insecticides traversent la membrane cellulaire et se logent dans une poche hydrophobe où ils préviendraient alors l'inactivation du canal.

Les résidus impliqués dans la formation du site se situeraient sur les segments S6 des domaines I, II et III. On retrouve régulièrement chez les insectes des mutations concernant ces résidus, ce qui explique leur résistance aux insecticides utilisés [14].

Partie II : Les toxines ciblant les canaux sodiques voltage dépendants

Après avoir détaillé le fonctionnement et les caractéristiques du canal sodique voltage dépendant, nous allons à présent nous intéresser aux toxines ciblant ce canal. Nous allons aborder ces toxines une à une en les classant de par leur origine naturelle, ce qui nous permettra de détailler leurs répartitions, leurs rôles biologiques, leurs voies d'obtentions mais également les données que nous disposons sur les intoxications naturelles.

A) Les neurotoxines marines :

En plus d'être une source importante de nutriments pour l'homme (la pêche est une activité permettant la survie économique de nombreuses populations des régions côtières), les mers et océans sont également à l'origine d'importantes intoxications partout dans le monde.

La plupart des toxines sont indétectables pour les sens de l'homme (pas de goût ni odeur particuliers) et résistent à la cuisson et à la congélation [16].

La découverte de nouvelles toxines peut avoir un intérêt majeur du fait de leur potentielles applications dans les domaines alimentaire, thérapeutique ou biotechnologique. La méthode traditionnelle consiste à extraire progressivement ces composés par fractions successives guidées par des essais biologiques, puis d'en déterminer ensuite leur structure, leur composition chimique et leurs fonctions biologiques exactes. Pour les toxines protéiques, une autre méthode plus récente analyse le génome ou le transcriptome de ces organismes marins afin de trouver de nouveaux peptides d'intérêt.

Les océans sont une source importante de molécules bioactives et de nouvelles structures chimiques produites par une multitude d'organismes marins. La plupart des neurotoxines naturelles agissant sur les canaux sodium voltage dépendants jouent un rôle d'interaction entre les différents organismes marins: défense chimique, agents de camouflage, prédation des proies... [17]

1) Les toxines guanidiques accumulées dans la chaîne alimentaire marine :

1.1) La Tétrodotoxine (TTX) :

1.1.1 Historique :

La tétrodotoxine (TTX) est une toxine connue depuis l'antiquité: les peuples chinois et égyptiens (5ème dynastie vers 2500 avant JC) connaissaient déjà les propriétés toxiques des

poissons globes. Plus récemment, une description complète des effets toxiques du poisson globe a été détaillée dans le Chinese materia medica de 1600. En 1775, Cook s'empoisonne par des poissons globes et décrit les symptômes cliniques qu'il observe dans son journal [17]. En 1883, Charles Remy base ses recherches sur l'intoxication à la TTX et décrit ses différents symptômes. En 1909, Tahara finit par nommer la toxine lors de travaux sur les poissons globes. Depuis, de nombreuses études ont été menées afin de découvrir sa structure et sa pharmacologie [18].

A ce jour, l'intoxication à la tétrodoxine est considérée comme l'une des plus sévères intoxications par les poissons [19].

1.1.2 Répartition :

Le nom de tétrodoxine vient de Tetraodontidae, la famille du fugu (ou poisson-globe, qui tient son appellation de sa forme lorsqu'il se remplit d'eau afin d'effrayer ses prédateurs), dans laquelle elle a été premièrement isolé. Cependant, sa distribution est très large. La toxine a été identifiée dans 6 phyla du règne animal: Platyhelminthes, Arthropoda, Chaetognatha, Echinodermata, Mollusca et Chordata. Ainsi, cette toxine est présente chez une grande variété d'espèces marines d'eau douce et d'eau de mer, entre autres les poissons-globes, des mollusques, des étoiles de mer, le poulpe bleu à anneau, également certaines bactéries (principalement chez les *Vibrio spp* et les *Pseudomonas spp*). Il a aussi été mis en évidence la présence de tétrodoxine chez des espèces terrestres, dans la famille des amphibiens, et on retrouve donc cette toxine chez certaines espèces de grenouilles et crapauds [17].

La TTX se concentre principalement dans les organes tels que le foie, les voies biliaires, les ovaires, la peau et le tube digestif. Il existe une grande différence de toxicité entre les différentes espèces, voir d'un individu à l'autre, en fonction de la concentration en toxine dans les organes [19].

1.1.3 Origine :

La distribution très large de la tétrodoxine chez des espèces très différentes les unes entres les autres et éloignées sur le plan phylogénétique est expliquée par l'origine de la toxine. En effet, la TTX n'est pas produite par les poissons globes mais pas des bactéries. Celles ci sont ingérées par le plancton, lui même ingéré par des petits invertébrés, dont les poissons globes se nourrissent. Ainsi, la présence de la TTX chez ces espèces résulte d'une absorption et d'une accumulation via la chaîne alimentaire. Ainsi, en élevant des poissons globes en captivité avec une nourriture contrôlée sans TTX, aucun trace de toxine n'est retrouvée dans leur organisme [20].

En revanche, certaines espèces conservent la capacité d'accumuler la toxine malgré une

nourriture sans TTX, ce qui a permis de poser également une hypothèse de production par des bactéries symbiontes, ce qui est un procédé fréquent chez les espèces marines. En effet, il a été isolé chez certaines espèces de poissons globes des bactéries capables de produire la TTX. Pour certaines espèces de triton en revanche, telle que *Taricha granulosa*, il a été montré qu'une relation symbiotique n'existait pas, ce qui tend à suggérer la production endogène de la toxine par les espèces de tritons [17].

1.1.4 Structure :

La découverte de sa structure chimique remonte dans le milieu des années 60, indépendamment mais presque simultanément par les équipes de Woodward (1964), Tsuda (1964) et Goto (1965) [21].

La tétrodotoxine est un alcaloïde hydrosoluble, thermostable (non détruite à 200°C), non protéique, de bas poids moléculaire. Elle possède une structure plutôt inhabituelle: elle contient un seul groupement guanidique, attaché à un squelette carboné fortement oxygéné. Le squelette carboné consiste en une structure en 2,4-dioxadadamantane, associé à 5 groupements hydroxyls positionnés en C-4, C-6, C-8, C-9, C-10 et C-11. La TTX de formule brute $C_{11}H_{17}N_3O_8$ a un poids moléculaire de 319,28g/mol [19].

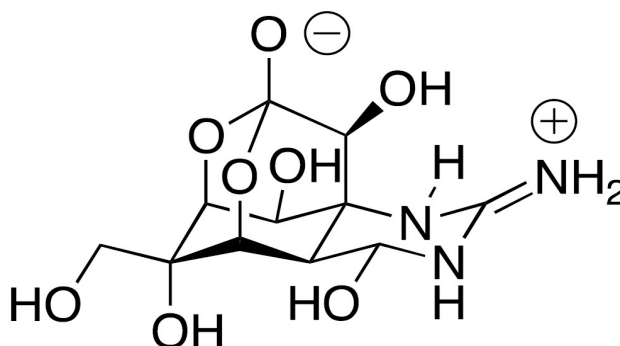


Figure 4 : Structure de la TTX [21]

De par sa structure inhabituelle, le chemin de biosynthèse de la tétrodotoxine reste encore à ce jour assez incertain. Il semblerait cependant que la TTX soit un produit final, et non un métabolite intermédiaire d'une voie de biosynthèse de l'organisme producteur [20].

De même, il n'a pas encore été mis au point une voie de synthèse chimique satisfaisante, même si de nombreuses pistes ont été émises dans la littérature. Les voies de synthèse chimiques proposées passent par de nombreuses étapes réactionnelles, chères et peu rentables. La première synthèse de la tétrodotoxine a été détaillée par Kishi en 1972, elle comporte de 23 à 26 étapes et a

un rendement entre 1,07 et 1,82% [17].

1.1.5 Analogues de la TTX :

La TTX n'est pas la seule toxine présente, ni la seule responsable de la toxicité à l'état naturel chez les poissons globes. On retrouve également des analogues, tels que 4-epiTTX ou anhydroTTX qui sont des formes de conversions de la TTX. D'autres analogues tels que la chiriquitoxine ne sont retrouvés que chez les amphibiens [18].

1.1.6 Mode d'action :

Dans le début des années 60, Narashi découvre ses propriétés de blocage du canal sodium: ce fut alors le premier agent pharmacologique découvert capable de bloquer ce canal [22].

Comme vu précédemment, la TTX se fixe au niveau du site 1 des canaux sodiques voltage dépendants, c'est à dire au niveau externe du pore.

Le groupement guanidique est essentiel pour sa toxicité puisqu'il forme une liaison saline avec les groupes hydroxyles du pore. Vraisemblablement, le groupement guanidique formerait des liaisons avec les résidus situés sur les boucles P du canal: Asp384, Cys385, Glu387 du domaine I, et Glu942 du domaine II. Les groupements hydroxyles C-9, C-10 et C-11 quant à eux formeraient des liaisons hydrogènes avec Glu945 du domaine II et Asp 1532 du domaine IV. En se fixant sur son site, la TTX bloque alors la perméabilité du canal aux ions sodium [23].

En bloquant ainsi sélectivement les courants sodiques voltage dépendants au niveau des nerfs et des muscles, la TTX inhibe la propagation des potentiels d'actions et perturbe les fonctions neurologiques et musculaires.

1.1.7 Intérêt de la TTX chez l'animal :

Puisqu'elle est retrouvée chez de nombreux organismes, la TTX semble avoir un rôle important à jouer chez l'hôte. En effet, la neurotoxine permet à l'animal d'acquérir certains avantages.

Tout d'abord, elle lui permet d'acquérir un très bon moyen de défense contre les prédateurs (les poissons globes n'ont par exemple aucun prédateur connu, excepté l'homme [23]). Chez certaines espèces de poissons globes telles que *Takifugu pardalis* ou encore *Takifugu niphobles*, la TTX est retrouvée au niveau de la peau et de glandes exocrines et son excrétion est reliée à une stimulation électrique. De plus, lorsque la toxine est libérée, le poisson globe se gonfle d'eau, une réponse courante lorsqu'il se sent agressé.

Moins fréquemment, chez certaines espèces, la neurotoxine semble avoir une fonction

offensive pour maîtriser les proies. Par exemple, chez une espèce de Platyhelminthes, il a été montré que la toxine se situait au niveau du pharynx et est injectée dans la proie lors de l'attaque. De même la TTX est retrouvée chez le poulpe bleu à anneau (*Hapalochlaena maculosa*) dans les glandes salivaires postérieures, emplacement typique des venins de poulpe [20].

Enfin, la toxine est également retrouvée dans l'enveloppe vitelline des oocytes et pourrait jouer le rôle de phéromone afin d'attirer le mâle pour fertiliser les œufs (en plus d'avoir un rôle de protection des œufs envers les prédateurs) [24].

1.1.8 Résistance à la TTX :

Les organismes de ces animaux se sont adaptés afin de pouvoir transporter la neurotoxine. Ainsi, on retrouve au niveau du pore de leurs canaux sodiques voltage dépendants des mutations afin de ne pas être intoxiqués par la TTX. Également, ces mêmes mutations sont retrouvées chez leurs prédateurs, afin de pouvoir consommer leurs proies.

Les mutations en question concerne le résidu 401 du domaine I, un résidu aromatique (Tyr ou Phe) est remplacé par un résidu non aromatique (Asn), ce qui a pour conséquence une diminution importante de la sensibilité à la TTX. Il a été proposé que ce résidu aromatique jouerait un rôle en interagissant avec une surface non polaire de la TTX. De plus, cette substitution induirait une distorsion des acides aminés du canal ayant une position critique dans la liaison avec la toxine (comme Glu 758 ou Asp1532), entraînant alors une diminution indirecte de la sensibilité à la TTX.

D'autres substitutions confèrent également une diminution de la sensibilité à la neurotoxine, notamment ceux affectant les résidus Thr759 ou Glu758 [23].

Cependant, la résistance à la TTX entraîne également certains inconvénients, comme un ralentissement de la transduction d'un signal sensitif ou une altération de la contraction musculaire, et par conséquent la forme physique de l'animal. Ainsi, il a été remarqué que chez certains serpents appartenant à l'espèce *Thamnophis sirtalis*, la mutation engendrait un impact négatif sur leur survie: en effet, leur vitesse maximale était réduite (le potentiel d'action arrivant aux muscles squelettiques est freiné par le défaut d'influx sodique).

1.1.9 Dose toxique :

La TTX est une neurotoxine très toxique. Chez des souris de 20g, la dose létale 50 (DL50) est de 8,7µg/kg en intraveineuse, 8 à 10µg/kg en intrapéritonéal et 11,5µg/kg en sous cutané [17]. La dose mortelle chez l'homme par voie orale semble se situer entre 1 à 2 mg (environ 20µg/kg) [25].

Les doses toxiques présentées ici sont celles obtenues par injection de la toxine pure. Or en pratique, de nombreuses substances toxiques sont retrouvées chez le poisson vénéneux, dont des dérivés de la TTX.

La pharmacocinétique de la TTX reste encore peu connue. La toxine semble se distribuer partout dans les compartiments liquides du corps. Des plus fortes concentrations de la toxine sont retrouvées au niveau des reins et du cœur.

1.1.10 Clinique de l'intoxication :

L'intoxication par tétrdotoxine survient après ingestion d'un poisson renfermant la toxine, notamment le fugu, mets très apprécié surtout au Japon.

L'intensité des symptômes ressentis peut varier d'une intoxication à l'autre, notamment à cause de la variation de la quantité de neurotoxine ingérée. Les symptômes débutent rapidement environ 10 à 45 minutes après ingestion [19]. Dans un premier temps, la victime ressent des picotements des lèvres et de la bouche. Dans un deuxième temps, un ensemble de symptômes généraux à type de gastro entérite apparaissent, puis surviennent progressivement des symptômes neurologiques qui vont dominer le tableau tels que paresthésies, vertiges, céphalées, inversion de la sensation chaud-froid, ainsi qu'une paralysie progressive ascendante qui va s'étendre jusqu'à l'apparition de problème phasique et d'une détresse respiratoire [23].

Le décès survient dans 50 à 80% des cas, généralement dans les 24 premières heures (durée d'élimination de la toxine). Après ce délai, même si des comas peuvent se prolonger plusieurs jours, la mort n'est plus à craindre [26].

Des troubles divers sont également observés: hypersalivation, diminution voir absence de réflexe, fasciculations des muscles squelettiques, léthargie, ataxie ou mydriase.

D'autre part, des symptômes cardiovasculaires sont également observés: diminution de la pression artérielle, bradycardie, diminution du volume d'éjection ventriculaire et troubles du rythme cardiaque. Ces effets cardiovasculaires sont induits par une diminution du tonus vasomoteur, par l'action de la TTX sur les structures médullaires impliquées dans le contrôle du système cardiovasculaire ainsi que par le blocage de la conduction des fibres sympathiques [25].

La sévérité de l'intoxication est reliée à trois principaux facteurs: la quantité de neurotoxine ingérée, le délai de prise en charge, et les comorbidités. La classification de Fukuda et Tani d'intoxication à la TTX se divise en quatre degrés de sévérité basés sur la clinique [25]:

Les premier et deuxième degrés correspondent à une diminution des fonctions neurologiques et neuromusculaires, mais avec des réflexes conservés.

Le troisième degré est caractérisé par des symptômes plus importants (hypotension, paralysie progressive, difficultés respiratoires, cyanose) accompagnés d'une hyporéflexie.

Enfin le quatrième degré rassemble les cas les plus sévères : chute de la saturation artérielle en oxygène, pertes de conscience, et arrêt respiratoire.

1.1.11 Prise en charge :

Il n'existe à ce jour aucun antidote, aucun traitement spécifique de l'intoxication à la tétrodoxine.

Le traitement reste donc uniquement symptomatique, une prise en charge hospitalière rapide est nécessaire avec principalement mise en place d'une assistance respiratoire. Une épuration toxique peut également être envisagée: le lavage se fait à l'aide de bicarbonate à 2 pour cent, la toxine étant instable en milieu alcalin [19]. En complément, on pourra utiliser des analeptiques cardiaques et respiratoires, du gluconate de calcium et des vitamines B [26].

En cas de guérison, les symptômes disparaissent après un à cinq jours, sans séquelles [25].

1.1.12 Prévention :

La prévention des intoxications à la TTX passe par un contrôle de la consommation de fugu. En effet au Japon, ce poisson peut être préparé par des cuisiniers japonais expérimentés possédant une licence d'état. Ces cuisiniers ont la capacité de séparer la chair du poisson de ses organes toxiques (principalement foie, tube digestif, les ovaires, et peau). En France, son importation est interdite [23].

1.2) La Saxitoxine (STX) :

La Saxitoxine (ou STX) est une toxine relativement proche la TTX, de par son mécanisme d'action (elles agissent toutes les deux sur le site 1 des canaux sodiques voltage dépendants), mais également de par sa chimie et ses propriétés toxiques.

La saxitoxine est une toxine responsable du syndrome paralytique d'intoxication aux fruits de mer ou Paralytic Shellfish Poisoning (PSP). Il a été identifié à ce jour plus de 50 analogues de la STX, proches structurellement et responsables également de PSP [27]. Le PSP est un véritable problème de santé publique dans de nombreux pays notamment lorsque ces toxines sont produites en grande concentration lors de développements de microalgues (on parle alors de "harmful algal bloom"). Ces évènements se produisent généralement en cas de forte température avec un haut niveau d'ensoleillement, conditions favorables à la reproduction des espèces de dinoflagellées [28].

La STX pose de sérieux problèmes sur le plan économique : décès d'animaux marins et arrêt de la commercialisation des produits de la pêche, dont dépendent financièrement de nombreuses régions côtières autour du monde. La toxine est retrouvée dans les eaux salées mais également dans les eaux douces [27].

La STX est considérée à l'heure actuelle comme potentielle arme biologique (il s'agit du seul produit d'origine marine qui est classé en tant qu'arme) [29].

1.2.1 Historique :

Le nom de la toxine provient de *Saxidomus giganteus*, le mollusque dans lequel la toxine a été pour la première fois purifiée en 1957 par Shantz. La STX est également parfois nommée « mytilotoxine », du fait de sa présence chez l'espèce de moule *Mytilus edulis* [29].

La présence de la toxine chez les cyanobactéries fut la première fois décrite par Jackim et Gentile en 1968 chez *Aphanizomenon flos-aquae*. La structure de la toxine fut découverte en 1975, indépendamment par les groupes de J. Bordner et E. J. Schantz [30].

1.2.2 Répartition :

Certaines espèces de bactéries sont capables de biosynthétiser la STX et ces dérivés. Ces bactéries sont ensuite retrouvées au niveau de cyanobactéries prokaryotes dans les eaux froides (dont les genres *Anabaena* ou *Aphanizomenon*), de dinoflagellés eukaryotes en eau de mer (principalement le genre *Alexandrium*) et certaines algues macroscopiques (telles que celles appartenant au genre *Jania*).

Par la suite, tout comme pour la TTX, la chaîne alimentaire concentre la toxine chez de nombreux animaux marins qui accumulent les toxines sans être intoxiqués. Ainsi, la STX et ses analogues sont retrouvés principalement chez des mollusques tels que des huîtres, moules, ou coquilles saint-jacques, mais également certains gastropodes et céphalopodes. Certains poissons globes peuvent également transporter la STX [29].

1.2.3. Structure de la STX et de ses analogues :

La STX est un alcaloïde de structure trialkyl tetrahydropurine. Alors que le corps tricyclique de la toxine est très rigide, la chaîne carbamoyl possède une grande flexibilité. La STX appartient à la grande famille des produits marins contenant un groupement guanidinium (comme la TTX), puisqu'elle possède deux groupes guanidino. C'est une petite molécule hydrosoluble ayant un poids moléculaire de 299 (C₁₀H₁₇N₇O₄) [27].

C'est une molécule très stable dans de nombreuses conditions biologiques et physiologiques, sauf en cas de pH alcalin. La STX est thermostable et n'est pas détruite par la cuisson [28].

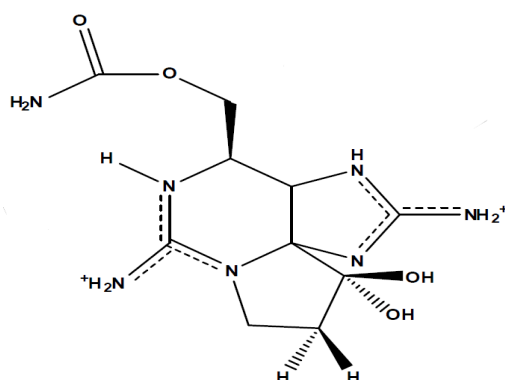


Figure 5 : Structure de la STX [27]

Les analogues de la STX peuvent être classés en différentes classes [27] : les analogues non sulfatés (dont la néosaxitoxine), les mono-sulfatés (les gonyautoxines GTX1 à GTX6), les di-sulfatés (C1 à C4), les decarbamoylés (dont dcSTX, dcneoSTX, dcGTX1...) et les analogues hydrophobes. La structure la plus originale revient à la zetekitoxine AB isolé de la grenouille *Atelopus zeteki*, contenant un noyau 1,2-oxazolidine fusionné à un lactame.

Ces analogues sont des précurseurs ou des produits du métabolisme de la STX, et des réactions de biotransformations peuvent facilement convertir un composé en un autre. Certains sont uniquement retrouvés chez certains animaux hôtes spécifiques (enzymes spécifiques à l'espèce en

question). Par exemple, l'acide 11-saxitoxinethanoïque (SEA) n'est retrouvé que chez l'espèce de crabe *Atergatis floridus*.

L'analyse des voies de détoxification de la STX grâce à l'étude de ces différents analogues est en cours, afin de peut être trouver une méthode de traitement des intoxications en stimulant certaines biotransformations.

De par l'amélioration des méthodes de détection et de détermination des structures chimiques, le nombre de nouveaux analogues de la STX rapportés dans la littérature est en augmentation ces dernières années.

1.2.4 Biosynthèse et synthèse chimique :

Le gène cluster responsable de la biosynthèse de ces toxines (dénommés "sxt") a été identifié récemment en 2008 par Kellmann. Le cluster de 25,7 à 36 kb (selon les espèces) encode 26 protéines différentes, avec 30 fonctions catalytiques [31].

Une première voie de synthèse chimique a été décrite en 1977, comportant 20 étapes. Le rendement total ne dépasse pas 0,25%. D'autres voies de synthèses ont été découvertes depuis, avec un rendement légèrement supérieur [29].

1.2.5 Toxicité :

La saxitoxine est une toxine très puissante, active même à faible dose. Par injection intraveineuse, la dose de 1nmol/kg suffit pour tuer de petits animaux (poule, lapin). Par voie orale, la toxicité est 300 à 900 fois moins importante, selon les animaux utilisés [29]. La DL50 s'élève à 10µg/kg en intrapéritonéal et 3,4µg/kg en intraveineux chez la souris.

D'après les données récoltées lors d'intoxications humaines, la plus petite dose capable d'entraîner des effets nocifs serait de 124 µg par voie orale. La DL50 chez l'homme serait de 5,7µg/kg par voie orale, et la dose létale lors d'une intoxication par contact avec blessure de l'épiderme serait de 50 µg [30].

Dans la plupart des pays, la quantité maximale autorisée de STX contenue dans 100g de chair de coquillage est de 80µg [29]. Il a également été proposé que sa concentration dans l'eau de boisson ne devrait pas excéder 3 µg/L [28].

Concernant la toxicité des analogues de la STX, elle est très variable selon les composés. La plupart des toxines sont moins toxiques que la STX, mais certaines possèdent une toxicité supérieure. Par exemple la zetekitoxine AB possède une affinité pour les canaux sodiques musculaires 580 fois plus élevée que la STX [27].

1.2.6 Détection et quantification :

Il existe un test rapide afin de détecter la présence de la STX et de ces analogues: les bandelettes de test rapide Jellet (ou essai MIST Alert).

Des essais à l'aide de radiorécepteur peuvent également être utilisés. Il s'agit de méthodes par compétition de fixation sur la saxiphiline (ou sur les canaux sodiques voltage dépendant) entre de la STX titrée radioactive et l'échantillon (avec la réalisation préalable d'une courbe de calibration avec des échantillons titrés en STX). L'HPLC associée à une détection par fluorescence ou par spectrométrie de masse peuvent également être utilisées [30].

Cependant, la multiplicité des analogues avec des niveaux de toxicité différents rend difficile l'évaluation de la toxicité d'un échantillon donné. En effet, selon les méthodes utilisées, les détections croisées ne rendent pas toujours compte de la toxicité (par exemple une méthode utilisant des anticorps contre un épitope spécifique à l'ensemble des analogues de la STX ne permettra que de donner une concentration en STX et dérivés, mais pas un niveau de toxicité, donnée la plus utile en pratique.)

La technique de référence internationale reste donc l'essai de toxicité sur des souris. Les résultats sont alors donnés en µg de STX équivalent par kg de chair de coquillage [28].

1.2.7 Mode d'action :

Comme vu précédemment, la STX est une toxine qui cible le site 1 des canaux sodiques voltage dépendants, de manière très similaire à la TTX. Plusieurs éléments sont essentiels à la fixation de la toxine: le groupe guanidium chargé positivement (notamment les positions 7, 8 et 9), l'hydroxyle situé sur le carbone 12 et la chaîne latérale carbamoyl. Ces éléments interagissent avec les résidus carboxyles chargés négativement présents au niveau du pore du canal sodium [27].

Jusqu'à récemment, les canaux sodiques étaient considérés comme les seuls cibles de la toxine. Il s'est avéré que la STX agit également sur les canaux potassiques et calciques. Il a été démontré que la STX liait le sous type hERG des canaux potassiques et induisait une stabilisation de l'état fermé du canal. La double charge de la STX semble être important pour cette liaison, du fait que la TTX, proche structurellement, ne lie pas le canal potassique. De même, La STX lie le sous type L des canaux calciques et provoque une modification allostérique conduisant à une diminution du flux calcique. A ce jour, seuls les sous types hERG des canaux potassiques et L des canaux calciques ont été mis en évidence comme liant la STX. De futures études prouveront peut être l'implication d'autres sous types [29].

On pourra également noter que la STX et ses analogues lient et inhibent l'activité de l'oxyde

nitrique synthase, enzyme produisant l'oxyde nitrique (NO). Enfin, la toxine lie également deux protéines circulantes: la saxiphiline appartenant à la famille des transferrines (qui semblerait jouer un rôle chez les animaux à sang froid) et une protéine isolée chez l'espèce de poisson globe *Fugu pargalis*.

1.2.8 Clinique du PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) :

L'intoxication par ces toxines passe généralement par la consommation d'animaux marins vecteurs, ou par l'eau de boisson [27].

On retrouve les premiers symptômes après environ trente minutes. Tout d'abord, la personne ressent une sensation de brûlure ou de picotement au niveau des lèvres et du visage, évoluant ensuite vers une paralysie faciale. Dans un second temps, on retrouve une extension de ces symptômes au niveau des extrémités des doigts et des pieds, puis une paralysie complète du corps. La personne reste cependant toujours consciente [29]. Ces signes peuvent être accompagnés de symptômes mineurs, tels que troubles digestifs, maux de tête, vertiges, tachycardie. En cas d'intoxication sévère, le décès survient par arrêt respiratoire [30].

La demie vie de la STX dans l'organisme se situe aux alentours de 90 minutes [32]. Les décès par intoxication surviennent donc généralement dans les 12 premières heures.

Chaque année, la STX et ses analogues sont à l'origine de plus de 2000 cas de PSP, avec un taux de mortalité aux alentours de 15% [32].

1.2.9 Intoxication par contact :

Une autre voie d'intoxication par la STX peut être par contact, lors d'une baignade ou autres activités aquatiques dans une eau contaminée par des cyanobactéries contenant de la STX. La STX ne traversant pas la barrière cutanée, la contamination se fait par voie oculaire ou par le biais de plaies ou de blessures cutanées.

Les personnes intoxiquées souffrent généralement de fièvre, d'irritation des yeux, de douleurs abdominales, et de rash cutané. Il est cependant à noter que ces symptômes sont à relier à la STX, mais également à d'autres toxines contenues dans les cyanobactéries [29].

1.2.10 Prise en charge :

Aucun antidote n'est disponible à ce jour. Le traitement reste donc symptomatique, principalement par assistance respiratoire. Le charbon actif peut être utilisé afin de chélater la toxine dans l'estomac, si la prise en charge est précoce [29].

1.2.11 La STX comme potentielle arme de bioterrorisme :

1.2.11.1 Historique et classification :

La saxitoxine est la seule toxine sodique actuellement considérée comme une potentielle menace terroriste. La saxitoxine possède trois caractéristiques essentielles pour qu'une toxine soit utilisée en tant qu'arme: elle est toxique, stable et facile à produire. Elle est citée à plusieurs reprises dans différents rapports et conventions sur les armes biologiques (on retrouve parfois la dénomination d'agent "TZ"). C'est en 1977, date de la découverte de sa synthèse chimique, que la STX fut pour la première fois considérée comme arme potentielle. En 1986, l'institut international de recherche pour la paix de Stockholm la classifie avec 20 autres toxines (ne ciblant pas les canaux sodiques voltage dépendants) comme toxines les plus susceptibles d'être utilisées à des fins militaires. En 1997, la convention sur l'interdiction des armes biologiques classe la STX parmi les plus grandes menaces (aux côtés d'armes chimiques telles que le sarin, ou les gazs moutarde).

1.2.11.2 Voies potentielles d'intoxication :

L'utilisation de saxitoxine peut se faire selon différentes voies d'intoxication:

La première voie envisagée est la contamination des circuits d'eau potable. En effet, la saxitoxine est très soluble dans l'eau, et elle est insipide et inodore. De la même manière, la STX pourrait être utilisée pour contaminer des boissons ou des aliments (la toxine étant thermostable et résistant ainsi à la cuisson) [33].

La deuxième est la voie aérienne, via l'utilisation d'aérosol. En effet, la STX serait cinq à huit fois plus toxique par voie pulmonaire. En revanche, selon les estimations, afin de contaminer une superficie de 100 km² il faudrait plusieurs tonnes de STX disséminées par aérosol (alors que par comparaison seulement quelques kg de toxine botulique sont nécessaires). Cependant, en utilisant des techniques d'aérosol où les toxines sont micro-encapsulées, la toxicité est alors renforcée ce qui diminuerait la quantité nécessaire de toxines et rendrait plus facile la contamination par aérosol. Il faut tout de même rappeler qu'à ce jour, aucun cas d'intoxication humaine par voie aérienne n'a été rapporté [34].

1.2.11.3 Diagnostic et traitement :

Le diagnostic de l'intoxication à la STX s'appuiera essentiellement sur la clinique et les circonstances de l'intoxication, avec éventuellement l'analyse des aliments consommés ainsi que le réseau d'eau potable. Il faudra également rechercher les éventuels cas similaires, et déterminer l'origine soit naturelle, soit criminelle de l'intoxication afin de prendre les mesures adaptées [33].

Les précautions standards d'hygiène sont à appliquer mais il n'y a pas de mesures

particulières à prendre pour le transport des malades et les opérations funéraires.

Le traitement mis en place sera uniquement symptomatique, comme pour les intoxications naturelles [34].

1.2.11.4 Prévention :

La prévention des attaques de saxitoxine, mais également de toxines au sens large, passe par l'information et la formation des autorités publiques mais aussi des professionnels de santé et du public. De plus, la mise en place de plans d'urgence permet d'organiser rapidement les secours en cas d'attaque. Enfin, la recherche doit être orientée vers la mise au point d'un traitement efficace (avec dans l'idéal la découverte d'un antidote) ainsi que vers l'amélioration des techniques de détection et de diagnostic.

2) Les brévétoxines et les ciguatoxines :

Nous nous intéressons maintenant à deux classes de neurotoxines structurellement proches, agissant toutes deux sur le site 5 des canaux sodiques voltage dépendants : les ciguatoxines et les brévétoxines.

Ces toxines engendrent un blocage de l'inactivation rapide ce qui permet au canal de rester en position ouvert plus longtemps. De plus, le potentiel nécessaire à l'activation semble être diminué. Ces toxines vont donc favoriser l'activation des canaux sodiques.

En revanche, les mécanismes structure-activité entre ces deux classes de toxines et les résidus du canal restent encore très peu connus. Les acides aminés du canal impliqués dans le site d'interaction se situeraient sur les segments S5DIV et S6DI.

2.1) Les ciguatoxines (CTX) :

Les ciguatoxines (ou CTX) sont à l'origine du syndrome communément appelé ciguatera, ou Ciguatera Fish Poisoning (CFP). Il s'agit de l'intoxication par les poissons marins la plus fréquente dans le monde. Les estimations portent entre 10 et 50 000 personnes touchées par ce syndrome chaque année [35].

2.1.1 Répartition et Origine :

L'origine de leur nom provient d'un escargot appelé "cigua" dans les Antilles espagnoles, qui avait été accusé à tort d'être à l'origine de cette pathologie à Cuba dans les années 1500 [36]. Yasumoto et ses collaborateurs furent les premiers à mettre en évidence que les ciguatoxines, sont produites par des dinoflagellés du genre *Gambierdiscus*, notamment *G.toxicus* [37]. En réalité, les ciguatoxines sont produites par biotransformation des gambiertoxines, elles même produites par ces dinoflagellés. Ces algues prolifèrent auprès de récifs coralliens dans des climats tropicaux ou subtropicaux, et sont endémiques dans certaines régions des océans Indien, Pacifique et Atlantique [38]. Ainsi, la plupart des cas auront lieu dans ces régions tropicales ou subtropicales. Les seuls cas déclarés en zones tempérées proviennent soit de l'exportation de poissons, soit de tourisme [36].

Il a été décrit une augmentation des cas de ciguatera après la destruction des récifs coralliens. Ces récifs sont fragiles et peuvent être endommagés par des catastrophes naturelles (tsunami,...) ou par les activités humaines (développement commercial, pollution...) [39]. L'écosystème est ainsi bouleversé, les proportions de chaque espèce d'algues présentes au niveau du

récif varie, et les concentrations en CTX augmentent considérablement [40].

Ces algues sont ensuite ingérées par des poissons (barracuda, anguille, poisson perroquet, rouget...), les toxines sont alors accumulées via la chaîne alimentaire, et l'homme se contamine en consommant des poissons ayant accumulé ces neurotoxines. Les poissons ne sont pas les seuls à contenir ces toxines, certains invertébrés et crustacés (oursin, homard, crabe...) accumulent aussi les CTX, mais à des taux bien inférieurs [41].

Les animaux marins ne manifestent cependant aucun signe de toxicité suite à la présence de ces neurotoxines, ce qui pourrait être expliqué par l'hypothèse de la présence de protéines de séquestrations [36].

2.1.2 Structure :

L'équipe de Yasumoto fut la première à décrire la structure de plusieurs ciguatoxines. Ces neurotoxines forment une famille d'éther polycycliques liposolubles. A ce jour, plus de vingt molécules ont été décrites dans ce groupe des ciguatoxines.

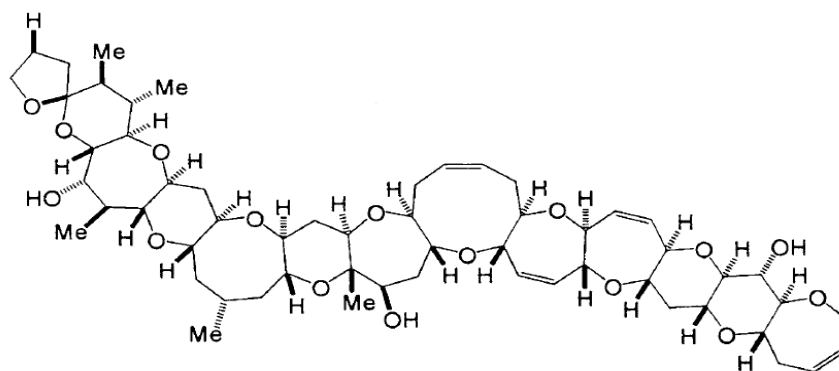


Figure 6 : Exemple de ciguatoxines : la ciguatoxine 3C [42]

La nomenclature des ciguatoxines se base sur l'abréviation CTX suivie d'une lettre représentant le lieu de sa découverte ("P" pour l'océan Pacifique, "A" pour l'océan Atlantique, "I" pour l'océan Indien et "C" pour les Caraïbes) suivi d'un chiffre pour l'ordre chronologique de découverte.

De par les faibles concentrations de ciguatoxines retrouvées dans la nature (une faible quantité suffit à être toxique), et de par les difficultés à isoler ces molécules, de nombreux travaux ont été effectués afin de réaliser la synthèse complète de ces toxines. Cependant, leur haut poids moléculaire et leur complexité chimique ont été pendant des années un frein à la découverte de leur synthèse chimique totale [37].

Plusieurs voies ont été décrites à ce jour (notamment par l'équipe de Inoue en 2004), qui passent toutes par un composé intermédiaire clé, le decacyclic O,S-acetal.

2.1.3 Toxicologie :

La toxicité est variable entre les différentes ciguatoxines. Certaines d'entre elles sont capables d'engendrer des effets nocifs pour la santé de l'homme en cas d'ingestion même à faible dose, dès 0,1µg/kg [35]. La DL50 chez la souris en injection intrapéritonéale se situe entre 0,25 à 4 µg/kg en fonction des toxines étudiées. Aux environs de 70 ng par voie orale chez la souris, l'animal développe une symptomatologie proche d'une intoxication ciguatérique humaine [37].

De par leur liposolubilité, ces toxines peuvent être transmises par le lait maternel et par le placenta. En revanche, elles n'affectent pas le développement du fœtus (seule une accélération des mouvements du fœtus a été rapportée) [43].

2.1.4 Clinique aigüe de l'intoxication :

L'homme se contamine en consommant des poissons ayant accumulé les toxines (le risque est donc plus élevé en mangeant des poissons carnivores). Les CTX se retrouvant essentiellement dans les viscères (foie, gonade, tête), le risque d'intoxication est ainsi plus élevé en consommant le poisson en entier plutôt que de ne manger que les filets [35].

Après intoxication, on retrouvera un ensemble de symptômes gastro-intestinaux, neurologiques et psychiatriques.

Dans un premier temps, les symptômes gastro-intestinaux se manifestent dans les 24 premières heures (vomissements, diarrhée, douleur abdominale), et disparaissent généralement spontanément en quelques jours. Les signes cardiaques, principalement hypotension et bradycardie, se manifesteront précocement et pourront nécessiter une hospitalisation d'urgence [43].

Les symptômes neurologiques interviendront dans les jours suivants la consommation, à titre de paresthésies, prurit, fatigue, inversion de la sensation du froid et du chaud, ou faiblesse dans les jambes [38]. Ces symptômes peuvent se manifester pendant plusieurs semaines (en moyenne entre un et deux mois [37]). Enfin des symptômes neuropsychiatriques peuvent survenir, le plus souvent anxiété et dépression, mais parfois vertiges et hallucinations.

Cependant, la clinique peut être différente d'une région à l'autre, due principalement à la différence de quantités et de proportions de chacune des CTX. Par exemple, dans les Caraïbes, les symptômes gastro-intestinaux auront tendance à être prédominants, alors que dans les régions du Pacifique on retrouvera plus de cas de symptômes nerveux sévères [35].

Même si la symptomatologie peut être grave, les cas d'intoxications mortelles restent rares, les toxines retrouvées chez les poissons atteignant rarement des concentrations létales pour l'homme (le taux de mortalité semble être inférieur à 0,1% [36]). Toutefois, dans certains cas sévères, le décès peut survenir par déshydratation et choc cardiovasculaire, ou par arrêt respiratoire suite à la paralysie des muscles respiratoires.

Remarque: les ciguatoxines ne sont pas les seules responsables de l'apparition de la clinique de la ciguatera. Les dinoflagellés du genre Gambierdiscus produisent également le gambierol, n'ayant aucun effet sur les canaux sodiques, mais inhibant les canaux potassiques K⁺ [42].

2.1.5 Symptômes chroniques et récurrence :

En plus de cette phase clinique aiguë, la CFP est également caractérisée par l'apparition de symptômes plus durables. Une sensation de fatigue générale est ressentie par la personne pendant plusieurs semaines, et certains symptômes neurologiques périphériques (notamment une paresthésie des extrémités) peuvent perdurer jusqu'à plusieurs mois voire années [16].

De plus, une réapparition de la clinique en phase aiguë a pu être observée chez des personnes n'ayant pourtant pas consommé de nouveau des poissons contaminés. En effet, certains facteurs, n'étant pas nocifs chez des personnes n'ayant jamais été atteintes de ciguatera, ont été signalés comme pouvant déclencher une récurrence de la symptomatologie neurologique (les symptômes cardiovasculaires et gastro-intestinaux ne sont pas présents lors de cette récurrence).

Il est ainsi recommandé aux personnes ayant été intoxiquées d'éviter de consommer pendant 3 à 6 mois de l'alcool, des poissons même non toxiques, mais aussi de faire attention à la caféine, aux noix, au porc et au poulet. De plus, l'activité physique intense peut également être à l'origine de la résurgence des symptômes. Ce phénomène peut se produire même des années après le cas de CFP [35].

Une des hypothèses proposées pouvant expliquer cette récurrence est le stockage des CTX dans les tissus adipeux, qui sont ensuite libérées dans l'organisme à la suite de certains facteurs augmentant le métabolisme lipidique.

2.1.6 Prise en charge :

En l'absence d'antidote disponible (même si des recherches sont en cours, à partir du brevenal, cf la partie sur les brévétotoxines), le traitement est uniquement symptomatique (surveillance de l'équilibre hydroélectrolytique, atropine, intubation...). Pour les symptômes

neurologiques, l'amitriptyline peut être utilisée sur les paresthésies et les maux de tête, et la fluoxétine est parfois mise en place en cas de sensation de fatigue chronique. La gabapentine peut également être employée.

Certains préconisent l'utilisation du mannitol par voie intraveineuse à la dose de 0,5 à 1g/kg, s'il est administré précocement dans les premiers jours après intoxication. Cependant, son utilisation n'est pas systématique du fait du manque de preuves sur son efficacité et d'une possible augmentation du risque de défaillance cardiaque [35].

Il existe également de nombreux traitements issus de médecines traditionnelles dans les régions sévèrement touchées par la ciguatera. De nombreux végétaux tels que *Argusia argentea* ou *Davalliea sp* sont ainsi utilisés par les populations locales.

2.1.7 Diagnostic et analyse :

A ce jour, aucun test d'analyse sur l'homme n'est disponible afin de confirmer une intoxication par CTX. Le diagnostic se basera donc sur la clinique, la notion de consommation de poisson de récif, ainsi que par l'analyse du poisson consommé (même si les résultats mettent du temps à revenir au clinicien).

Pour la détection de CTX chez les poissons, de nombreuses techniques ont été développées. D'une part pour confirmer l'origine de l'intoxication, mais également en prévention, pour la surveillance des poissons pêchés et commercialisés. A ce jour, deux techniques sont les plus utilisées:

Une première technique *in vitro* détecte la capacité de ces neurotoxines à activer les canaux sodiques voltage dépendants sur des cellules de neuroblastome de souris (ce qui permet de les différencier des autres toxines marines vues précédemment, TTX et STX, qui elles bloquent l'influx sodique). En revanche, cette méthode ne permet pas de les différencier des brevétoxines, que nous verrons dans la prochaine partie [35].

Une deuxième technique, l'analyse chimique par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse, permet également d'identifier les CTX. Cette méthode a l'avantage de pouvoir être utilisée sur des poissons vivants, puisque le recueil d'échantillons se fait dans le sang et pas dans les muscles. Cette technique peut ainsi permettre d'effectuer un monitoring en continu d'un récif corallien, sans avoir à tuer plusieurs espèces de poissons [44].

Cependant, il s'agit de méthodes d'analyse coûteuses et difficiles à mettre en œuvre. La conception d'une méthode d'analyse utilisable par les pêcheurs locaux, fiable, peu coûteuse, facilement réalisable et capable de détecter de faibles concentrations de CTX n'a pas encore été rendue possible à ce jour.

Il y a quelques années, le test Cigua check était commercialisé, mais il a été retiré du marché du fait d'un trop grand taux de faux positifs et de faux négatifs [45].

2.1.8. Prévention :

Sans moyen de détection simple disponible, la prévention des intoxications reste donc assez difficile à mettre en oeuvre d'autant plus que les cas de ciguatera sont sporadiques, et ne sont pas prédictibles dans le temps ou dans l'espace. De plus, comme de nombreuses toxines marines, les CTXs n'ont ni odeur ni goût particuliers, et résistent à la cuisson et à la congélation [35].

Les populations locales ont su développer des techniques afin de détecter les poissons porteurs de CTX (absence de rigidité cadavérique, signes hémorragiques après incision quelques heures après la mort de l'animal, viscères administrées à des animaux ou insectes....). Cependant ces tests ne sont ni très sensibles, ni très spécifiques et dépendent beaucoup de la personne qui les réalise [45].

Les recommandations générales afin de lutter contre ces intoxications repose donc sur le fait de diminuer sa consommation de poissons, notamment dans les zones tropicales à risque. Il est ainsi recommandé aux personnes de manger de faibles quantités de différentes espèces de poissons, plutôt qu'une seule espèce en grande quantité. La population est également incitée à ne pas consommer les viscères des poissons de récif, et d'éviter les poissons prédateurs des poissons de récif (qui sont au bout de la chaîne alimentaire et qui accumulent ainsi une grande quantité de neurotoxines). L'éducation et les informations données aux pêcheurs, à la population locale et aux touristes sont également une grande part du programme de prévention envers la CFP [35].

2.2) Les brévétoxines :

Les brévétoxines sont des neurotoxines responsables d'un syndrome neurologique d'intoxication aux fruits de mer, ou Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP).

2.2.1 Origine :

La brévétoxine est produite par des espèces de dinoflagellés, principalement *Karenia brevis* (cette espèce peut également être nommée *Gymnodinium breve* ou *Ptychodiscus brevis* [46]) mais aussi *K.mikimotoi*, *K.brevisulcata*, *K.selliformis*, entre autres.

K.brevis se concentre majoritairement sur les côtes du golf du Mexique, dans la mer des Caraïbes et en Nouvelle Zélande. Les cas de NSP auront lieu presque exclusivement dans ces régions, exceptés dans les cas d'importation de coquillages ou de tourisme [47].

K. brevis forme régulièrement ce que l'on appelle des floraisons (ou « bloom » en anglais), qui résulte d'une multiplication massive d'algues unicellulaires (environ 10^5 à 10^6 cellules par litre[48]), provoquant alors une coloration sombre de l'eau allant de rouge à marron. On parle alors d'harmful algal bloom (HAB) ou plus communément de "Florida red tie". Ces floraisons apparaissent le plus fréquemment en fin d'été ou début d'automne, et durent de quelques semaines à plusieurs mois. Elles surviennent sur les côtes de Floride presque une fois par an. Elles peuvent recouvrir plus de 10 000 kilomètres carrés d'océan [49]. Ces événements ne sont pas nouveaux et sont décrits depuis des siècles, et il semblerait que la première description d'une HAB remonte au milieu des années 1500 lors de la découverte de l'Amérique par les espagnols. Cette constatation laisserait à penser que les floraisons de *K.brevis* ont lieu depuis des centaines d'années, même s'il a été constaté que leur fréquence d'apparition aurait tendance à augmenter ces dernières années [50].

Ces événements provoquent le décès de nombreuses espèces marines telles que poissons mais aussi mammifères marins et oiseaux de mer. La toxicité de ces floraisons est en grande partie attribuée aux brévétoxines, même si ces dinoflagellés produisent également d'autres toxines (entre autres: gymnodimine, karlotoxines....) [47].

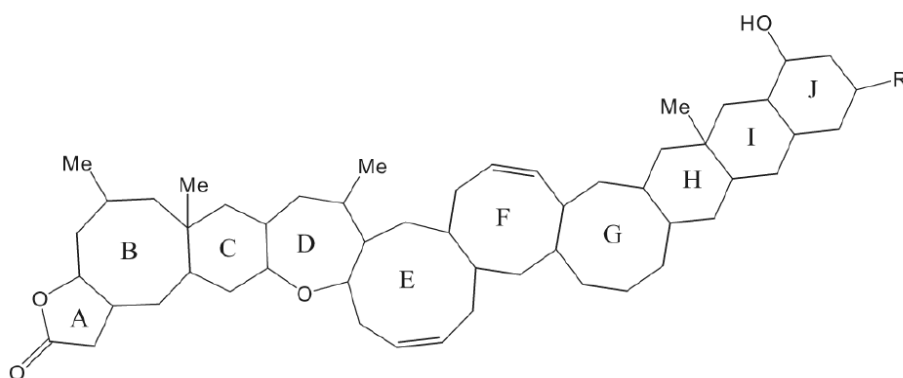
2.2.2 Structure :

On regroupe sous le terme de brévétoxines une dizaine de molécules ayant les mêmes propriétés pharmacologiques et cliniques. De plus, on peut rajouter à ce groupe de nombreux composés analogues et métabolites possédant la même base structurale.

En 1986, leur structure est pour la première fois décrite par Shimizu et ses collaborateurs. Ce sont des polyethers cycliques liposolubles, d'une masse moléculaire d'environ 900 [51].

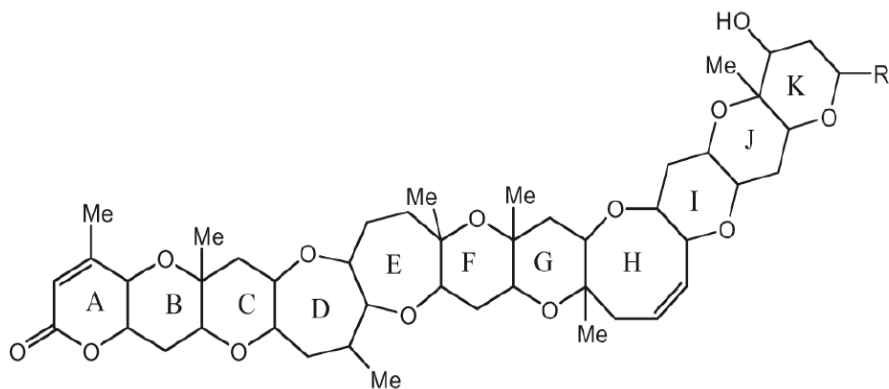
Ce sont des composés constitués d'une série linéaire trans d'une dizaine de cycles carbonnés, on parle de "polyéther en échelle". La synthèse chimique complète de cette classe chimique a été réalisée en 1998 par l'équipe de Nicolaou [52].

Deux molécules "parentes", PbTx-1 et PbTx-2, sont à la base de deux groupes structurellement distincts de toxines (respectivement les brevétoxines de type A avec PbtX-7 et les brevétoxines de type B avec PbtX-3 et PbtX-9).



Nom de la toxine	R=
PbTx-1	$\text{CH}_2\text{C}(=\text{CH}_2)\text{CHO}$
PbTx-7	$\text{CH}_2\text{C}(=\text{CH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$
PbTx-10	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$

Figure 7 : Structure des brevétoxines de type A [50]



Nom de la toxine	R=
PbTx-2	$\text{CH}_2\text{C}(=\text{CH}_2)\text{CHO}$
PbTx-3	$\text{CH}_2\text{C}(=\text{CH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$
PbTx-5	$\text{CH}_2\text{C}(=\text{CH}_2)\text{CHO}$, C_{37} : OAc
PbTx-6	$\text{CH}_2\text{C}(=\text{CH}_2)\text{CHO}$, epoxyde en $\text{C}_{27}\text{-C}_{28}$
PbTx-8	$\text{CH}_2\text{COCH}_2\text{Cl}$
PbTx-9	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$

Figure 8 : Structure des brevetoxines de type B [50]

Les proportions de chacune de ces toxines peuvent varier, mais généralement *K.brevis* produit en majorité PbTx-2. En revanche, le composé le plus toxique est PbTx-1 [46].

Remarque : la notation PbTx des toxines provient de *Ptychodiscus brevis*, ancienne dénomination de *K.brevis* [48].

2.2.3 Intérêt biologique des brevéttoxines :

Le rôle des brevéttoxines pour *K.brevis* est encore inconnu à ce jour. Toutefois, il a été remarqué que les dinoflagellés augmentaient la production de brevéttoxines en cas de stress osmotique, lors d'un changement de salinité dans l'eau environnante. Expérimentalement, lorsque l'on diminue le taux de salinité dans le milieu de culture des algues, c'est à dire que l'on passe de conditions environnementales de type océanique (forte salinité) à des conditions retrouvées aux bords des côtes (salinité plus faible), la production de brevéttoxines est multipliée par un facteur 14 (sans que la croissance des algues soit affectée). Ces neurotoxines joueraient donc un rôle chez l'organisme producteur d'osmorégulateur par le biais des canaux sodiques [53].

2.2.4 Pharmacocinétique et Toxicité :

De par leur liposolubilité, ces neurotoxines sont rapidement absorbées et distribuées dans tout l'organisme, et traversent même la barrière hémato-encéphalique [54]. Elles sont ensuite métabolisées par le foie (où elles subissent des réactions d'hydrolyse, d'époxydation ainsi qu'une conjugaison au glutathion ou à la cystéine) et excrétées ensuite dans la bile et l'urine. Leur demi-vie dans le flux sanguin semble assez courte, même si l'élimination de l'organisme entier prend plusieurs jours (PbTx-3 par exemple peut être retrouvée dans le foie jusqu'à 8 jours après administration) [47].

Dans les fruits de mer, on retrouve en plus des neurotoxines inchangées des métabolites moins toxiques de type cystéine-PbTx et cystéine-PbTx sulfoxyde, entre autres [46].

La DL50 chez la souris de PbTx-3 est d'environ 0,170mg/kg par voie intrapéritonéale, 0,094mg/kg en intraveineux et 0,520 mg/kg par voie orale [47]. La toxicité chez l'homme n'est pas encore chiffrée à ce jour.

La toxicité des métabolites est peu documentée, mais il semblerait qu'ils le soient moins que les composés parents. La toxicité chronique est à ce jour inconnue.

2.2.5 Intoxications Humaines :

Même si les brévétotoxines semblent proches des ciguatoxines en terme d'origine, de structure et de mécanisme d'action, les modes d'intoxication des deux neurotoxines sont très différents. En ce qui concerne les brévétotoxines, deux voies très distinctes d'intoxication ont été recensées chez l'homme.

2.2.5.1 NSP : Neurotoxic Shellfish Poisoning :

La première voie d'intoxication est la voie orale, de par la consommation de fruits de mers contaminés par les neurotoxines. En effet, les moules, les huîtres, les coques, les palourdes ou encore les bulots accumulent les toxines de par la chaîne alimentaire sans être affectés par celles-ci [47].

Il est à noter que les brévétotoxines sont également retrouvées chez certains poissons, principalement au niveau de l'estomac et du foie, à des concentrations parfois élevées pendant les épisodes de floraison, mais n'entraînant pas de conséquences en pathologie humaine. En revanche, en 2004 en Floride, il a été documenté le décès de plusieurs dauphins appartenant à l'espèce *Tursiops truncatus*, ayant consommé des poissons porteurs d'une grande quantité de toxines (33,200ng/g de viscère) [49].

La clinique de l'intoxication ressemble à une intoxication ciguatérique, mais de gravité moindre. Comme avec les ciguatoxines, le NSP regroupe essentiellement des symptômes gastro-intestinaux qui apparaissent dans les premières heures, puis des symptômes nerveux qui surviennent dans un second temps. Parfois, certains symptômes cardiaques telles que bradycardie et hypotension sont observés [47].

Le plus souvent, les victimes d'intoxication rapportent nausées, vomissements et diarrhées, picotement au niveau de la langue et du visage, paresthésies plus ou moins sévères (notamment des extrémités), et inversion de la sensation du chaud et du froid [49].

La clinique du NSP est parfois comparée à celle du PSP (due à la STX), mais de sévérité inférieure.

Aucun décès n'a été reporté à ce jour suite à l'ingestion de ces fruits de mer et les symptômes chroniques semblent inexistantes (contrairement aux ciguatoxines) [47].

Le traitement reste uniquement symptomatique en absence d'antidote actuellement disponible. Le mannitol utilisé pour les cas de ciguatoxines semble être utile uniquement si la prise en charge est précoce.

Du fait de l'importance de la surveillance de routine effectuée par les autorités compétentes sur les côtes du Golf du Mexique et en Nouvelle Zélande, les cas de NSP sont très rares. La plupart des intoxications ont lieu lors de pêches par des touristes, non sensibilisés aux dangers pendant et après un épisode d'HAB [47].

2.2.5.2 Intoxication par aérosol :

La deuxième voie d'intoxication par les brevéttoxines est la voie aérienne. *K.brevis* est une dinoflagellée fragile dont la membrane peut se rompre sous l'effet des vagues, libérant ainsi les neurotoxines dans la mer [49]. Lors de HAB où la densité d'algues présentes est importante, la quantité de brevéttoxines libérées peut être très élevée, ce qui provoque la mort de nombreuses espèces marines (poissons, tortues, dauphins, reptiles, oiseaux...). De plus, sous l'action des vents et des vagues, les brevéttoxines sont aérosolisées, transportées sur les plages et inhalées. Il a été rapporté que la toxine majoritaire dans les aérosols serait PbTx-3, alors que dans l'eau de mer, PbTx-2 est majoritaire [50].

L'inhalation de ces toxines entraîne des symptômes respiratoires dus à une constriction des voies aériennes supérieures, tels que toux, irritation de la gorge, éternuement mais aussi prurit au niveau des yeux et larmoiements qui peuvent durer parfois plusieurs jours [55]. L'intoxication est plus importante chez les personnes atteintes de pathologies respiratoires, notamment les

asthmatiques.

D'après une étude qui a été menée chez des rats [56], il a été mis en évidence après une exposition chronique une diminution du poids des animaux ainsi qu'une suppression de l'immunité humorale, qui les rendaient plus vulnérables aux surinfections respiratoires [57].

Afin de prévenir ces intoxications, il est recommandé aux personnes à risque (garde côte, personnes travaillant ou habitant près des côtes, surtout si elles sont asthmatiques ou ayant des problèmes respiratoires [58]) pendant les épisodes de HAB de ne pas rester trop longtemps au bord des côtes, et si nécessaire de porter un masque [47].

En cas de symptômes gênants, la prise en charge pourra se faire à l'aide d'atropine, et de diphenhydramine. Des beta mimétiques bronchodilatateurs tels que le budesonide ou l'albuterol peuvent également être utilisés [55].

2.2.6 Le brevenal :

Depuis longtemps, il a été remarqué une variation de la gravité des symptômes engendrés par les brévéttoxines, qui ne soit pas entièrement due à une variation de leur concentration. En effet, de faibles toxicités ont été observées pour certaines HAB avec pourtant des concentrations en brévéttoxines élevées. Il a été proposé la présence d'un composé pharmacologique capable de moduler la toxicité des neurotoxines.

Récemment, un autre polyéther naturel produit par *K.brevis* a été isolé, le brevenal. Il s'agit d'un composé non toxique, qui a la particularité d'être un antagoniste compétitif des brévéttoxines sur le site 5 des canaux sodiques voltage dépendants. Administré seul, il n'a aucun effet sur l'influx sodique. Il a été ainsi émis l'hypothèse que la toxicité relevait donc du rapport des proportions entre la concentration en brévéttoxines et la concentration en brevenal produites par *K.brevis*. Il a été montré que la proportion de brevenal produites était faible lors des phases de multiplication des dinoflagellées (phase de croissance logarithmique), alors qu'elle augmentait en cas de manque de nutriments et en cas de forte densité en algue [59].

La proportion de brevenal parmi les brévéttoxines reste peu élevée, en moyenne 6%, ce qui représente environ 1pg par cellule. Son rôle chez les dinoflagellées restent cependant à ce jour inconnu [53].

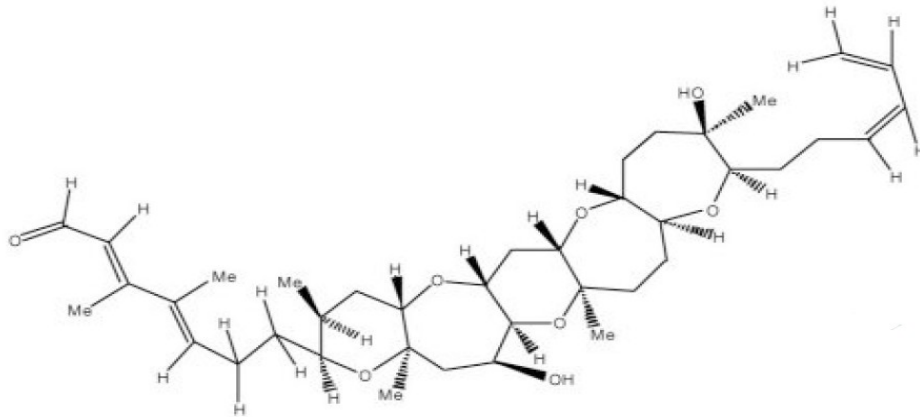


Figure 9 : Structure du brevénal [59]

Actuellement, des recherches sont en cours afin de développer des thérapeutiques pour prévenir ou traiter des intoxications aux brévétotoxines (et peut être également des ciguatoxines) sur la base de la structure du brévenal.

2.2.7 Prévention :

Comme de nombreuses autres toxines marines, elles résistent à la cuisson et à la congélation, et n'ont pas d'odeur ou de goût particulier. La seule prévention possible est donc la surveillance des évènements de HAB et l'analyse des taux de brévétotoxines.

Différentes techniques d'analyses sont utilisables. Malgré ses inconvénients, le gold standard reste le recours aux essais sur des souris avec injection intrapéritonéale. Les résultats sont donnés en unités souris (une unité équivaut à la quantité de toxine qui tuerait en moyenne 50% des animaux testés en 940 minutes, soit environ 4 microgrammes de PbTX-2) pour 100g de chair de fruits de mer [47]. Ces tests sont cependant longs (les résultats sont obtenus après trois jours) ce qui provoque de lourdes conséquences économiques: la réouverture d'une zone de pêche contaminée peut être retardée de plusieurs jours. (on estime à 20 millions de dollars de pertes économiques liées aux brévétotoxines [48]).

D'autres tests sont également disponibles: test ELISA, radioimmunoassay et HPLC plus ou moins couplé à un spectromètre de masse. Actuellement, de par son faible coût, sa rapidité, sa facilité de mise en place et sa basse limite de détection (estimée à 20ng de toxine par gramme de chair de coquillage), le test ELISA semblerait être un bon test de remplacement aux essais sur animaux [47].

Ces tests permettent de surveiller en routine la concentration en brévétoxines contenues dans les fruits de mer. La limite de sécurité établie par la Food and Drug Administration (FDA) est fixée à 20 MU pour 100 grammes de chair de fruits de mer. De plus, les lieux de culture de fruits de mer situés en Floride doivent être fermés si plus de 5000 cellules de *K.brevis* sont détectées par litre d'eau. Depuis que ces mesures ont été prises, aucun cas d'intoxication n'a été recensé sur des coquillages commercialisés provenant du golf du Mexique [47].

De plus, des actions d'informations sont régulièrement menées afin de sensibiliser les pêcheurs de plaisance lors de périodes à risque.

3) Les conotoxines :

3.1 Les cônes :

Les conotoxines sont produites par des mollusques marins de faible profondeur appelés cônes, appartenant au genre *Conus*, principalement distribués dans les régions océaniques intertropicales. Les cônes se distinguent de par la couleur et la taille de leur coquille (généralement comprise entre 1 et 20 centimètres), enroulée de façon dextre autour d'un axe [60].

Les cônes sont des espèces carnivores qui sont classés en trois groupes: les vermivores (se nourrissant de vers), les malacophages (de mollusques) et les piscivores (de poissons). Les cônes utilisent ces conotoxines afin de capturer leurs proies, mais également pour se défendre des prédateurs et pour repousser d'autres cônes concurrents.

3.2 Clinique de l'envenimation chez l'homme :

Les cas d'envenimations chez l'homme, sont relativement rares, et peu de descriptions cliniques sont disponibles. Même s'ils peuvent être pêchés pour être consommés (comme c'est le cas dans certaines îles du Pacifique), la plupart des piqûres ont lieu lorsque la victime ramasse le cône pour admirer sa beauté [61].

Après la piqûre apparaît dans un premier temps une vive douleur, puis un engourdissement et une paralysie qui s'étend le long du corps. Une diplopie, et des symptômes digestifs peuvent également être observés. Dans la plupart des intoxications, les symptômes sont sans gravité. En revanche, des cas de décès ont été décrits par arrêt cardiorespiratoire avec certaines espèces considérées comme plus dangereuses pour l'homme, comme notamment *Conus geographus* [60] (il a été estimé à 70% le taux de décès sans traitement après une piqûre par cette espèce [61]).

3.3 Le venin de cône :

L'appareil venimeux des cônes est composé d'un conduit à venin qui produit le venin, d'une glande musculaire qui l'expulse, et d'un sac radiculaire. Ce dernier contient les dents radiculaires remplies de venin qui seront projetées sur la proie à l'aide d'un proboscis à la manière d'un harpon [60]. Environ 50µL de venin est alors injecté dans la proie [62].

Les 700 espèces de cônes produisent chacune plus d'une centaine de conotoxines différentes, avec un faible taux de mêmes conotoxines produites par deux espèces différentes (estimé à 5%). Ainsi, il est probable que plusieurs milliers de conotoxines différentes puissent être produites par les

cônes, alors qu'à l'heure actuelle seules environ 0,2% d'entre elles ont été caractérisées [62].

Les cibles pharmacologiques de ces toxines sont multiples: récepteurs couplés aux protéines G, transporteurs de neurotransmetteurs, mais surtout canaux ioniques potassiques, sodiques ou calciques, voltage dépendants ou ligand dépendants.

Ces différentes toxines agissent en synergie afin d'affaiblir la proie. Il a été identifié différents ensembles de toxines (ou « cabal ») qui agissent de façon combinée afin d'obtenir un même but chez la victime [61].

Le "lightning strike cabal" engendre une immobilisation rapide de la proie, grâce à l'action de peptides ciblant les canaux sodiques voltage dépendants et de bloqueurs des canaux potassiques. Ils provoquent une dépolarisation massive des axones, et la victime est dans un état proche de l'électrocution.

Le "motor cabal" entraîne lui dans un deuxième temps une suppression de la transmission neuromusculaire. Les toxines ciblant les canaux sodiques voltage dépendants (notamment Nav1.4) jouent ici un rôle, en association avec celles ciblant les canaux calciques et les récepteurs nicotiniques.

Un troisième ensemble est également décrit: le "nirvana cabal", qui provoque une diminution des sensations chez la proie et un sentiment d'euphorie [63].

De ce fait, même si dans le venin de cône se retrouvent des toxines ayant apparemment des effets contradictoires (activation et inhibition des canaux sodiques), ces peptides agissent en synergie en ciblant des sous types de canaux sodiques différents. Alors que les bloqueurs des canaux sodiques musculaires (Nav1.4) joueront un rôle dans le « motor cabal », les inhibiteurs de l'inactivation des canaux sodiques joueront leur rôle plus précocement sur les canaux nerveux dans le « lightning strike cabal » [61].

3.4 Structure et caractéristiques des conotoxines :

Les conotoxines sont en moyenne de petite taille, comprenant entre 8 et 41 acides aminés (les protéines présentes dans les venins sont en général de taille beaucoup plus importante, entre 40 et 80 résidus) [61].

Les conotoxines sont des peptides produits dans un premier temps sous forme de précurseurs pre-propeptides. La région "pre" N terminale et la région "pro" C terminale sont ensuite clivées afin de libérer la toxine mature, la plupart du temps dans le conduit à venin (où les protéases correspondantes sont présentes). Ceci permet à la conotoxine de se replier correctement, et ainsi de

former des ponts disulfure corrects [64].

Les conotoxines se caractérisent également par la grande fréquence des modifications post traductionnelles de leur séquences en acides aminés (hydroxyproline, O- glycosilation des sérines et thréonines, γ -carboxylation du glutamate...).

3.5 Nomenclature des conotoxines :

Le nom de chaque toxine est construit à partir: de son activité biologique, du nom du cône duquel elle est extraite, du motif cystéine présent dans sa structure ainsi que d'une lettre selon l'ordre de découverte chez le cône. Ainsi, μ -GIIIA est une toxine ayant une activité μ -conotoxine, extraite de *C.geographus*, possédant le motif cystéine III et étant la première découverte chez ce cône [60].

3.6 Classification des conotoxines :

Parmi les peptides présents dans le venin des cônes, deux grandes classes sont différenciées:

* Les conopeptides non riches en ponts disulfures. Les conantokines ciblant le récepteur NMDA et les contulakines ciblant le récepteur de la neurotensine font partie de cette classe [61].

* Les conopeptides riches en ponts disulfures, qui possèdent de nombreux résidus cystéines dans leur structure primaire. Ces sont de petits peptides (généralement moins de 40 acides aminés), réticulés par deux à cinq ponts disulfure ce qui leur donne une certaine stabilité [60].

Les toxines sont séparées alors en super-famille, non pas par activité pharmacologique, mais par l'arrangement des cystéines dans leur structure.

Concernant les neurotoxines ciblant les canaux sodiques, nous nous intéresserons aux super familles O, M et I. Nous détaillerons les μ -conotoxines et les μ O-conotoxines, inhibiteurs des canaux sodiques voltage dépendants, contrairement aux ι -conotoxines et aux δ -conotoxines, activatrices de ces canaux.

3.6.1 la super famille M : Les μ -conotoxines :

Les μ -conotoxines furent historiquement découvertes dans le venin de *C. geographus*. A ce jour, plus d'une vingtaine ont été décrites [62]. Elles sont composées de 16 à 26 acides aminés et possèdent un enchaînement de six cystéines caractéristique de leur super famille M: "CC-C-C-CC" (ou motif cystéine III), avec les tirets "-" représentant les boucles dans la structure et les "C" représentant l'emplacement des cystéines. Ces six cystéines forment dans la structure

tridimensionnelle trois ponts disulfures. Ce sont des peptides qui possèdent une charge globale positive essentielle à leur activité [65].

Les μ -conotoxines se fixent sur le site 1 des canaux sodiques (tout comme la TTX et la STX), et bloquent alors l'influx sodique. En revanche, elles ne possèdent pas la même sélectivité que la TTX, et les sous types TTX-R d'insectes peuvent être bloquées par certains types de conotoxines (telle que SmIIIa extraite de *C.stercusmuscarum*) [61]. En effet les deux sites de liaison ne sont pas strictement identiques mais se chevauchent, le site de liaison de la TTX se trouverait plus en profondeur dans le pore [62].

Le mécanisme d'action passerait par l'intervention d'un résidu arginine en position 13 ou 14 selon les toxines, dans la partie C terminale, qui occlurait le pore d'une part de manière stérique, mais également par répulsion électrostatique (la conotoxine occlurait une partie du pore, et limiterait également le passage des ions sodium par répulsion électrostatique avec ses charges positives) [66] [67].

Les μ -conotoxines les plus étudiées restent μ -GIIIA et μ -GIIIB extraites du venin de *C.geographus*. Ces toxines sont spécifiques des sous types musculaires (Nav1.4) de canaux sodiques. Elles jouent ainsi un rôle majeur dans la paralysie de la proie au niveau de la jonction neuromusculaire. En revanche, d'autres μ -conotoxines comme μ -PIIIA (extraite de *C.purpurascens*) sont moins sélectives et bloquent également d'autres sous types tels que Nav1.2 [61].

3.6.2 La super famille O :

Cette famille rassemble des peptides plutôt hydrophobes possédant l'enchaînement "C-C-CC-C-C" (ou motif cystéine VI ou VII), donnant naissance à un motif nommé ICK (Inhibitory Cysteine Knot) [61].

***** Les μ O-conotoxines :**

Ces toxines, tout comme les μ -conotoxines, inhibent l'influx des ions sodium, mais par un mécanisme différent. En effet, la liaison de ces deux types de toxines ne sont pas compétitives, les μ O-conotoxines ne semblent donc pas agir sur le site 1. Elles sembleraient agir sur la sensibilité au voltage du domaine II du canal et se lieraient vraisemblablement sur des résidus proches du site 6, mais à l'heure actuelle leur mécanisme d'action reste encore mal compris [62].

Les peptides μ O-MrVIA et μ O-MrVIB issus de *C.marmoreus* font partie de cette classe. Ce sont des toxines très étudiées actuellement de par leur sélectivité sur le sous type Nav1.8 et de probables applications futures dans le traitement de la douleur.

*****Les δ -conotoxines :**

Ces neurotoxines agissent en inhibant l'inactivation rapide des canaux sodiques, entraînant ainsi une prolongation des potentiels d'action. Ces toxines sont ainsi des composés majeurs du "lightning strike cabal" puisqu'elles provoquent un état d'hyperexcitabilité électrique massif [61].

Le mécanisme d'action passerait par l'intervention de résidus hydrophobes présentés à la surface du peptide qui interagiraient ainsi avec des résidus hydrophobes du domaine IV appartenant au site 6 (il est à noter que seules les δ -conotoxines fixent le site 6, elles ont donc permis de définir ce nouveau site d'interaction).

Seules les δ -conotoxines extraites de cônes piscivores présentent une activité sur les canaux sodiques de mammifères. Cependant, les δ -conotoxines provenant de cônes malacophages ne bloquent pas les canaux de mammifères mais se fixent tout de même sur le site d'interaction [62] (ainsi, elles diminuent le potentiel toxique de celles ayant une activité toxique sur ce site, lorsqu'elles sont administrées en même temps [60]).

δ -TxVIA (extrait de *C.textile*) active sur les mollusques et δ -PVIA (de *C.purpurascens*) active sur les vertébrés font partie de cette classe de conotoxines [61].

3.6.3 Les ι -conotoxines :

Ces toxines ont la particularité de se retrouver dans différentes super familles. ι -RXIA est un peptide de 46 acides aminés qui appartient à la superfamille I. Cette superfamille se caractérise par le motif C-C-CC-CC-C-C (ou motif cystéine XI) et forme un motif ICK tout comme la superfamille O. LtIIIA possède 17 résidus et en revanche appartient à la superfamille M, tout comme les μ -conotoxines.

Ces toxines agiraient en facilitant l'ouverture du canal en abaissant le seuil du potentiel d'activation sans affecter les mécanismes de l'inactivation. Cependant le site d'interaction du canal avec lequel interagissent ces toxines reste encore à découvrir [62].

3.7 Intérêt des conotoxines :

L'intérêt des chercheurs pour ces toxines reste assez récent puisque les premières études sur le venin de cône date des années 1970 [63].

Cependant, ces neurotoxines possèdent de nombreux avantages intéressants: elles ciblent différents sites du canal, elles sont très sélectives d'un sous type particulier des canaux sodiques voltage dépendants, elles peuvent être soit inhibitrices soit activatrices du flux sodique et ce sont de petits peptides très actifs [62]. Elles ont ainsi été très étudiées récemment afin de mieux caractériser

le canal, mais également afin de découvrir certaines applications potentielles en thérapeutique et en diagnostic.

Il est à noter qu'un dérivé de conotoxine possède déjà une autorisation de mise sur le marché. En effet le ziconotide (Prialt) est utilisé par voie intrathécale afin de traiter des douleurs sévères. Ce médicament est dérivé d'une ω -conotoxine (MVIIA), peptide ciblant les canaux calciques [6]. Cette avancée ouvre de nombreuses perspectives aux neurotoxines et plus particulièrement aux conotoxines. Nous y reviendrons dans la dernière partie.

3.8 Synthèse :

De par le nombre important d'études sur ces peptides et afin d'aboutir à de potentielles applications, il est important de déterminer des méthodes afin d'obtenir ces peptides en quantité suffisante. L'obtention des conotoxines par extraction à partir du venin est limitée par le fait qu'une très faible quantité de conotoxines peut être recueillie (faible quantité de venin et faible proportion du peptide voulu dans ce venin). De ce fait, des méthodes de synthèse ont rapidement été développées [68].

La première méthode consiste à utiliser une synthèse chimique de ces peptides par la technique de SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis) en utilisant un support en résine. Il s'agit d'une méthode de choix puisque ce sont des peptides de petite taille (inférieure à 5kDa). Elle permet ainsi d'obtenir assez aisément des conotoxines en grande quantité [68]. En revanche, l'étape de formation de la structure tridimensionnelle doit être réalisée avec précaution afin d'obtenir un repliement correct du peptide. En effet, les ponts disulfure doivent se former sur les résidus cystéines corrects, en évitant la formation de nombreux isomères (Malgré tout, il est à noter que certains isomères ont montré une activité sur les canaux sodiques comparable à celle de la toxine d'origine [69]). Cette étape est réalisée en milieu alcalin à l'aide d'agents oxydants et réducteurs (cysteamine, cystamine, glutathione...).

La deuxième méthode (utilisée généralement pour les conotoxines de plus grande taille) consiste à produire des peptides recombinants à l'aide de bactéries ou de systèmes d'expression eucaryotes. La formation des ponts disulfure se déroule généralement après extraction des corps d'inclusion ou après sécrétion du peptide par la bactérie. Chez les systèmes d'expression eucaryotes, le repliement des peptides et les ponts disulfures peuvent se créer directement dans le cytoplasme. La plus grande limitation de cette méthode est que les conotoxines possèdent de nombreuses modifications post traductionnelles, et que ces modifications ne sont pas réalisables pour tous les systèmes utilisés [68].

4) Les toxines d'anémone de mer :

Les anémones de mer sont des animaux marins appartenant à la classe des Cnidaires, et à la famille des Anthozoaires (dénomination provenant du grec "anthos" signifiant "fleur", faisant référence à leur morphologie particulière [70]). Ce sont des animaux simples, constitués d'une bouche centrale entourée de tentacules qui contiennent le venin et permettent ainsi d'immobiliser la proie et d'amener la nourriture jusqu'à la bouche [71].

4.1 Historique :

Le venin des anémones de mer a été pour la première fois isolé en 1902 par l'équipe de Richet sur une espèce d'*Anemonia viridis*, et a montré son pouvoir anaphylactique chez les chiens. Pourtant, les recherches concernant les toxines d'anémones sont relativement récentes. Narashi et collaborateurs ont démontré l'activité paralytique du venin en 1969, en mettant en évidence le ralentissement de l'inactivation des courants sodiques [72]. Les premiers peptides ciblant les canaux sodiques extraits d'anémone de mer ont été isolés dans les années 1970, et la première séquence en acides aminés d'une toxine d'anémone de mer à être décrite fut celle de ATX-II par l'équipe de Wunderer en 1976 .

Depuis, les études se sont multipliées sur le venin de ces animaux marins, pour leurs toxines, mais également pour d'autres composés d'intérêt (actinoporines, phospholipase...) [70].

4.2 Venin des anémones :

La composition du venin est encore aujourd'hui assez peu connue. Peu de peptides ont été identifiés à ce jour et très peu de structures tridimensionnelles ont été identifiées. Le venin regroupe différents composés dont des peptides, des protéines, mais également d'autres molécules diverses telles que sérotonine, histamine, des dérivés d'acides aminés libres et des ammoniums quaternaires.

Les toxines d'anémones sont localisées principalement dans les nématocystes, cellules spécialisées dans l'empoisonnement, situées généralement dans les tentacules. Le venin est administré à la victime après stimulation chimique ou mécanique de ces nématocystes. Cependant, les toxines peuvent également être retrouvées dans leur couche muqueuse qui recouvre tout l'organisme [70].

4.3 Recueil du venin et purification des toxines :

Les techniques de récupération du venin chez les anémones se sont inspirées des techniques utilisées chez les méduses, organismes marins appartenant aussi à la classe des cnidaires et possédant également des nématocystes [70].

L'extraction du venin peut être réalisée par dissection à partir de l'animal entier ou seulement à partir des tentacules. D'autres méthodes consistent à induire une électrostimulation au niveau des tentacules, ou en stimulant l'animal uniquement de manière mécanique (en serrant lentement l'anémone de mer). Ces dernières techniques sont les plus utilisées puisqu'elles permettent de récupérer de grande quantité de venin sans blesser ni tuer l'animal, et le venin recueilli semble être plus pur. La purification des différents peptides passe alors ensuite classiquement par une étape d'HPLC en phase inverse.

En ce qui concerne la synthèse de ces toxines, l'expression recombinante de ces peptides dans des systèmes tels que *Escherichia coli* est la méthode la plus employée à l'heure actuelle [72].

4.4 Structure :

Les peptides ciblant les canaux sodiques sont majoritaires dans le venin, et sont composés d'une seule chaîne d'acides aminés de taille moyenne (entre 3,5 et 6,5 kDa). Actuellement une soixante de ces toxines ont été identifiées [70].

La plupart de ces toxines sont traduites dans un premier temps en précurseurs inactifs [73]. Ces toxines contiennent une partie "signal" composés de 9 à 17 résidus (principalement polaires ou chargés négativement), se terminant dans presque tous les cas par un enchaînement Lys-Arg. Cette partie permettrait à la toxine d'être conduite jusqu'au nématocyste.

Au niveau génétique, la particularité de ces toxines est que leur séquence codante est répétée plusieurs fois dans le génome de l'anémone. Ce phénomène aurait pour intérêt pour l'animal de produire rapidement une grande quantité de venin (après piqûre, le nématocyste est complètement vidé de son venin, et en l'absence d'une glande de stockage, il est important pour l'anémone de reconstituer son venin rapidement). De plus, cela permettrait aussi d'améliorer la transmission de cet avantage génétique à la descendance [72].

4.5 Classification des toxines :

Ces peptides sont classés en quatre types, en fonction de leur homologie de séquence en acides aminés (testée notamment par réactions croisées à certains anticorps):

4.5.1 Type I et II :

Ces deux classes regroupent la majorité des toxines. Celles ci regroupent les plus longues toxines, composées de 46 à 51 résidus, et se caractérisent par une structure contenant un feuillet beta anti-parallèle et une boucle dénommée "Arg-14", très flexible. Ces peptides maintiennent leur structure tridimensionnelle à l'aide de trois ponts disulfures. Enfin, leur extrémité C-terminale est formée majoritairement de résidus basiques [70].

Malgré une organisation structurale comparable, les type I et II sont immunologiquement distinguables (il n'existe pas de réactions antigéniques croisées entre deux toxines appartenant à deux types différents) [74].

Par exemple, AETX-I (extraite de *Anemonia erythaea*) et Bg-2 (découverte dans le venin de *Bunodosoma granulifera*) sont des toxines de type I alors que Nv1-116.27.1 (retrouvée chez *Nematostella vectensis*) est une toxine de type II [70].

4.5.2 Type III :

Dans cette catégorie sont présentes des toxines possédant entre 27 et 32 acides aminés, et ont la particularité de ne pas toutes posséder la même structure (certaines toxines de type III forment trois ponts disulfures alors que d'autres en forment quatre).

Alors que les toxines de type I et II sont assez ubiquitaires et sont ainsi retrouvées chez de nombreuses espèces d'anémones, les toxines de type III ne sont en revanche présentes que chez très peu d'espèces. ATX-III (retrouvée chez l'espèce *Anemonia viridis*) et PaTX (chez *Parasicyonis actinostoloides*) sont des toxines de type III [70].

4.5.3 Type IV :

Cette dernière catégorie rassemble toutes les toxines n'ayant pu être classées dans les trois autres types. Les calitoxines I et II (grands peptides de 79 acides aminés extraits de *Calliactis parasitica*) font partie de ces toxines de type IV [70].

4.6 Structure activité :

Ces toxines agissent en liant le site récepteur 3 (comme les toxines alpha de scorpions), ce qui implique alors une inhibition de l'inactivation, par stabilisation de la conformation ouverte du canal. La durée du potentiel d'action est ainsi augmentée ce qui peut se traduire cliniquement par une paralysie contracturante pouvant aboutir au décès [75].

De par la grande diversité de ces toxines du point de vue de leur séquence (taille du peptide, structure tridimensionnelle), il est difficile de connaître précisément les résidus impliqués dans la

liaison au récepteur de manière générale [72]. Après comparaison des surfaces bioactives des toxines, il semblerait que celles ci interagissent différemment auprès du site récepteur, ce qui laisserait à penser que ce site est très hétérogène et impliquerait différents résidus selon la toxine en question [74].

4.7 Cible des toxines :

La production de toxines est indispensable pour la survie de ces animaux marins, qui ont un physique limité. Elles permettent aux anémones de se protéger des prédateurs, de conserver leur territoire face à leurs congénères, mais surtout de capturer leurs proies. Ainsi, les toxines contenues dans le venin ciblent principalement les crustacés [71].

Cela pourrait paraître surprenant, mais de nombreuses toxines sont actives sur les canaux d'insectes. A l'exception de certaines larves d'insectes retrouvées dans la mer, les anémones de mer sont rarement en contact avec les insectes. Ce phénomène est en fait expliqué par la similarité structurelle des canaux sodiques d'insectes et de crustacés (la plupart des toxines ayant une activité sur les crustacés ont alors une activité sur les insectes) [70].

De plus, des toxines visant les vertébrés, moins fréquentes, sont également présentes dans le venin. Elles appartiennent majoritairement au type I (ATX-II produite par *Anemonia viridis* ou encore ApA extraite d' *Anthopleura xanthogrammica*), mais pas exclusivement (par exemple, la toxine de type II Rp4 extraite de *Radianthus paumotensis* est toxique envers les mammifères) . Ces toxines peuvent par ailleurs présenter de manière plus ou moins prononcée une sélectivité vis à vis des isoformes cardiaques (Nav1.5) ou neuronaux, suivant les toxines [72].

4.8 Toxicité :

La toxicité de ces peptides est très variable en fonction de la toxine en question. Certaines ne sont pas toxiques chez l'homme et ne sont actives que sur les canaux de crustacés et d'insectes. Pour les toxines actives chez les mammifères, la DL50 sur des souris par voie intrapéritonéale est de l'ordre du µg/kg (en guise d'exemple 2,2 µg/kg pour AETX-I et 0,4 µg/kg pour Bg-2) [70].

4.9 Clinique de l'envenimation :

Lors des envenimations humaines par les anémones de mer, la gravité de la clinique est principalement reliée aux effets neurotoxiques et cardiotoxiques du venin lié aux toxines sodiques (arythmies conduisant parfois à l'arrêt cardiaque). De plus, des symptômes plus mineurs sont observés, notamment cutanés, tels que dermatite, erythème, et douleur localisés au niveau de la piqûre [70].

Les anémones les plus souvent responsables des cas sévères sont celles qui produisent les plus grandes quantités de toxines actives envers les vertébrés. Ainsi, on retrouve parmi les espèces les plus dangereuses *Anemonia viridis* qui produit notamment ATX-II [74].

B) Les Toxines extraites des plantes :

1) La veratridine :

1.1 Origine :

Différentes plantes peuvent synthétiser la vératridine. Elles appartiennent toutes à la famille des Liliacées: plusieurs espèces appartenant au genre *Veratrum*, ainsi que plus rarement certaines espèces d'autres genres telle que *Schoenocaulon officinale* (retrouvée en Amérique du Nord et plus communément appelée "sabadilla seed") [76].

Veratrum album, aussi connu sous le nom d' héliébore blanc est une plante alpine (retrouvée entre 800 et 2700 mètres d'altitude), d'une centaine de centimètres de hauteur. Elle est parfois confondue avec la gentiane jaune, *Gentiana lutea*, plante recherchée pour les propriétés digestives de ses racines. *Veratrum album* est une plante très toxique de par la présence de ses alcaloïdes, notamment la vératridine. Celle ci est retrouvée dans toute la plante, mais en plus grande quantité dans les racines, les feuilles et le rhizome où l'on retrouve environ 1,6% d'alcaloïdes [76].

1.2 Structure :

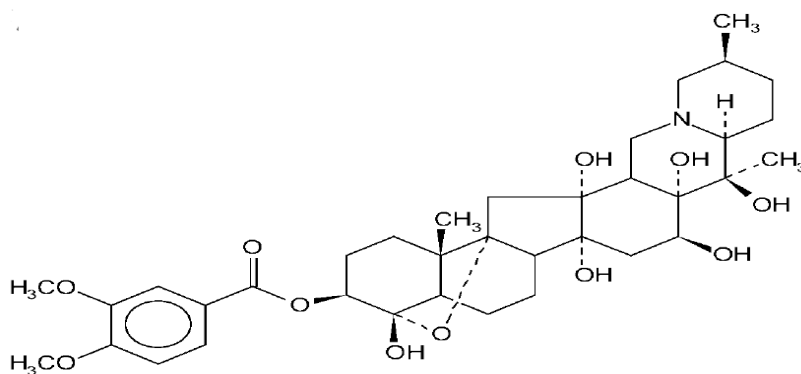


Figure 10 : Structure de la veratridine [76]

La veratridine est un alcaloïde naturel, comprenant un atome d'azote tertiaire inclus dans un cycle, de formule brute $C_{36}H_{51}NO_{11}$. C'est une molécule très liposoluble. Sa masse moléculaire est de 673,78 [77].

1.3 Mécanisme d'action:

La veratridine se lie au site 2 des canaux sodiques voltage dépendants. En revanche, contrairement aux batrachotoxines se liant sur le même site, il s'agit d'un agoniste dit partiel. La veratridine impose aux canaux sodiques voltage dépendants une ouverture prolongée après la phase de dépolarisation membranaire en inhibant le mécanisme d'inactivation du canal [78]. Selon certaines études réalisées sur des cellules de neuroblastomes, le canal reste ouvert 1,2 secondes de plus (ce qui reste faible comparé aux batrachotoxines dont la liaison est dite presque irréversible, d'où le terme "d'agoniste partiel" pour qualifier la vératridine), cependant, la conductance des ions sodium est diminuée de moitié [79]. La vératridine aurait également une action sur les canaux calciques, en provoquant une augmentation de la perméabilité aux ions calcium [80]. Toutes ces perturbations homéostasiques peuvent entraîner l'apoptose des cellules neuronales à forte concentration.

De par la nature très lipophile de la veratridine, la surface hydrophobe présentée par le site d'interaction semble également importante pour la liaison de la toxine, grâce à des interactions hydrophobes [77]. Au niveau du site d'interaction, le résidu Asn 434 semble jouer un rôle majeur dans la liaison avec la toxine [78].

De plus, l'étude de la veracevine, dérivé alcaloïde proche de la vératridine a permis d'en savoir plus sur les relations structure-activité. La veracevine est une molécule qui est extraite de *Sabadilla lily seed* (qui synthétise aussi la veratridine). La seule différence structurale entre les deux alcaloïdes est que la veracevine ne possède pas de groupement "3 acyl". En revanche, malgré cette proximité structurale elle ne possède aucun effet toxique. Ce groupement est donc particulièrement essentiel pour l'activité de la veratridine [77].

1.4 Obtention :

Compte tenu de sa structure complexe à synthétiser par voie chimique, la veratridine est obtenue par extraction à partir de *Veratrum album*. La première étape d'extraction consiste à faire macérer la plante dans de l'alcool (la vératridine étant très soluble dans l'alcool). Les étapes suivantes de purification utilisent les protocoles habituels pour purifier les alcaloïdes dans des extraits (successions d'extractions dans différents solvants) [81].

Une méthode intermédiaire consiste à obtenir la vératridine par héli-synthèse à partir des autres alcaloïdes de structure proche présents dans la plante.

1.5 Analyse :

La détection de la vératridine peut se faire selon différentes techniques. Les méthodes historiques avant les années 1990 passaient par l'utilisation de chromatographie sur couche mince. Les plus employées à l'heure actuelle utilisent une étape d'HPLC, suivie soit d'une spectrométrie de masse soit d'une détection UV [76] [82].

La principale difficulté des méthodes d'analyse est la réaction croisée avec d'autres alcaloïdes, possédant un squelette structural proche de la vératridine, et ne possédant pas la même toxicité (moins toxique voir non toxique chez l'homme).

1.6 Toxicité:

Chez la souris, la dose létale 50 et de 1,35mg/kg par voie intrapéritonéale, et de 4,9mg/kg en sous cutané [83].

1.7 Clinique de l'intoxication :

Après intoxication par *Veratrum album*, les effets toxiques sont ressentis par la victime entre 30 minutes et quatre heures après ingestion. Apparaissent alors un ensemble de symptômes digestifs (nausées, vomissements, douleurs abdominales) suivis par des symptômes cardiovasculaires (bradycardie, hypotension) qui peuvent conduire dans certain cas à des troubles du rythme cardiaque et au décès [76].

Dans les modèles animaux de souris, une injection de vératridine entraîne à faible dose (100 à 400 µg/kg par voie intrapéritonéale): une phase de latence d'environ 10 à 15 minutes suivie d'une salivation excessive, puis les souris ont tendance à développer des "mouvements du chien mouillé".

Les coupes histologiques de ces animaux ont permis de révéler l'apoptose de cellules nerveuses au niveau de l'hippocampe. Ainsi la veratridine mimerait chez ces animaux une épilepsie du lobe temporal chez l'homme (des études sont en cours pour démontrer l'intérêt de la vératridine comme outil expérimental pour l'évaluation des antiépileptiques) [84].

A plus forte dose, la veratridine entraîne une paralysie flasque, suivie d'une dépression respiratoire qui provoque le décès à forte dose [83].

1.8 Prise en charge :

Dans la plupart des cas, les patients guérissent complètement de leur intoxication sans séquelle en quelques jours.

En cas de nécessité, le traitement passera par l'administration de charbon actif si la prise en charge est précoce (moins de deux heures). Puis un traitement symptomatique sera mis en place en fonction de la clinique (antiémétique, atropine, solution hydroélectrolytique en voie intraveineuse...) [76].

2) L'aconitine :

2.1 Origine:

L'aconitine est un alcaloïde diterpénique d'origine végétale produit par *Aconitum napellus*, ou aconit napel, de la famille des renonculacées. L'aconit napel est une plante vivace herbacée d'une centaine de centimètres qui est principalement reconnaissable par ses fleurs violettes particulières dites "en casque" (d'où sa dénomination plus commune de casque bleu ou casque de Jupiter) [85]. Il s'agit d'une plante assez répandue dans le monde, retrouvée en Europe, au Nord de l'Asie et en Amérique du Nord [86]. L'aconitine est présente principalement dans les racines et les graines, mais elle est aussi retrouvée dans les feuilles et les fleurs [87].

Il faut noter que l'aconitine n'est pas le seul alcaloïde présent dans la plante : (mesaconitine, lycaconitine, jesaconitine...[82]), mais c'est bien l'aconitine qui possède la majeure partie de la toxicité de la plante.

L'intoxication survient lors d'erreurs d'identification de la plante, ou plus fréquemment lors d'utilisation d'aconit à trop forte dose dans les médecines traditionnelles (les cas sont ainsi plus fréquents en Chine et au Japon où l'utilisation thérapeutique de cette plante est importante) [88].

2.2 Structure et Mécanisme d'action :

L'aconitine est un diester acétylé benzoylé de l'aconine (amino-alcool hexacyclique).

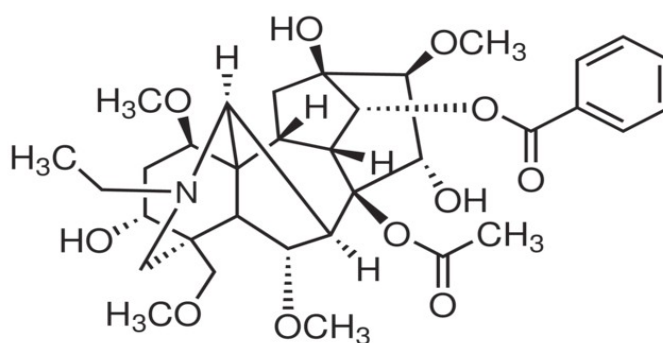


Figure 11 : Structure de l'aconitine [89]

L'aconitine agit comme la vératridine sur le site 2 des canaux sodiques voltage dépendants. Elle permet alors au canal de s'ouvrir plus facilement en modifiant le voltage nécessaire à l'activation (ce qui provoque des accès répétés de potentiels d'action) et elle inhibe l'inactivation rapide du canal. De plus, l'amplitude du courant sodique est diminuée et la sélectivité aux ions est réduite [90].

Tout comme la veratridine, l'aconitine est considérée comme un activateur partiel, en comparaison avec les batrachotoxines. Les résidus impliqués sur le site d'interaction du canal, sont vraisemblablement les mêmes, ou proches, de ceux participant à la liaison de la veratridine.

2.3 Obtention :

Du fait de sa structure, la synthèse chimique de l'aconitine est très complexe à réaliser, et n'est pas rentable en terme de rendement. L'aconitine est donc obtenue par purification à partir de l'aconit napel [89].

La plante (généralement les racines) est mise à macérer dans de l'alcool. Les procédés de purification déployés ensuite sont ceux spécifiques des alcaloïdes, en utilisant successivement différents solvants (eau, alcool, éther, ammoniac...) à certaines température précises.

2.4 Analyse :

La détection de l'aconitine passe typiquement par une méthode utilisant une chromatographie liquide en phase inverse suivi d'une analyse au spectromètre de masse [86]. La détection UV peut également être utilisée puisqu'elle possède un spectre UV très caractéristique. Différents protocoles ont été établis afin d'augmenter la qualité de la technique, sa spécificité, et le temps nécessaire à l'analyse [82].

2.5 Toxicité :

Chez la souris, la dose létale 50 est estimée à 1,8mg/kg par voie orale [88]. Chez l'homme, l'aconitine est létale pour une dose ingérée entre 3 à 6 mg (en sachant que 1 gramme d'aconit frais renferme environ 2mg d'aconitine [85]). Cependant dès 0,2 mg ingéré, des cas humains sévères ont été rapportés [91].

La demie vie de l'alcaloïde dans l'organisme est d'une dizaine d'heures. Ainsi, la quasi totalité des toxines ingérées est éliminée en moins de trois jours [88].

2.6 Clinique de l'intoxication :

Les symptômes après intoxication par ingestion d'aconit débutent rapidement (moins de deux heures après) par des paresthésies au niveau de la bouche, puis apparaissent des troubles digestifs à titre de vomissements et de diarrhées, associés à des vertiges et une asthénie.

Lors des cas plus sévères avec ingestion d'une plus forte dose, la toxine provoque des troubles cardiaques tels que arythmie, tachycardie jusqu'à une fibrillation ventriculaire dans les cas les plus graves, pouvant conduire au décès de la victime [87]. Les troubles du rythme cardiaque persistent

généralement moins de 24h [85].

2.7 Prise en charge :

En cas de symptomatologie importante, l'hospitalisation est nécessaire. Un lavage gastrique sera réalisé en cas de prise en charge précoce. Une surveillance sera mise en place, notamment électrocardiographique, afin d'évaluer les dysfonctions cardiaques [87]. Des antiarythmiques peuvent être administrés, mais leur efficacité est limitée [91].

3) Les grayanotoxines :

3.1 Origine :

Les grayanotoxines sont produites par certaines espèces de plantes de la famille des Ericacées. Les genres impliqués sont principalement Rhododendron (notamment *R.ponticum* à fleurs pourpres et *R.Luteum* à fleurs jaunes), Pieris, Agarista et Kalmia [92].

La plupart des cas d'intoxications ont lieu dans les régions à l'est de la mer Noire en Turquie, mais des cas sont également décrits au Népal, en Corée du nord, au Japon, en Nouvelle Zélande, ou en Amérique du Nord [93].

3.2 Intoxication chez l'homme :

L'homme se contamine en ingérant des parties de plantes (fleurs, feuilles...) ou plus généralement des produits dérivés de ces plantes (miel, thé, décoction).

Le plus grand nombre de cas concerne le miel de Rhododendron (dénommé alors "mad honey") [92]. Même si la plupart des intoxications sont involontaires, certains consomment du miel contaminé intentionnellement. En effet celui ci est considéré comme ayant des propriétés thérapeutiques dans certaines médecines traditionnelles (vertues antihypertensives, traitement des problèmes gastriques et intestinaux, et amélioration des performances sexuelles). Ces propriétés n'ont pas été réellement prouvées de manière scientifique, et la consommation de ce miel est ainsi fortement déconseillée [94].

Le premier cas décrit d'intoxication au miel vraisemblablement contaminé par des grayanotoxines remonte en -400 avant JC par le grec Xenophon.

3.3 Structure :

Les grayanotoxines forment une famille de diterpènes cycliques polyhydroxylés. Elles sont également connues sous les noms de andromedotoxines, acetylandromedol ou encore rhodotoxines. Plus de 25 grayanotoxines ont été caractérisées à ce jour [92]. Parmi elles, les grayanotoxines I, II et III sont considérées comme participant le plus à la toxicité (même si la grayanotoxine II semble moins toxique que les deux autres) [93].

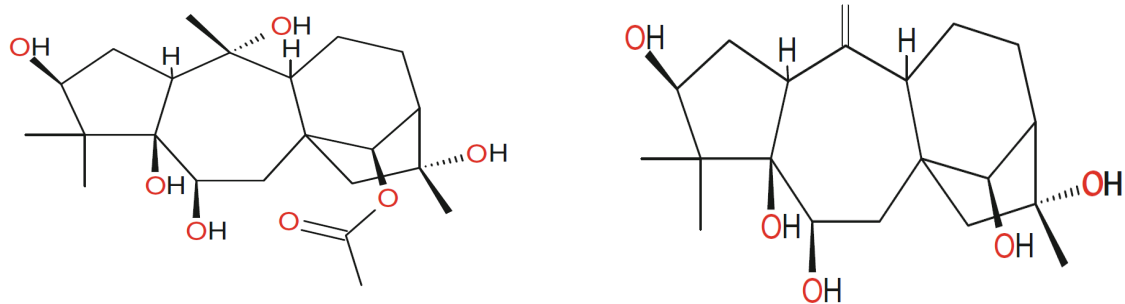


Figure 12 : Structure de la Grayanotoxine I **Figure 13 : Structure de la Grayanotoxine II**

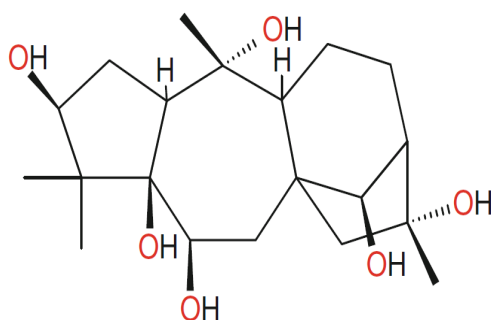


Figure 14 : Structure de la Grayanotoxine III [92]

3.4 Mécanisme d'action :

Les grayanotoxines se lient sur le site 2 des canaux sodiques voltage dépendants et ont la même action que les autres neurotoxines ciblant ce site d'interaction. Elles se lient au canal uniquement lorsque celui ci est en position ouvert. Elles agissent en inhibant la phase d'inactivation du canal et en favorisant l'ouverture du canal à des valeurs de potentiels plus faibles [92] [95].

3.5 Toxicité :

La toxicité des différentes molécules appartenant à la famille des grayanotoxines est assez mal quantifiée. Pour ce qui est du miel contaminé, Yilmaz et collaborateurs estiment qu'entre 5 et 30g de miel sont nécessaires afin de provoquer des symptômes chez l'homme, en fonction de la concentration en toxines et des susceptibilités individuelles de la victime [94].

3.6 Clinique de l'intoxication :

Les symptômes apparaissent en général après 20 minutes à 3 heures après ingestion (mais le délai d'apparition est inversement proportionnel à la quantité de toxine ingérée) et persistent généralement moins de 24 heures [92] (les grayanotoxines sont rapidement métabolisées et

excrétées principalement dans l'urine [93]).

Les premiers signes à apparaître sont généralement vertiges, fatigue, transpiration excessive, nausées et vomissements. Des symptômes cardiovasculaires peuvent aussi apparaître, à titre de diminution de la pression artérielle et bradycardie, ainsi que des troubles du rythme cardiaque (syndrome de Wolff Parkinson White voir blocage auriculoventriculaire) liés aux perturbations des flux sodiques du noeud sinoatrial, essentiel dans la génération du rythme cardiaque [96]. L'interprétation de l'électrocardiogramme est parfois compliqué et le diagnostic différentiel avec un infarctus du myocarde est parfois difficile à réaliser. Dans les cas les plus graves, une dépression respiratoire peut survenir (liée vraisemblablement à l'action des toxines sur le système nerveux central) et mettre en jeu le pronostic vital [97].

Cependant, l'intoxication est généralement bénigne et les cas mortels sont très rares (aucun cas n'a été décrit dans la littérature) [98]. L'hospitalisation voir même la prise en charge médicale ne sont pas toujours nécessaires : en général, la population locale connaît cette intoxication et ne consulte pas si les symptômes restent bénins [96].

Remarque: Contrairement aux cas chez l'homme, les cas d'intoxications chez les animaux sont plus souvent mortels, notamment sur le bétail. En effet, de grandes quantités de Rhododendron peuvent être ingérées par le bétail et entraîner le décès des animaux [92].

3.7 Prise en charge :

La prise en charge passera par des traitements symptomatiques. L'atropine (à la dose de 0,5 à 1mg) est le plus souvent utilisée et a une très bonne efficacité [96]. Si nécessaire, une perfusion de solution saline intraveineuse sera mise en place. Dans tous les cas, une surveillance électrocardiographique en continue devra être effectuée [99].

3.8 Détection :

En cas de suspicion d'intoxication, la détection de grayanotoxines peut se faire dans l'urine de la victime ou dans ce qui a été consommé (miel, pollen des fleurs...) [95].

Toutefois ces tests sont rarement effectués, l'historique de consommation de la victime et la clinique évocatrice permettant généralement d'avoir un diagnostic rapidement [93].

3.9 Prévention :

Il est recommandé de ne pas consommer de "mad honey" même pour ses potentielles vertus thérapeutiques. Mais actuellement, peu d'informations valables sur la prévention de l'intoxication aux grayanotoxines sont disponibles. Il n'existe aucune détection rapide, fiable et simple des grayanotoxines dans le miel, ni de méthodes afin de diminuer leur concentration dans le miel et autres produits dérivés [96].

Cependant certaines populations locales arrivent à le distinguer des autres miels de par la sensation de chaleur, de piquant, qu'il produit dans la gorge (il est ainsi parfois dénommé "bitter honey").

De plus, le miel concerné n'est retrouvé que dans une petite région géographique: les abeilles ne parcourent en effet que 5km² afin de produire leur miel et les plantes incriminées ne poussent que dans certaines régions forestières à une altitude bien spécifique. Ainsi les habitants de ces régions connaissent le risque d'intoxication en fonction de la localisation du miel récolté [98].

Enfin, la population locale évite de consommer ce miel au printemps, puisqu'il est considéré comme étant plus toxique à cette période de l'année (les concentrations en grayanotoxines détectées sont plus importantes) [94].

C) Les toxines de venins d'animaux

terrestres :

1) Les batrachotoxines :

1.1 Origine :

Les batrachotoxines (ou BTX) ont été pour la première fois identifiées dans le milieu des années 60 dans la peau de grenouilles tropicales toxiques du genre *Phylllobates* (de la famille des *Dendrobatidae*) [100]. Le terme "batrachotoxine" vient en effet du grec "batrachos" qui signifie "grenouille". Les espèces *P.bicolor*, *P.terribilis* et *Paurotaenia* sont les plus fréquemment rencontrées [101]. Ces amphibiens ont la particularité d'être aposématiques, c'est à dire d'avoir un niveau de coloration liée à leur toxicité (les individus les plus colorés sont les plus toxiques, afin d'avertir les prédateurs).

Les agents toxiques des amphibiens se situent au niveau des glandes de la peau où l'on retrouve des amines, des peptides, des protéines, des stéroïdes et également des alcaloïdes comme les BTX. Ces composés sont alors sécrétés lors de l'attaque d'un prédateur. Les BTX sont les toxines de grenouilles les plus puissantes. Ces toxines étaient déjà utilisées par les Indiens de Colombie afin de recouvrir de poisons leurs flèches pour la chasse [102].

En revanche, les BTX ne sont pas synthétisées par les amphibiens. En effet, élevées en captivité avec une nourriture contrôlée sans toxines, les grenouilles testées ne possèdent plus de BTX. Il a été ainsi suggéré que les BTX provenaient vraisemblablement d'une source alimentaire [100].

Cependant, les batrachotoxines sont également retrouvées chez certains oiseaux de Nouvelle Guinée des genres *Pitohui* et *Ifrita*, concentrées au niveau de la peau et des plumes. Les toxines serviraient de protection envers certains parasites et prédateurs. Comme pour les amphibiens, ces oiseaux ne produiraient pas les toxines mais les tireraient d'une source alimentaire [103].

Il a été retrouvé dans l'estomac de ces oiseaux des scarabées, du genre *Choresine* (famille des *Melyridae*), présentant une forte concentration en BTX. Ces scarabées pourraient être la source de BTX pour ces oiseaux, mais pourrait également l'être pour les grenouilles, à moins que ce ne soit d'autres arthropodes (d'autres alcaloïdes voisins des BTX ont été identifiés chez plusieurs fourmis, mille-pattes, et scarabées). En revanche, les scarabées ne semblent pas synthétiser de novo

les BTX. Deux hypothèses sont donc envisageables: une origine alimentaire (via les phytostéroïdes des plantes) ou une origine symbiotique [101].

1.2 Structure :

Les batrachotoxines sont des alcaloïdes stéroïdiques possédant une amine tertiaire. Leur structures tridimensionnelles ont pour particularité de posséder trois atomes d'oxygène disposés en triangle, ce qui leur permet ainsi de chélater un cation. Ces molécules possèdent une certaine hydrophobicité [104].

Parmi cette famille, trois composés majeurs sont le plus souvent retrouvés dans la peau des amphibiens: la batrachotoxine, l'homobatrachotoxine et la batrachotoxinine A [103]. Cette dernière est beaucoup moins toxique et est considérée comme étant un précurseur de la batrachotoxine (le noyau pyrrole non présent chez cette dernière possède donc vraisemblablement une grande importance pour la toxicité de la molécule [105]).

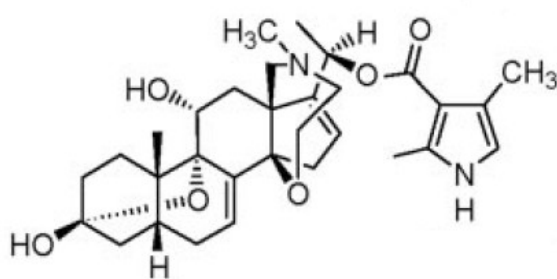


Figure 15 : Structure de la batrachotoxine [101]

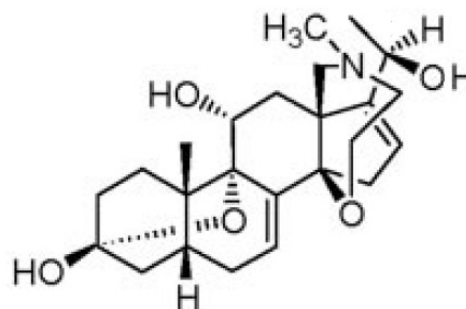


Figure 16 : Structure de l'homobatrachotoxine [101]

1.3 Mécanisme d'action :

Ces neurotoxines agissent en ciblant le site d'interaction 2 des canaux sodiques voltage dépendants. Contrairement à la veratridine ou l'aconitine ciblant également le site 2, les BTX sont considérées comme des activateurs agonistes entiers des canaux sodiques puisque ces toxines induisent des modifications sur de nombreux aspects de ces canaux, les maintenant alors dans une position ouverte pendant plusieurs heures [104] [105].

En effet, de par cette liaison, les BTX inhibent les mécanismes d'inactivation rapide et lente, diminuent le voltage nécessaire à l'activation du canal, diminuent la conductance du canal (d'environ 60%) et altèrent la sélectivité sodique du canal (celui ci devient plus perméable à d'autres molécules chargées telles que NH_4^+). Il est également à noter que la liaison de la BTX est considérée comme étant irréversible (les expériences in vitro à température ambiante concluent à

une dissociation minime des toxines) [106].

Les BTX se lient au niveau de la cavité interne du pore, en interagissant avec des résidus situés sur les segments S6 des quatre domaines. Malgré une taille importante, les ions sodium arriveraient tout de même à passer à travers un faible passage hydrophile: d'une part le côté hydrophile des BTX (le côté hydrophobe interagissant avec les résidus du canal) et d'autre part certains résidus du canal tel que N927 appartenant au segment D2S6 [104]. Ce faible passage serait la cause de la diminution de la conductance. De plus, le site de liaison est situé proche d'un résidu lysine appartenant à l'anneau DEKA de sélectivité du canal, altérant ainsi sa fonction [105].

Enfin, il a été remarqué que la fixation des BTX au site 2 est dépendante de la conformation du canal. Les toxines lient en effet le site d'interaction préférentiellement quand le canal est en position ouverte, alors que la fixation est très fortement limitée lorsqu'il est en position fermée ou inactivée [107].

1.4 Toxicité :

La dangerosité des espèces d'amphibiens varient selon les individus. Par exemple, en Colombie *P.terribilis* contient 1mg de BTX alors que les espèces *P.bicolor* ou *P.aurotaenia* en possèdent environ dix fois moins. De par l'origine alimentaire de la toxine, la toxicité varie également beaucoup selon les régions géographiques. Ainsi, les mêmes espèces capturées au Costa Rica ne contiennent que des traces de BTX [102].

1.5 Clinique de l'intoxication :

Les intoxications humaines étant extrêmement rares, peu d'informations sont disponibles sur l'effet clinique des BTX. Selon certaines populations locales, un contact avec les scarabées ou les oiseaux contaminés par les BTX induiraient une sensation de picotement et un engourdissement des lèvres et du visage [101].

En tenant un oiseau contaminé dans ses mains, l'inhalation d'une faible quantité de toxine peut provoquer des éternuements et une irritation des voies aériennes supérieures. En respirant profondément proche de leur plumage, certaines personnes décrivent une toux et des symptômes proches d'une réaction allergique [103].

Lors de l'administration chez l'animal, la batrachotoxine provoque une paralysie, des convulsions et le décès de l'animal [107].

2) Les toxines de scorpions :

2.1 Les scorpions :

Les scorpions sont des arthropodes invertébrés possédant un exosquelette articulé. Leur corps est composé de trois parties: le céphalothorax (ou prosoma), le pré abdomen (ou mesoma) et le post abdomen (métagoma). L'appareil venimeux est composé du telson, sorte d'ampoule à venin située dans le dernier article du post abdomen. La contraction de certains muscles striés entraîne l'éjection du venin dans l'aiguillon, qui est creusé d'un canal à venin [108].

Les scorpions sont divisés en deux sous ordres, les Buthidae et les Chactidae [109]. Sur 1500 espèces, seules une trentaine sont dangereuses pour l'homme, et elles appartiennent toutes à la classe des Buthidae [110].

Selon leur localisation géographique, deux groupes de scorpions ont été séparés: les scorpions de l'Ancien Monde ("Old World scorpions") situés principalement en Afrique et en Asie du Sud qui regroupent différents genres tels que *Androctonus*, *Buthus* ou *Leiurus*; et les scorpions du Nouveau Monde ("New World scorpions") sur le continent Américain, avec les deux genres principaux *Centruroides* et *Tityus* [111].

Les scorpions sont responsables chaque année d'environ 1,5 millions de cas d'envenimations dans le monde, aboutissant à environ 2600 décès, soit un taux de mortalité plutôt bas proche de 0,17% (mais qui atteint environ 15% si la victime est un enfant) [110]. Dans le Sud de la France, on estime l'incident d'envenimations à 5 pour 100 000 habitants, et les symptômes engendrés sont peu sévères [111].

2.2 Le venin de scorpion :

Il s'agit d'un liquide visqueux, limpide, et thermorésistant (seul un chauffage à plus de 100°C pendant 90min permet de supprimer sa toxicité). Seule une faible quantité de venin est inoculée à la victime (maximum 500 µg en poids sec) [109].

En plus des neurotoxines actives sur les canaux sodiques, on retrouve également dans le venin de scorpion de nombreux composés tels que amines (sérotonine et histamine principalement), protéines, nucléotides, lipides, sels, enzymes (hyaluronidase, phospholipase...), mais aussi d'autres neurotoxines ne ciblant pas les canaux sodiques. La proportion de neurotoxines présentes dans le venin reste donc très faible, n'excédant pas 5% de son poids sec [111].

Ainsi, les différentes substances présentes dans le venin forment un mélange complexe, et interagissent les unes les autres afin d'agir en synergie. Elles permettent à l'animal d'immobiliser sa

proie ou de se défendre face à un prédateur [14].

La composition qualitative et quantitative du venin varie énormément entre chaque individu. Elle dépend entre autres de l'espèce en cause, de la taille de l'animal, de son âge, des conditions climatiques et de sa nutrition.

2.3 Structure et classification des toxines :

La découverte de ces toxines remonte aux années 1960, purifiées à partir d'*Androctonus australis* et *Buthus occidentanus* [111]. Selon les prédictions, plus de 100 000 polypeptides distincts seraient produits dans le venin des différentes espèces de scorpions. Parmi eux, seuls 1% ont été caractérisés à ce jour [14].

Les toxines de scorpions actives sur les canaux sodiques sont de petites protéines basiques monocaténaïres possédant entre 60 et 76 résidus d'acides aminés [112]. Elles sont qualifiées de "toxines longues" afin de les différencier des autres toxines présentes dans le venin de scorpion, les "toxines courtes" possédant environ 30 à 40 résidus et ciblant les canaux potassiques, mais aussi calciques et chloriques.

Selon leur mécanisme d'action pharmacologique, il a été différencié deux catégories de toxines de scorpion agissant sur les canaux sodiques.

2.3.1 Les toxines α de scorpion :

Ces toxines lient le site 3 des canaux sodiques voltage dépendants. Elles ralentissent l'inactivation du canal, entraînant ainsi une augmentation de la durée du potentiel d'action [113]. Elles sont également appelées toxines "potentiel dépendant" puisque leur fixation au site d'interaction est proportionnelle à l'intensité du potentiel de membrane. Elles agissent uniquement lorsque le canal est en position ouvert [110].

Les scorpions produisant les toxines α sont presque tous des scorpions de l'Ancien Monde [109].

Les toxines α peuvent se classer en trois grandes classes en fonction de leur victime cible, mammifères ou insectes [113] :

- Les toxines dites classiques ayant une activité sur les mammifères, et donc chez l'homme. Dans cette classe sont présentes des toxines telles que Lqh2 (retrouvée chez *Leiurus quinquestriatus hebraeus*) ou Aah2 (chez *Androctonus australis hector*).
- Les toxines α activent uniquement sur les insectes, avec par exemple la toxine Lqh α IT.
- Les toxines possédant une activité toxique chez les mammifères et chez les insectes.

2.3.2 Les toxines β de scorpion :

Ces toxines ciblent le site 4 des canaux sodiques. Elles diminuent alors le potentiel nécessaire à l'activation de ces canaux. Au contraire des toxines α , elles sont dites "potentiel indépendant" puisque leur action est indépendante du potentiel de membrane [110].

Ces toxines ont été exclusivement identifiées chez les scorpions du Nouveau Monde [109].

Ces toxines β de scorpions peuvent également être classées en différentes catégories [114] [112] :

- Les toxines β anti-mammifères, telle que C_{ss}4 extraite de *Centruroides suffusus suffusus*.
- Les toxines β affectant les mammifères et les insectes, avec par exemple T_{s1} de *Tityus serrulatus*.
- Les toxines β actives sur les insectes dites "excitatrices" ou "contracturantes", c'est à dire qu'elles vont engendrer chez l'insecte une paralysie due à une contraction musculaire généralisée (la neurotoxine provoque un accès spontané répété de potentiels d'action). La toxine B_{jxtrIT} provenant de *Buthotus judaicus* fait partie de ces toxines.
- Les toxines β actives chez les insectes dites "dépressives" ou "myorelaxantes" qui au contraire provoquent une paralysie flasque chez les insectes (la neurotoxine entraîne une dépolarisation puis un blocage des potentiels d'action). Par exemple, L_{qh IT2} de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* fait parti de cette catégorie.

Même si les toxines α et β lient des sites différents sur les canaux sodiques, elles peuvent agir en synergie. Il a été démontré que la liaison d'une toxine β sur le site 4 induisait un changement conformationnel du canal qui permettait d'augmenter la liaison des toxines α sur le site 3 [14].

Remarque: De par leurs capacités à cibler spécifiquement les canaux sodiques de vertébrés ou d'invertébrés, les toxines de scorpion ont été des outils très utilisés afin d'étudier les différences structurales entre les canaux sodiques des mammifères et des insectes.

2.4 Structure tridimensionnelle :

La structure tridimensionnelle des toxines α de scorpion peut se résumer selon le modèle $\beta\alpha\beta\beta$, c'est à dire une hélice α entourée par trois feuillet β . Cette structure est stabilisée par quatre ponts disulfures. Malgré une grande diversité structurale dans cette famille, les positions de cystéines impliquées dans les ponts disulfures restent très conservées à travers les différentes

espèces [115].

Cette structure peut se décomposer en deux grands domaines essentiels pour leur activité: Le "*core domain*", très conservé, formé de 4 à 5 résidus (les résidus 17, 18, 38 et 44 en prenant comme modèle la toxine Lqh IT). D'autre part, le "*NC domain*" formé par 5 résidus côté N terminal (résidus 8 à 12) et un segment du côté C terminal (résidus 56 à 64).

L'analyse cristallographique a permis de démontrer que le domaine NC se situait à la surface de ces protéines sur toutes les toxines α actives sur les insectes. Alors que le domaine NC forme une protusion sur les toxines actives chez les insectes, il est au contraire très plat chez les toxines actives chez les mammifères.

Ainsi, alors que le core domain serait important pour l'activité, le domaine NC posséderait la spécificité de la cible animale. Il a été proposé que le core domain agirait sur des résidus d'interaction communs aux mammifères et aux insectes, alors que le NC domaine se lierait de manière spécifique soit à des résidus de l'un, soit à ceux de l'autre [113].

2.5 Extraction :

Trois techniques sont utilisées afin de récupérer le venin du scorpion. La première, la moins utilisée, consiste à récupérer manuellement le venin, en tapotant le dos du scorpion, qui libère alors une goutte de venin. Une autre technique consiste à récupérer le telson de l'animal et à le broyer avant d'en extraire le venin. Cependant, la méthode la plus employée consiste à administrer une stimulation électrique au scorpion.

Après centrifugation, l'analyse des neurotoxines peut alors passer selon divers procédés. La première consiste à passer le venin obtenu en chromatographie sur colonne, puis utiliser une résine échangeuse d'ion. Actuellement, la méthode la plus courante consiste à coupler l'HPLC à une spectrométrie de masse [14].

Cependant, de par la faible quantité de venin produit, et les difficultés de collecte du venin, de nombreux travaux ont été nécessaires afin de synthétiser ces toxines.

2.6 Synthèse :

Plusieurs synthèses chimiques totales de petites protéines de scorpions (telles que celles ciblant les canaux potassiques) ont été décrites, mais les synthèses chimiques de toxines à longues chaînes restent difficiles à réaliser (la première synthèse réussie a été réalisée en 2004 par M'Barek et collaborateurs).

Une deuxième voie d'obtention de ces toxines longues existe, en passant par l'expression recombinante à l'aide notamment de culture de levures [14].

2.7 Toxicité :

La sévérité de l'intoxication dépend de nombreux facteurs dont le premier est évidemment la quantité de venin injectée qui peut varier énormément selon les cas (la piqûre peut même être blanche, c'est à dire sans injection de venin) [110].

Après injection, la distribution dans les compartiments extra vasculaires est très rapide, entraînant une apparition très précoce des symptômes. Chez le lapin, une étude a révélé que quinze minutes après injection, 70% du venin était retrouvé dans la circulation sanguine [111].

2.8 Clinique de l'envenimation :

Lors d'une envenimation scorpionique, la sévérité clinique est décrite en trois grades.

Le grade I correspond à une douleur au point d'injection, intense, immédiate et perdurant généralement entre 10 et 15h [111]. Ce symptôme est présent dans plus de 95 % des cas d'envenimation.

Dans le grade II, apparaissent des symptômes systémiques de gravité moyenne. La clinique est dominée par des symptômes cardio-respiratoires à titre de tachycardie, arythmie, dyspnée. Ces signes sont accompagnés d'un syndrome adrénérgique lié à la libération de catécholamines (hyperthermie, hyperglycémie, hypersécrétions) et de troubles neuromusculaires (agitation, dystonie) [14].

Enfin le grade III correspond à des cas d'envenimations sévères (oedème pulmonaire, arrêt cardiaque, convulsion).

La part de responsabilité de chacune des différentes toxines et substances présentes dans le venin est difficile à évaluer, de par leur complexité d'action et leur synergie. Cependant, les toxines α seraient plutôt responsables de l'arythmie cardiaque, alors que les toxines β seraient plutôt la cause des troubles neuromusculaires [14]. Les toxines de scorpions seraient également à l'origine de la douleur (notamment par leur action sur les sous types Nav1.7). Cependant il semblerait qu'elles agissent avec un temps de latence, la douleur immédiate doit donc être attribuée à d'autres composants du venin [115].

Les tests sur souris ont permis d'attribuer 90% de la mortalité observée aux toxines ciblant les canaux sodiques [116].

2.9 Prise en charge :

La prise en charge devra se faire au plus tôt, surtout s'il s'agit d'un enfant. Un traitement symptomatique sera mis en place (analgésiques, prazosine, benzodiazépine). De plus, en cas d'envenimation sévère (minimum grade II), il peut être utilisé le plus précocement possible un sérum antivenimeux. Historiquement, ces antidotes étaient produits par des animaux précédemment hyperimmunisés contre un venin. Cependant, de nombreux effets secondaires étaient observés, notamment des chocs anaphylactiques sévères. Actuellement, la plupart des antivenins produits sont des fragments purifiés d'anticorps (F(ab')₂), ce qui limite le risque d'immunisation contre les anticorps administrés. Le dosage utilisé dépend de la gravité des symptômes observés chez la victime [14].

En revanche, il sera nécessaire de connaître l'espèce de scorpion en cause avant d'administrer l'antidote. En effet, les toxines de scorpions possèdent entre elles un grand polymorphisme antigénique. Ainsi, même pour des toxines provenant d'un même spécimen, il sera nécessaire d'utiliser plusieurs anticorps différents afin de neutraliser toutes les toxines ou alors ne cibler qu'une seule toxine, si elle est responsable de la majorité des symptômes (par exemple, *Androctonus australis hector*, l'une des espèces les plus dangereuses, produit 4 α toxines AahI à AahIV, Aah II est responsable de plus de la moitié de la toxicité; c'est donc cette protéine qui est ciblée par l'anticorps) [117].

2.10 Prévention :

La plupart des cas de piqûre ont lieu en saison chaude, proche des habitations rurales, la nuit (le scorpion étant un animal nocturne), ou la journée lorsqu'il est dérangé lors de son sommeil sous des pierres [14].

Il est ainsi recommandé aux personnes situées dans les zones particulièrement à risque de porter des chaussures notamment lors des balades nocturnes, et de vérifier l'absence de scorpions dans les vêtements, les chaussures ou dans les sacs de couchage.

3) Les toxines d'araignées :

Depuis toujours, les araignées suscitent la fascination, voire la peur, autant par leur aspect que par la dangerosité de leur venin. Il a été recensé à ce jour plus de 42 000 espèces d'araignées dans le monde [118]. Pourtant, seulement quelques espèces sont dangereuses pour l'homme. En effet les araignées se nourrissent de petits arthropodes et d'insectes: la plupart des toxines présentes dans le venin seront dirigées contre les canaux sodiques d'insectes (dans un but alimentaire). Plus minoritaires, certaines toxines seront actives envers les mammifères (dans un but défensif) [119].

La découverte des toxines d'araignées est relativement récente. Les micro-agatoxines, premières toxines actives sur les canaux sodiques découvertes, ont été identifiées en 1989 par l'équipe de Adams. Cependant, depuis ces dernières années, les toxines d'araignées sont l'objet de nombreuses études, notamment pour leur potentielle application comme insecticides.

Selon les estimations, il a été évalué à près de dix millions le nombre de polypeptides différents produits dans le venin d'araignée! (par comparaison, les peptides produits par les cônes et les scorpions vu précédemment, qui possèdent déjà un large répertoire, n'excédaient pas quelques dizaines de milliers de peptides) [120]. Seuls moins de 0,01% d'entre eux ont été caractérisés à ce jour [118].

3.1 Les araignées :

Les araignées peuvent être divisées en deux grands groupes selon la position de leurs chélicères (appendices buccales des araignées) [121]. D'une part les orthognathes ou mygalomorphes (dont les chélicères sont positionnés dans l'axe du corps) rassemblent des espèces généralement de grande taille mais possédant une activité toxique plutôt modérée (à l'exception des genres *Atrax* et *Hadronyche* posant un véritable problème de santé publique en Australie).

D'autre part les labidognathes (dont les chélicères sont perpendiculaires à l'axe du corps), considérées comme des araignées plus évoluées, qui rassemblent des espèces beaucoup plus dangereuses pour l'homme. La plupart des toxines actives sur le mammifères seront retrouvées dans ce groupe.

3.2 Le venin d'araignée :

Présentes sur Terre depuis 300 à 400 millions d'années, les araignées ont développé avec le temps un véritable arsenal venimeux afin de paralyser et capturer leurs proies, ainsi que pour se protéger des éventuels prédateurs. [15].

Le venin est produit dans une glande à venin et est acheminé jusqu'aux dents par un canal à venin. Il sera alors injecté à la victime lors de la morsure. La quantité de venin injectée est variable selon la proie. Il semblerait que les araignées injectent leur venin avec économie, seulement la quantité suffisante pour tuer ou paralyser leurs proies [120].

En général, le venin d'araignée est un liquide clair non coloré, et très facilement soluble dans l'eau. La plupart des venins sont neutres ou alcalins, même si certains sont acides (comme celui de *Atrax robustus* par exemple).

La composition du venin est variable qualitativement et quantitativement, non seulement entre les espèces mais également entre les différents individus. De plus, le venin peut ne pas posséder la même toxicité en fonction du sexe de l'animal. Par exemple, chez *Atrax robustus*, le mâle est responsable des cas les plus sévères d'envenimation chez l'homme (la robustoxine, peptide responsable de sa toxicité, est présente en plus faible quantité chez la femelle) [119].

Le venin est composé:

- ◆ de peptides : ils représentent en masse environ 25% du venin [122].

La plupart des peptides produits dans le venin d'araignées sont de petite taille (généralement moins de 8kDa). Ces peptides possèdent des propriétés pharmacologiques diverses, ciblant essentiellement les canaux ioniques (sodiques, mais aussi calciques et potassiques). Cependant ils conservent un squelette moléculaire commun et une certaine homogénéité structurale.

Tout comme le venin de cône avec lequel les araignées partagent de nombreuses similitudes, les peptides peuvent être classés en "cabal", de par leur propriétés excitatrices et inhibitrices et leur délai d'action (des toxines ayant à première vue une action contraire, agissent en synergie pour immobiliser la victime).

Les peptides sont synthétisés dans un premier temps sous forme de prepeptides et subissent de nombreuses transformations post-traductionnelles (comme les toxines de cônes et d'anémones de mer) [123].

- ◆ de protéines :

Ces toxines de haut poids moléculaire regroupe essentiellement des enzymes (hyaluronidase, sphingomyélinase, phospholipase) et sont responsable des syndromes nécrotiques lors des morsures d'araignées.

- ◆ d'un ensemble de divers composés :

En plus des peptides, le venin est également composé d'un ensemble de molécules potentialisant l'action des toxines, telles que acides aminés, acylpolyamines, neurotransmetteurs (glutamate, dopamine, sérotonine...), glucose, et des ions.

3.3 Récupération du venin :

La méthode la plus employée consiste à stimuler électriquement les muscles des chélicères (et également dans certaines techniques les muscles thoraciques et péri-oesophagiens). Il faut cependant être prudent avec cette méthode puisque le venin recueilli peut être contaminé par de la salive et des éléments digestifs, du fait d'une régurgitation engendrée chez l'animal par la stimulation électrique [120]. Parfois, l'utilisation de petits tubes aux extrémités des dents permet d'éviter cette contamination [124].

Une seconde méthode consiste à prélever directement le venin dans la glande après dissection [125].

Dans un second temps, les peptides sont purifiés par HPLC combinée à une chromatographie par échange d'ions en utilisant des gradients d'acétate d'ammonium (historiquement, les techniques employées utilisaient l'électrophorèse, mais ne suffisaient pas à distinguer correctement les différentes fractions du venin) [125].

L'analyse des toxines est quant à elle presque exclusivement réalisée par HPLC couplée à un spectromètre de masse [126].

3.4 Synthèse :

Quelle que soit la technique de récupération du venin employée, seule une très faible quantité de venin est recueillie. Ce peu de matériel biologique exploitable et les coûts de purification ont limité pendant longtemps les recherches sur le venin d'araignée.

Actuellement, comme les autres toxines de nature peptidique ciblant les canaux sodiques, les toxines d'araignées peuvent être produites par des méthodes de biotechnologie en utilisant des systèmes d'expression. La technique produisant les toxines à l'aide d' *E.coli* est à ce jour la plus utilisée, même si les méthodes actuelles ne sont pas encore pleinement satisfaisantes, du point de vue du coût, du taux de rendement et de la bioactivité des peptide obtenus [127].

3.5 Structure des toxines :

Toutes les toxines d'araignées découvertes à ce jour semblent se replier afin de former des structures compactes globulaires. Cette formation est stabilisée par la présence de ponts disulfures (généralement trois à quatre [128]), permettant à la toxine de posséder une grande stabilité in vivo: les peptides sont ainsi mieux protégés de l'action des protéases, au niveau de la glande à venin mais aussi dans l'organisme de la victime, et ils résistent mieux aux variations de pH et de température.

Elles se construisent selon le motif structural ICK (Inhibitor Cystine Knot), précédemment décrit pour les toxines de venin de cônes: deux feuilletts beta antiparallèles stabilisés par la présence de plusieurs ponts disulfures (les ponts forment alors un "noeud" interne de cystéines). L'appariement des cystéines se fait selon le modèle I-IV, II-V, et III-VI.

En plus de l'augmentation de la stabilité du peptide, cette conformation permet une meilleure exposition des résidus à la surface de cette conformation globulaire, optimisant ainsi la présentation au récepteur cible [123].

En revanche, malgré un squelette de base similaire, les peptides d'araignées se distinguent par des activités pharmacologiques très variées de par la mutation de certains acides aminés clés, présents à la surface de cette structure. Ce répertoire de toxines apparentées est expliqué génétiquement par la duplication d'un gène ancêtre de toxine suivi d'un mécanisme d'hypermuation de certaines résidus déterminants l'activité de la toxine [108].

3.6 Clasification des toxines d'araignées :

Ces toxines ont la particularité de cibler différents sites récepteurs présents sur les canaux sodiques. Le classement des toxines d'araignées proposé se fera à partir de leurs activités biologiques et de leur site cible sur les canaux sodiques:

3.6.1 Toxines occluant le pore : potentiels ligands du site 1

Il a été isolé parmi les individus du genre *Selenocosmia* (tarentules présentes notamment au Sud de la Chine) une famille de toxines possédant entre 33 à 35 résidus, parmi lesquelles les hainantoxines (HNTX) et les huwentoxines (HWTX) [129]. Il a été observé que certains membres de cette famille (HNTX III et IV ainsi que HWTX IV) bloquent de manière dose dépendante les courants sodiques provenant de canaux sensibles à l'action de la TTX. De même, HNTX-I agirait selon le même mécanisme mais serait inactive sur les canaux de mammifères et bloquerait uniquement les canaux d'insectes [123].

Il a été proposé que ces toxines, aux effets proches de la TTX agiraient sur le site d'interaction 1. Cependant, il serait plus probable que ces toxines agissent sur un site distinct,

proche du pore, ou entraînant un changement conformationnel bouchant alors le pore du canal.

3.6.2 Toxines modifiant les cinétiques d'inactivation : ligands du site 3

A partir du venin de *Phoneutria nigriventer* (ou araignée du bananier, présente essentiellement au Brésil) a été isolé différentes fractions neurotoxiques: PhTx1, 2, 3 et 4. La toxine Tx4(6-1) a ensuite été découverte dans la fraction PhTx4. Cette toxine est non toxique pour les mammifères mais est létale pour les insectes. Elle ralentit l'inactivation rapide du canal et prolonge ainsi le potentiel d'action. Il a été confirmé que son action provient de la liaison au site 3 (elle rentre en compétition avec la toxine alpha de scorpion BomIV). Également, Magi2 extraite de *Macrothele gigas*, possède les mêmes caractéristiques et lie également le site 3 des canaux d'insectes [123].

Dans cette classe sont également présentes des toxines actives sur les mammifères, telles que Magi 1 et 4 ou la fraction PhTx2 (composée notamment de Tx2-5 et Tx2-6) [130]. On pourra également citer SGTx1 extraite de la tarentule *Scodra griseipes* et JzTx-IV découverte chez l'espèce *Chilobrachys jingzhao* [128].

Enfin, les delta atracotoxines (delta-ACTX) possèdent également ce même mode d'action. ACTX-Ar1 (ou robustoxine) retrouvée chez *Atrax robustus* et ACTX-Hv1 (ou versutoxine) chez *Hadronyche versutus* sont des toxines de 42 résidus ciblant les insectes autant que les mammifères. Elles sont notamment responsables en Australie de fréquents cas de décès humains, notamment chez les enfants [123].

3.6.3 Toxines modifiant le potentiel d'activation : ligands du site 4

Dans cette catégorie sont classées les micro-agatoxines, découvertes chez l'espèce *Agelenopsis aperta*, qui sont des toxines de 36 ou 37 résidus. Elles possèdent une forte homologie de séquence avec les curtatoxines (provenant de *Hololena curta*) [123]. Ces deux familles de toxines agissent en diminuant le potentiel nécessaire à l'activation du canal, augmentant ainsi la fréquence des potentiels d'actions. Elles induisent alors chez les insectes, lentement mais irréversiblement, des convulsions et des paralysies [119].

Possédant le même mécanisme d'action, Magi5 est active également sur les mammifères [128].

Ce mécanisme d'action est proche de celui observé pour les toxines beta de scorpions, et il est fort probable qu'elles lient le site 4, même si des tests utilisant des radioligands n'ont pas encore été réalisés. Il est toutefois à noter que ces toxines induisent également un ralentissement de l'inactivation du canal, ce qui n'est pas observé chez les toxines beta de scorpions [123].

3.6.4 Le cas des delta palutoxines :

Les delta palutoxines (ou delta-PaluITs) extraites dans le venin de *Paracoelotes luctuosus* sont des peptides composés de 36 ou 37 acides aminés. Elles agissent en ralentissant l'inactivation mais n'abaissent pas le voltage nécessaire à l'activation du canal. Ce mécanisme est donc semblable à celui des toxines liant le site 3, en revanche ces toxines lient le site 4! En effet, les tests de compétitions ont montré que les delta-PaluITs déplaçaient la liaison de Bj-xtrIT (toxine beta de scorpion liant le site 4) mais ne déplaçaient pas celle de Lqh α IT (toxine alpha de scorpion liant le site 3) [123].

La découverte de ces toxines a donc remis en cause la classification en site d'interaction des canaux sodiques. Plusieurs hypothèses sont actuellement émises afin d'expliquer ce phénomène. La première consiste à considérer le site 4 comme un macro-site, qui serait lié allostériquement à l'inactivation du canal. Une autre hypothèse propose l'interaction des toxines d'araignées avec des résidus du canal, mais également avec l'environnement des lipides membranaires entourant les domaines du canal: les modifications de conformations du canal et les conséquences sur ces cinétiques d'ouverture et de fermeture seraient ainsi autant liées aux modifications apportées par la toxine sur les résidus protéiques que lipidiques [128].

3.6.5 Toxines dont le site d'interaction reste encore à identifier :

De nombreuses toxines d'araignées restent encore à analyser, leur mécanisme d'action étant encore peu compris. Parmi elles, on pourra citer par exemple DTX9.2, 10 et 11 (extraites de *Diguetia canities*) qui forment une famille de toxines provoquant chez les insectes une paralysie spastique mais n'ayant aucun effet chez les mammifères. D'après les tests de liaison effectués, il est peu probable que ces toxines agissent en liant le site 3 [123].

Concernant les toxines actives sur les mammifères, les protoxines I et II (ProTxI et ProTxII) isolées de la tarentule *Thrixopelma pruriens*, bloquent le canal en inhibant son ouverture. Elles agiraient en bloquant le détecteur de voltage du canal, notamment au niveau des domaines II et IV.

Ces toxines ont la particularité d'être actives sur les canaux sensibles et résistants à la TTX (contrairement aux HNTX et HWTX ciblant le site 1 et ne bloquant que les courants sodiques sensibles à la TTX) [125]. Ce détail aura une importance pour le développement potentiel de futurs analgésiques (se reporter à la troisième partie de cette thèse).

Remarque: Il est à noter que certaines toxines ne sont pas très spécifiques des canaux sodiques. Certaines toxines possèdent de multiples activités sur plusieurs canaux ioniques. Par exemple, l'hanatoxine caractérisée initialement comme inhibiteur des canaux potassiques possède

également une activité envers les canaux sodiques et les canaux calciques. De même, il a été prouvé que ProTxI pouvaient interagir en plus des canaux sodiques sur les canaux potassiques [128].

3.7 Toxicité :

La toxicité générale des peptides de venin d'araignées ciblant les canaux sodiques voltage dépendants est assez difficile à estimer, de par la grande variété de toxines produites ayant chacune des spécificités propres. La DL50 peut varier selon les peptides de l'ordre du µg/kg à plusieurs dizaines de mg/kg, voir à une absence de toxicité [122].

En règle générale, ces toxines possèdent une DL50 chez la souris inférieur au milligramme par kilogramme, par voie intrapéritonéale.

En guise d'illustration, la DL50 de HNTX-IV chez la souris est de 0,2mg/kg en administration intrapéritonéale. Lors de l'administration de Tx2-6 à des vertébrés, il a été montré qu'une dose de 7,5pmol/g suffisait à être létale pour ces animaux. Tx1, plus toxique chez la souris, a quant à elle une DL50 de 5,5pmol/g [118].

Une autre mesure est également employée afin d'évaluer leur potentiel toxique envers les insectes: la PD50, dose nécessaire afin de paralyser 50% des insectes testés. Par exemple, la PD50 de ACTX-Hv1 est de 200pmol/g chez les grillons et les mouches et la PD50 de DTX9.2 sur les papillons nocturnes est de 380pmol/g [126].

3.8 Clinique de l'envenimation :

Il est assez peu aisé de déterminer quelle importance ont chacun des composés toxiques dans la symptomatologie engendrée par une morsure d'araignée, du fait de l'incroyable diversité des composés toxiques présents dans leur venin. Malgré tout, il est reconnu que les toxines ciblant les canaux sodiques participeraient à plus ou moins grande importance aux principaux symptômes observés lors des cas d'envenimation, tels que: douleur au point d'injection, paralysie contracturante, hypertension artérielle, déshydratation sévère, et vomissements [131].

Les cas de décès humains, par défaillance cardiovasculaire ou respiratoire, restent plutôt exceptionnels, sauf pour certaines genres tels que *Atrax*, *Hadronyche* et *Phoneutria nigriventer* [120].

3.9 Prise en charge :

Dans la plupart des cas, la morsure d'araignée ne provoque que des symptômes mineurs, une prise en charge médicale n'est pas nécessaire et la première chose à faire est donc de rassurer la victime. Cependant, le venin de certaines espèces nécessite un traitement adapté.

Dans un premier temps, il faudra immobiliser le membre atteint et appliquer de la glace pour obtenir une vasoconstriction locale. Le traitement médicamenteux sera adapté à la clinique: antalgiques, atropine, benzodiazépines, etc. Un sérum antivenimeux peut également être utilisé si la clinique est importante, et s'il est disponible en fonction de l'espèce concernée [131].

Partie III : Applications potentielles
des toxines ciblant les canaux
sodiques voltage dépendants

1) Applications biomédicales :

1.1) La douleur chronique :

Dans le domaine de la douleur, les toxines agissant sur les canaux calciques (dont les ω -conotoxines) sont celles pour lesquelles nous disposons le plus de données à l'heure actuelle. Concernant les toxines ciblant les canaux sodiques, les études sont plus récentes et il reste encore beaucoup à découvrir. Pourtant, ces toxines semblent être parfaitement indiquées dans cette application.

En effet, les canaux sodiques voltage dépendants sont essentiels à la genèse et à la propagation d'un potentiel d'action. De par leur présence dans les voies nerveuses périphériques, et de par le manque de thérapeutique efficace, l'implication de ces canaux dans la douleur chronique est un axe de recherche intéressant. L'objectif est double: étudier la physiopathologie de la douleur chronique qui est encore à ce jour mal comprise, ainsi que de trouver de nouvelles thérapeutiques.

1.1.1 Les canaux sodiques voltage dépendants dans les mécanismes nociceptifs :

Les canaux sodiques ont une importance toute particulière dans la douleur, en témoigne l'arsenal thérapeutique actuel: les anesthésiques locaux (lidocaïne,..) et les antiépileptiques (carbamazépine,...) sont des molécules ciblant les canaux sodiques voltage dépendants. Malgré leur efficacité dans certaines douleurs chroniques, ces médicaments possèdent également de nombreux effets secondaires qui limitent leur utilisation [62]. En effet, les anesthésiques locaux ne sont pas sélectifs et bloquent les potentiels d'action dans toutes les fibres nerveuses sensibles, motrices et autonomes. Ainsi, ils bloquent autant les axones transportant des informations sensibles non douloureuses que ceux transportant les informations nociceptives. Cela a pour effet cliniquement d'engendrer perte de sensations, paralysie et pertes des fonctions autonomes [132].

Ce manque de sélectivité est notamment expliqué à cause du fait que les anesthésiques locaux ne sont pas sélectifs entre les différents isoformes des canaux sodiques (nous avons déjà abordé le fait qu'il existe différents isoformes, ayant chacun une distribution particulière dans l'organisme.)

En effet certains isoformes ont plus ou moins d'importance dans l'influx douloureux, alors que d'autres occupent majoritairement d'autres fonctions dans l'organisme (et sont donc responsables des effets secondaires des thérapeutiques actuelles lors d'une injection systémique). L'enjeu consisterait donc à ne bloquer que les canaux sodiques impliqués dans la nociception, ce qui produirait un effet analgésique "pur".

Cependant, la sélectivité de blocage entre les différents isoformes est difficile à concevoir

car ces canaux possèdent une très grande homologie entre eux, ce qui explique les inconvénients des anesthésiques actuels, et le peu de molécule de synthèse sélective d'un isoforme [133].

Dans un premier temps nous aborderons les mécanismes de la douleur et nous verrons quels isoformes est il judicieux de cibler, puis nous aborderons les toxines capables de cibler ces isoformes particuliers.

1.1.2 Physiopathologie de la douleur :

La douleur aiguë est une perception qui permet d'apporter un signal de danger en réponse à un stimulus. Cependant, dans certaines conditions, la douleur chronique perd son caractère protecteur et survient sans signal d'agression extérieure. En plus d'être inutile, la douleur nuit gravement à la qualité de vie des patients et peu de stratégies thérapeutiques efficaces sont disponibles dans cette indication [134].

La sensation de douleur est généralement produite à partir des neurones périphériques particuliers appelés nocicepteurs. Ces nocicepteurs possèdent leurs terminaisons dendritiques à la périphérie et leur corps cellulaire au niveau du ganglion rachidien (ou DRG Dorsal Root Ganglion). Les stimuli douloureux détectés à la périphérie engendrent un ensemble de signaux qui aboutissent à la dépolarisation de la membrane du nocicepteur. Celle-ci est détectée par les canaux sodiques voltage dépendants qui vont ensuite transmettre le potentiel d'action le long de l'axone du neurone pour atteindre la moelle épinière qui transmettra alors le signal à l'encéphale [135].

Les neurones du DRG peuvent être classés selon trois grandes classes basées sur la myélinisation de leurs axones [136].

- Les fibres A β de large diamètre, fortement myélinisée et de conduction rapide.
- Les fibres A δ de diamètre moyen, faiblement myélinisée et de conduction intermédiaire. Ces fibres sont notamment responsables de la douleur dite "type piqûre".
- Les fibres C de faible diamètre, non myélinisée et de conduction lente. Ces fibres sont notamment responsables de la douleur dite "type brûlure".

La douleur chronique est généralement classée selon son origine.

- Elle peut être inflammatoire c'est à dire liée à une inflammation ou une blessure des tissus (par exemple les douleurs liées à certains cancers, à de l'arthrite...). Les nocicepteurs périphériques sont activés par la présence de médiateurs de l'inflammation.

- Elle peut être également neuropathique c'est à dire liée à une lésion des neurones [137]. L'excitabilité électrique de ces neurones est modifiée, renvoyant au SNC l'information d'une douleur exagérée. Cela peut se manifester par des sensations de brûlures spontanées continues ou intermittentes, une sensation douloureuse exagérée pour un stimulus douloureux mineur voire un stimulus ressenti comme non douloureux dans des conditions normales [138].

1.1.3 Rôle des différents isoformes :

Remarque: les sous unités beta associées aux sous unité alpha du canaux ont leur importance dans la régulation de l'activité du canal dans les mécanismes de la douleur.

De plus, dans l'environnement membranaire de ces canaux, d'autres molécules ont prouvé leur importance dans leur régulation (annexinII/p11, contactin, CAP-1A Clathrin Associated Protein 1A...) [133].

Puisque leurs rôles sont encore peu connus à l'heure actuelle et dans un souci de simplicité, seules les sous unités alpha seront considérées par la suite.

1.1.3.1 L'isoforme Nav1.7 :

Cet isoforme est fortement exprimé au niveau des DRG, des ganglions sympathiques et de l'épithélium olfactif [139]. Il est surtout retrouvé dans l'extrémité libre terminale des nocicepteurs situés au niveau de la peau et dans les axones de fibres C ayant des propriétés nociceptives [137] (ainsi que dans de moindres proportions dans les fibres A β).

Il a pour caractéristique d'avoir une activation et une inactivation rapide. En revanche il possède une longue période réfractaire (il n'est pas capable de propager des potentiels d'action très rapprochés entre eux).

Grâce à ses propriétés biophysiques, ce canal jouerait un rôle majeur dans le déclenchement des potentiels d'action dans les neurones nociceptifs de faible diamètre [136].

Cet isoforme joue un rôle crucial dans les mécanismes de la douleur, en témoigne l'existence de trois pathologies génétiques liées à la mutation du gène SCN9A, codant le canal Nav1.7 :

- L'insensibilité congénitale à la douleur ou CIP (Congenital Insensitivity to Pain) :

Les individus atteints par cette maladie ne ressentent pas de douleur dans des situations

douloureuses pour la population générale (piqûre, blessure, fracture osseuse, marcher sur des surfaces chaudes...). Pourtant, ils ne souffrent d'aucun autre déficit neurologique sensoriel, moteur ou cognitif, exceptés peut être des dysfonctions dans l'odorat [135].

Cette pathologie est liée à la production de canaux Nav1.7 non fonctionnels (le canal est tronqué et ne peut jouer son rôle).

- L'erythromelalgie primaire familiale ou IE (Inherited Erythromelalgia) :

Les personnes atteintes de cette maladie souffrent de douleurs sévères chroniques touchant leurs mains et leurs pieds et apparaissant généralement pendant l'enfance [136].

Ceci est dû à la mutation sur l'isoforme Nav1.7 modifiant la dépendance au voltage et aboutissant ainsi à une hyperexcitabilité neuronale (des potentiels d'action sont générés dans des situations qui dans des conditions normales n'en produisent pas) [139].

- Le syndrome de douleur extrême paroxystique ou PEPD (Paroxysmal Extreme Pain Disorder) :

Cette pathologie est caractérisée par de sévères sensations douloureuses au niveau rectal, oculaire et submandibulaire.

Ces symptômes sont dus à certaines mutations qui perturbent l'inactivation de l'isoforme Nav1.7 [140].

Contrairement aux patients souffrant d'IE, les personnes atteintes de PEPD répondent plutôt favorablement à la carbamazépine [135].

Des études expérimentales permettent également de montrer le rôle de Nav1.7 dans la douleur. Des études utilisant des animaux génétiquement dépourvus de Nav1.7 ont permis de démontrer que les réactions d'hypersensitivité mécanique et thermique normalement associées à des douleurs de type inflammatoire étaient absents chez ces animaux [137].

De plus, il semblerait que la synthèse du canal Nav1.7 soit augmentée au niveau des nocicepteurs après le phénomène d'inflammation, ce qui diminuerait le seuil du déclenchement des potentiels d'actions, expliquant ainsi les réactions d'hypersensitivité [140].

En revanche, concernant les douleurs de type neuropathiques, les études sur animaux sont contradictoires et le peu de données chez l'homme ne permettent pas de connaître le véritable rôle de cet isoforme dans ce type de douleur.

En plus de son rôle dans la douleur, cet isoforme semblerait également être important dans l'olfaction et dans le mécanisme de la toux réflexe [136].

Ces observations nous renseignent donc sur le rôle crucial de cet isoforme dans les mécanismes de la douleur. Cet isoforme semble être une cible prometteuse pour développer des composés analgésiques. De plus, la mutation de Nav1.7 retrouvée dans la CIP entraînant une insensibilité à la douleur sans autres grandes perturbations physiologiques laisse à penser que si un composé est capable de bloquer spécifiquement cet isoforme, il pourrait être très utile chez les patients souffrant de douleurs pathologiques et aurait peu d'effets indésirables.

Les toxines pourront sur cet isoforme être d'une précieuse aide puisque les recherches afin de trouver une molécule synthétique spécifique de cet isoforme n'ont pas encore donné de résultats satisfaisants (les structures benzazépinones développées agissent également sur les isoformes Nav1.2 et Nav1.5) [141].

1.1.3.2 L'isoforme Nav1.8 :

Cet isoforme a été découvert dans les neurones sensoriels de faible diamètre jouant un rôle important dans la nociception.

Les cinétiques de ce canal sont en revanche bien différentes de celles de Nav1.7, puisque les vitesses d'activation et d'inactivation sont beaucoup plus rapides. De plus, ils ne possèdent pas la même dépendance au voltage: en effet une dépolarisation plus importante est nécessaire afin d'ouvrir ce canal. Ainsi, alors que l'isoforme Nav1.7 servirait de déclencheur aux potentiels d'actions, Nav1.8 servirait plutôt à conduire ce potentiel une fois qu'il a été généré [140].

Les expériences sur souris ne possédant pas cet isoforme ont permis de démontrer son importance dans les mécanismes d'hyperalgie d'origine inflammatoire, et dans les douleurs liées à des stimuli thermique et mécanique (cet isoforme est essentiel dans la douleur liée au froid puisque son inactivation est résistante au froid contrairement aux autres isoformes [141]). De plus, il s'agit de l'isoforme majoritairement responsable des douleurs viscérales [142].

Tout comme Nav1.7, sa contribution dans la douleur neuropathique reste encore très controversée, notamment suite à des résultats contradictoires sur des tests utilisant des souris génétiquement dépourvues de Nav1.8 (des mécanismes compensateurs de la perte de cet isoforme seraient mis en place chez la souris, perturbant les résultats obtenus) [136].

Pourtant A-803467, une petite molécule bloquant spécifiquement Nav1.8 (entre 100 et 1000 fois plus que les autres isoformes [135]), a été efficace sur les modèles animaux de douleurs mécanique, inflammatoire et neuropathique (malgré sa faible biodisponibilité, les recherches sur cette molécule ont permis d'obtenir une préparation active par voie orale, ce qui est un grand avantage pour le développement de cette molécule) [139].

En plus d'être une cible intéressante de par son implication dans les voies de la douleur, Nav1.8 possède également l'avantage d'être exprimé presque exclusivement dans des neurones nociceptifs, ce qui limiterait les effets secondaires d'une toxine ciblant spécifiquement cet isoforme [133].

Remarque : Cependant, ces toxines pourraient développer des effets secondaires à long terme. En effet Nav1.8 est également exprimé dans la rétine et au niveau des myocytes. Il a été montré que les mutations du gène de Nav1.8 pouvaient engendrer des troubles de la conduction cardiaque. L'utilisation prolongée d'inhibiteurs de Nav1.8 pourrait ainsi provoquer de sévères effets secondaires.

1.1.3.3 L'isoforme Nav1.9 :

Tout comme Nav1.8, Nav1.9 est un isoforme TTX-R retrouvé au niveau des neurones de faible diamètre du DRG (inférieur à 30 μm) et est la plupart du temps retrouvé dans des neurones nociceptifs [143].

De par ces cinétiques très lentes et son potentiel d'activation proche du potentiel membranaire de repos, Nav1.9 ne contribuerait pas à la propagation des potentiels d'actions. En revanche, il engendre des courants sodiques persistants très lents, qui permettent ainsi de dépolariser le potentiel membranaire de repos, diminuant alors la valeur nécessaire à l'initiation des potentiels d'action [6].

Les études concernant cet isoforme sont assez difficiles à mettre en place, du fait de la difficulté d'exprimer ce canal dans des système d'expression hétérologues afin de l'analyser. Des modèles utilisant des souris génétiquement modifiées sans canal Nav1.8 et traitées par la TTX ont donc été utilisés [143]. Il a été ainsi démontré que cet isoforme jouerait un rôle dans l'hyperexcitabilité neuronale liée aux douleurs inflammatoires mais pas dans la douleur neuropathique.

En revanche, Nav1.9 est également exprimé dans des neurones entériques, ainsi que dans les gonades. Toutefois, les études menées sur des souris dépourvues de Nav1.9 n'ont relevé aucun trouble gastro-intestinal ni trouble de la fertilité [140].

1.1.3.4 L'isoforme Nav1.3 :

Le rôle de Nav1.3 dans les mécanismes de la douleur est assez controversé. Dans des conditions normales, cet isoforme est exprimé dans les neurones embryonnaires en développement, il est ainsi très peu retrouvé dans les neurones adultes matures [139]. Cependant, lors des processus d'inflammation ou de lésions neuronales, l'expression de Nav1.3 est très fortement augmentée contribuant alors à l'excitabilité des neurones du DRG. En effet il s'agit d'un isoforme ayant des cinétiques d'activation et d'inactivation très rapides, ce qui augmente fortement l'excitabilité neuronale [138].

N'étant retrouvé que dans des conditions pathologiques, Nav1.3 pourrait s'avérer comme étant une cible majeure des traitements de la douleur. Cependant les études sur animaux rendent des résultats contradictoires, et le rôle exact de cet isoforme dans les mécanismes de la douleur est encore à l'étude [6].

1.1.3.5 Les autres isoformes sodiques :

Les autres isoformes quant à eux ne possèdent que des rôles mineurs voire même aucun rôle dans la sensation de douleur.

- Nav1.6 est principalement localisé dans les nœuds de Ranvier dans les neurones myélinisés des systèmes nerveux central et périphérique [137].
- Nav1.1 est surtout exprimé dans les neurones sensoriels de large diamètre (fibre A) et semble participer principalement aux informations proprioceptives [138].
- Nav1.2 est l'isoforme majoritaire dans le SNC. Il est faiblement exprimé dans le système nerveux périphérique.
- Nav1.5 est très peu exprimé au niveau des neurones du DRG. Il s'agit de l'isoforme majoritairement responsable des flux sodiques cardiaques.
- Nav1.4 est l'isoforme retrouvé dans les muscles squelettiques [140].

Ainsi, le blocage de ces canaux n'entraînent pas d'effet analgésique, et au contraire, peuvent engendrer des effets indésirables.

Il paraîtrait donc judicieux de s'intéresser aux toxines ayant une spécificité pour les isoformes Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9 et peut être Nav1.3. La douleur chronique ciblée serait d'origine

inflammatoire, et éventuellement neurologique pour Nav1.8 et Nav1.3.

1.1.4 Les toxines d'intérêt :

Parmi les toxines décrites précédemment, les toxines pouvant être intéressantes dans les voies de la douleur devront principalement répondre à deux critères:

- Inhiber le canal sodique (or la majorité des toxines ont tendance à favoriser l'influx sodique par inhibition de l'inactivation ou modification du potentiel de membrane).
- Posséder une certaine sélectivité sur les isoformes Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9 et Nav1.3.

1.1.4.1 Les μ -conotoxines :

Les conopeptides ont été largement étudiés dans les mécanismes de la douleur. L'un d'entre eux, ciblant les canaux calciques de type N, a permis le développement du ziconotide (Prialt) ou ω -MVIIA, médicament utilisé dans les douleurs sévères par voie intrathécale.

A l'heure actuelle, les recherches se concentrent également sur les μ -conotoxines ciblant les canaux sodiques voltage dépendants [62].

Les μ -conotoxines possèdent plusieurs intérêts majeurs: elles sont de petites tailles (généralement moins de 5kDa), leur synthèse est facile à réaliser, elles possèdent une bonne stabilité structurale, et elles inhibent les canaux sodiques avec une plus ou moins grande sélectivité.

Aucune conotoxine connue à ce jour n'est sélective pour les canaux Nav1.7, Nav1.9, ou Nav1.3. En revanche, certaines ciblent spécifiquement le canal Nav1.8.

MrVIA, MrVIB sont des μ O-conotoxine extraites du venin de cône *Conus marmoreus* [6]. Il a été montré que MrVIB bloquait 6 à 10 fois plus les courants engendrés par Nav1.8 que ceux engendrés par les isoformes TTX-S [140]. Administré par voie intrathécale, il a été montré que MrVIB et MrVIA diminuaient significativement les douleurs mécaniques et thermiques d'origine inflammatoire et neuropathique chez la souris. De plus, ces peptides possèdent des effets secondaires 30 fois moins importants que ceux engendrés par la lidocaïne.

Pas ailleurs, MrVIB a démontré une action anesthésique locale [62].

Un autre peptide MfVIA, extrait de *C. magnificus*, structurellement proche de MrVIA et MrVIB, est également en cours d'étude [6].

KIII et SIIIA ont montré une activité analgésique sur des modèles de souris après administration systémique [62]. Ces peptides cibleraient majoritairement les isoformes TTT résistants [143]. Cependant, ils cibleraient également l'isoforme Nav1.4, ce qui limiterait leur développement. En revanche, des dérivés à partir du modèle structural de ces deux toxines sont en étude.

1.1.4.2 Les toxines d'araignées et de scorpions :

ProTx-II, toxine extraite du venin de la tarentule *Thrixopelma pruriens*, est un inhibiteur puissant et sélectif du canal Nav1.7 [136] (plus de 100 fois supérieur aux autres isoformes [141]). Il a été montré que la toxine réduisait la fréquence des potentiels d'action des fibres nerveuses C dans les modèles expérimentaux isolés. En revanche, dans les modèles animaux de douleurs inflammatoires étudiés, la toxine n'a montré qu'une très faible efficacité (en administration intrathécale ou intraveineuse).

De même, l'Huwentoxine-IV extraite de l'espèce *Ornithoctonus huwena*, pourtant inhibitrice de Nav1.7 (et à moindre mesure de Nav1.2 et Nav1.3), n'a toujours pas démontré son activité sur des modèles animaux.

Enfin d'autres peptides tels que ProTx1 (araignée) et TsVII (scorpion) interagissent avec Nav1.9 de manière non sélective [62].

Il est à noter que des toxines chimériques ont également vu le jour. Par exemple, la drosotoxine, toxine chimérique de scorpion, a montré une faible inhibition mais avec une grande sélectivité pour l'isoforme Nav1.8, et a démontré son action antalgique dans les modèles animaux de douleur neuropathique.

1.1.4.3 Les batrachotoxines :

Les travaux de l'équipe de Bosman en 2004 ont permis de démontrer l'implication de la batrachotoxine sur l'isoforme Nav1.8 (en mettant en évidence expérimentalement les perturbations des caractéristiques du canal engendrées par la toxine) [144]. De plus, l'équipe a appliqué sur les mains d'un petit groupe de volontaires une crème contenant de la batrachotoxine (à la concentration de 5 à 25µg pour 100g). Il a été observé une sensation d'engourdissement au niveau des mains, qui durait environ trente minutes sans effets indésirables notables. Les neurones sensitifs semblent donc bien être perturbés par la batrachotoxine, en revanche son action antalgique reste encore à être étudiée.

1.1.4.4 La tétrodotoxine :

La TTX est sélective des canaux Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6 et Nav1.7 à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Les canaux TTX-R (Nav1.5, Nav1.8 et Nav1.9) sont quant à eux bloqués à des concentrations plus importantes de l'ordre du micromolaire.

Dans les modèles de douleurs inflammatoires sur des rats, l'administration systémique de TTX a permis d'atténuer l'hyperalgie mécanique et thermique dans des concentrations micromolaires, mais pas dans des concentrations nanomolaires. Cependant peu de données sont encore disponibles et des études supplémentaires sont nécessaires afin de préciser le rôle de la toxine dans la douleur inflammatoire [134].

En revanche, son implication dans la douleur neuropathique a été très étudiée. Dans les modèles de ligation du nerf spinal, l'administration de 25nM de TTX en application local ou dans l'espace épidual était efficace sur la douleur chez les rats. D'autres études ont montré son action dans la prévention du développement de l'hyperalgie thermique et de l'allodynie d'origine mécanique. De plus, l'administration systémique de la TTX a également reçu des résultats probants. L'action de la TTX serait majoritairement attribuée à son activité bloquante sur l'isoforme Nav1.3.

Plus précisément, la TTX a été étudiée dans les douleurs induites par chimiothérapies anticancéreuses. Cependant, les mécanismes toxiques provoquant la douleur des molécules anticancéreuses sont encore peu connus, et les résultats d'efficacité de la TTX sont pour le moment assez divergents. La toxine n'a pas montré d'efficacité dans l'allodynie mécanique provoquée par la vincristine chez des rats. En revanche, sur l'allodynie engendrée par le paclitaxel, la TTX aurait une certaine efficacité.

Enfin, des études cliniques ont été réalisées dans les douleurs sévères d'origine cancéreuses, et là encore, les résultats sont contradictoires. Des injections intramusculaires ont été réalisées chez 24 patients, à des doses comprises entre 15 et 90 µg par jour. Cette étude conclue que 30 µg deux fois par jour permettait d'obtenir un effet analgésique en ayant un profil de toxicité acceptable. En revanche dans une autre étude utilisant des injections sous cutanées, avec un protocole versus placebo en double aveugle, la TTX n'a montré aucun intérêt clinique significatif [134].

Toutefois, malgré une efficacité plus ou moins conséquente suivant les études, il est à noter que de par sa non sélectivité, la TTX possède des effets secondaires même à faible dose. Ainsi, il a été retrouvé chez la plupart des patients traités une engourdissement péri-buccal, ou des picotements qui apparaissaient de manière transitoire.

Ainsi, même si les résultats restent encourageants, il reste encore beaucoup de travaux à faire pour développer la TTX en tant qu'analgésique.

1.1.5 Mise au point de dérivés :

La majorité des toxines pouvant potentiellement avoir une implication dans la douleur sont des peptides. Or généralement, les peptides possèdent quelques caractéristiques qui limitent leurs applications chez l'homme: une faible demi vie dans l'organisme, une stabilité réduite face aux systèmes protéolytiques, ainsi qu'une faible biodisponibilité par voie orale [136]. Cependant, ils ont également d'autres avantages comme le fait d'être chargés, ce qui rend très peu probable leur passage de la barrière hémato-encéphalique [135].

De ce fait, en plus des études réalisées sur ces toxines, les chercheurs mettent au point des dérivés de ces molécules naturelles afin d'améliorer leurs performances pharmacologique et pharmacocinétique. Ces travaux passent par la détermination du pharmacophore de la molécule (c'est à dire la partie active du peptide, celle interagissant avec le récepteur). Ainsi, des petites molécules non peptidiques sont mises au point, mimant l'arrangement tridimensionnel des chaînes d'acides aminés clés. D'autres méthodes consistent à remplacer des groupements par des isostères, ou à tronquer le peptide d'une partie non active, ce qui diminue ainsi la taille du peptide en gardant son activité. Enfin, parfois, les techniques de cyclisation de peptides permettent d'augmenter fortement sa stabilité in vivo et ainsi sa demi vie dans l'organisme [145].

Par conséquent, les neurotoxines naturelles, si elles ne sont pas directement applicables chez l'homme, servent de modèle à la recherche de dérivés intéressants dans l'arsenal thérapeutique.

1.1.6 Stratégie d'administration des toxines :

Afin de pallier à un manque de sélectivité de certaines toxines et ainsi l'apparition d'effets indésirables, plusieurs techniques d'administration sont actuellement envisagées.

La voie d'administration locale transdermique permet de cibler spécifiquement une zone douloureuse précise (c'est d'ailleurs pour cela qu'il s'agit de la voie la plus utilisée pour les anesthésiques locaux actuels).

Une technique singulière consiste à utiliser un virus herpes comme vecteur en modifiant son ADN et ainsi en lui faisant exprimer la toxine peptidique souhaitée, qui sera alors produite spécifiquement dans les neurones sensoriels du DRG. Cette méthode permet de plus à la toxine de pénétrer à l'intérieur des tissus neuronaux, ce qui est un obstacle majeur pour certaines d'entre elles (comme ProTx-II) [141].

Enfin, une dernière méthode consiste à injecter ces toxines en association avec des anesthésiques locaux. Une récente étude a ainsi montré qu'en coadministrant de la TTX avec des dérivés de la lidocaïne, un synergisme d'action était observé, ce qui permettait de réduire les posologies de chaque composé et ainsi de diminuer les effets indésirables observés. Le synergisme d'action a également été démontré avec les antidépresseurs tricycliques [146].

1.2) La dysfonction érectile : Les toxines Tx2-5 et

Tx2-6 :

1.2.1 La dysfonction érectile :

1.2.1.1 Prévalence :

La dysfonction érectile chez l'homme est un phénomène multifactoriel qui atteint plus de 150 millions d'hommes dans le monde, et dont la prévalence devrait doubler d'ici 2025 [147]. L'âge est un facteur prédominant puisqu'il est estimé que 25% des hommes de moins de 69 ans ont déjà souffert de dysfonction érectile, alors que cela concerne plus de 61% des plus de 69 ans [148].

1.2.1.2 Physiopathologie :

La dysfonction érectile peut être définie comme une impossibilité persistante d'obtenir ou de maintenir une érection. L'érection du pénis est un phénomène vasculaire qui est contrôlé par trois systèmes neuronaux principaux: systèmes cholinergique, adrénérergique et non-adrénérergique non-cholinergique. L'érection est contrôlée par le système nerveux central ainsi que par les tissus périphériques locaux. Les nerfs sympathiques (défavorisant l'érection) et parasympathiques (favorisant l'érection) régulent le flux sanguin au niveau du pénis [149].

Lorsque le pénis n'est pas en érection, la concentration élevée en calcium à l'intérieur des cellules des muscles caverneux lisses retient les fibres musculaires contractées et prévient ainsi l'engorgement de sang dans le pénis et par conséquent l'érection [148].

En cas de stimulation sexuelle, les principaux transmetteurs libérés au niveau de l'extrémité du nerf caverneux sont l'acétylcholine et l'oxyde nitrique (ou NO, principal effecteur du système non-adrénérergique non-cholinergique). Ces neurotransmetteurs provoquent une augmentation du flux sanguin augmentant alors la pression intracaverneuse et ainsi déclenchant l'érection [150].

1.2.1.3 La voie du NO :

Le NO est un composé majeur qui intervient notamment dans la relaxation des muscles lisses. Le NO est synthétisé à partir de la L-arginine grâce à la NO synthase. Le NO ainsi formé peut se répandre localement aux muscles lisses proches et provoque l'activation de la guanylate cyclase, entraînant ainsi la formation de GMPc (Guanosine MonoPhosphate cyclique). Dans le muscle, le GMPc active des protéines kinases G qui aboutissent in fine à la diminution du taux de calcium dans les muscles lisses [151]. Cette chute du niveau de calcium entraîne l'activation de MLC-phosp (Myosin Light Chain phosphatase), qui active à son tour la MLC (Myosin Light Chain)

par déphosphorylation. La MLC se détache alors des filaments d'actines entraînant la relaxation des muscles lisses, produisant l'érection [152].

1.2.1.4 Traitement actuel disponible :

Les traitements qui ont été développés dans cette indication consistent en l'administration intracaverneuse, transurétrale mais aussi orale d'agents pharmacologiques inhibant la phosphodiesterase 5 (PDE5): sildenafil (Viagra), tadalafil (Cialis), vardenafil (Levitra). La PDE5 a pour rôle de dégrader le GMPc. En inhibant la PDE5, le taux de GMPc augmente, favorisant l'érection.

Ces traitements ont permis une avancée importante dans le traitement de cette pathologie, en revanche ce sont des traitements avec des effets secondaires non négligeables, et ils peuvent être contre indiqués chez de nombreux patients. De ce fait, la découverte de nouveaux composés permettrait d'enrichir l'arsenal thérapeutique actuel et d'améliorer la prise en charge de la dysfonction érectile [148].

1.2.2 Les toxines d'intérêt : PnTx2-6, PnTx2-5 :

1.2.2.1 Observations cliniques :

Certains peptides d'arthropodes (d'araignées et de scorpions) ont montré qu'ils pouvaient provoquer une érection chez l'homme.

Il a été plus particulièrement étudié le venin de l'araignée *Phoneutria nigriventer*, plus communément appelée "araignée du bananier", et retrouvée principalement en Amérique du Sud [147] (plusieurs centaines de cas sont recensés chaque année au Brésil).

Dans les cas de morsures par cette araignée, les symptômes suivants sont décrits: douleur, agitation, nausée, crampe musculaire, salivation, tachycardie, arythmie cardiaque, oedème pulmonaire et priapisme. Le priapisme est défini comme une érection pathologique qui n'est pas reliée ou qui persiste anormalement après une stimulation sexuelle [149].

1.2.2.2 La fraction PhTx2 du venin de *Phoneutria nigriventer* :

Le venin de cette araignée est composée de nombreux composés tels que acides aminés, histamine, sérotonine, enzymes et peptides. Parmi toutes ces molécules extraites du venin, seule une fraction dénommée PhTx2, ciblant les canaux sodiques voltage dépendants, est responsable du priapisme (la fraction seule purifiée administrée à des souris ou des chiens provoquent un priapisme) [149].

Dans cette fraction, les toxines suivantes ont montré qu'elles jouaient un rôle majeur dans l'activité de la fraction:

- La toxine PnTx2-6, ou plus communément appelée Tx2-6 (5287Da). Le terme de "eretina" est également retrouvé pour nommer cette toxine.
- La toxine PnTx2-5, ou Tx2-5 (5116 Da), qui possède une séquence en acide aminé à 89% semblable à Tx2-6 puisque les deux toxines ne diffèrent que par cinq acides aminés [147].

Ces toxines sont des inhibiteurs de l'inactivation rapide des canaux sodiques voltage dépendants de par leur liaison sur le site 3.

Remarque: d'autres études, moins nombreuses, se sont intéressées aux actions d'autres toxines actives sur les canaux sodiques. Des toxines alpha de scorpions ont ainsi également prouvé leur action relaxante sur les tissus caverneux chez des lapins [153]. Cependant de nombreuses autres toxines ciblant également le site 3 des canaux sodiques voltage dépendants ne provoquent pas un priapisme. L'hypothèse retenue propose une différence pharmacocinétique entre ces différentes toxines [148].

1.2.2.3 Pharmacocinétique : distribution des toxines :

Dans une étude menée par Nutes et collaborateurs, Tx2-6 a été radiomarquée par du ^{99m}technetium avant administration sous cutané afin de connaître sa distribution dans l'organisme. Après vingt minutes, la majorité des toxines étaient présentes au niveau du pénis de l'animal.

Toujours d'après des études in vivo radiomarquées (à l'iode 125), les toxines sont ensuite retrouvées en grande quantité au niveau des reins, ce qui suggère une élimination rénale des toxines [147].

1.2.3 Données toxicologiques expérimentales :

Administrée en sous cutané à la dose de 1,5 µg par souris, Tx2-6 provoque une érection chez l'animal après 25 à 30 minutes, mais entraîne sa mort après 50 à 80 minutes. En revanche, à la dose de 0,006 µg/kg par voie intracaverneuse, l'érection est obtenue sans effet secondaire systémique [149].

D'autres études ont été menées afin de mieux caractériser les signes observés chez la souris en fonction de la dose administrée. Ces études ont montré qu'à dose croissante administrée, le priapisme était le premier symptôme observé chez les souris, puis progressivement apparaissaient

piloérection, salivation, tremblements. Une injection intrapéritonéale à la dose de 0,3 µg/kg induisait seulement un priapisme. En revanche, cette étude révèle que la fenêtre thérapeutique est assez étroite, puisque les effets secondaires chez la souris apparaissent pour des doses légèrement plus élevées, ce qui pourrait compromettre ses applications thérapeutiques (dès 1 µg/kg en voie intrapéritonéale, toutes les souris testées présentaient des signes d'hypersalivation et plus de la moitié des animaux était retrouvés morts 24 heures après) [148].

En ce qui concerne le délai et la durée d'action, lors d'une injection intracaverneuse chez la souris à la dose de 1 µg/kg, après 35-45 minutes l'érection était présente chez toutes les souris. L'effet perdurait jusqu'à 120 à 140 minutes après l'injection [152].

1.2.4 Détermination du mécanisme d'action des toxines :

1.2.4.1 Implication de la voie du NO :

Afin de confirmer l'implication de la voie du NO dans le mécanisme d'action toxique de ces toxines, un étude conduite par Yonanime et collaborateurs a été réalisée sur des souris en utilisant des inhibiteurs de la NO synthase (NOS). Un inhibiteur non sélectif de NOS, le Nomega-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (ou L-NAME) ainsi qu'un inhibiteur spécifique des NOS neuronaux (nNOS), le 7-Nitroindazole (7-NI).

Il a été administré la dose de 10 µg de Tx2-5 par souris en voie intrapéritonéale, ce qui est une dose létale pour ces animaux. Cependant, si ces souris étaient prétraitées avec du L-NAME ou du 7-NI, les effets toxiques (érection, salivation, décès) étaient réduits voir absents [153].

Le mécanisme d'action de ces toxines semblent donc passer par la voie du NO, en activant les NOS.

Une autre étude vient également appuyer l'implication de la voie du NO. Villanova et collaborateurs ont analysé les gènes transcrits suite à l'injection de Tx2-6 par voie intracaverneuse [152].

Cette étude a montré que le gène *sparc* était sur-exprimé après injection. Il a été précédemment démontré que ce gène était lié à l'action des protéines kinases G. De plus, il serait également impliqué dans la machinerie intracellulaire interagissant avec le complexe actine-myosine.

Il a été constaté également une sur-expression du gène *ednrb* (endothelin receptor type B) qui est un gène impliqué dans l'augmentation de l'activité des NOS endothéliales [152].

1.2.4.2 Non implication des récepteurs muscariniques :

La fraction entière PhTx2 de *Phoneutria nigriventer* provoque de par l'ensemble des toxines contenues dans cette fraction la libération neuronale de nombreux neurotransmetteurs, dont l'acétylcholine (agissant notamment sur les récepteurs muscariniques).

Pourtant, si la voie du NO semble impliquée dans le mécanisme des toxines Tx2-5 et Tx2-6, les récepteurs muscariniques, autre grande voie aboutissant à l'érection, ne semble pas intervenir.

En effet, dans une étude menée par Nunes et collaborateurs sur un système isolé utilisant des bandes de tissus caverneux de rats, l'atropine (bloquant les récepteurs muscariniques) n'altérerait pas la faculté de Tx2-6 de potentialiser la relaxation des muscles initiée par stimulation électrique [147].

1.2.4.3 Importance des canaux calciques :

Dans la même étude et selon le même protocole, la présence de l'omega-conotoxine GVIA (peptide issu du venin de cône mais bloquant les canaux calciques de type N) diminuait fortement l'action de la Tx2-6. Les canaux calciques jouent donc un rôle essentiel dans la cascade d'évènements déclenchés par l'inactivation des canaux sodiques voltage dépendants [147].

1.2.4.4 Indépendance des PDE5 :

Le mécanisme de Tx2-6 ne semble pas faire intervenir les PDE5, cible des traitements actuels. En effet, l'utilisation conjointe de sildenafil et de Tx2-6 provoque une plus forte augmentation de la relaxation des muscles lisses, par rapport à la relaxation obtenue avec l'administration d'un seul de ces composés [147].

Ceci pourrait être un avantage dans le cas du développement d'un médicament dérivé de Tx2-6, puisqu'il agirait sur une autre cible que les traitements actuellement disponibles.

1.2.4.5 Mécanisme d'action actuellement proposé pour ces toxines :

Les toxines activent les canaux sodiques voltage dépendants présents au niveau des cellules nerveuses du pénis en ralentissant l'inactivation rapide de ces canaux, ce qui provoque une dépolarisation prolongée de la membrane. Ce phénomène entraîne un influx entrant de calcium dans le neurone via les canaux calciques de type N. Cet influx active la production de NO via l'activation des nNOS. Le NO est libéré et se répand dans les muscles lisses. La voie du NO est ainsi enclenchée, le taux de GMPc augmente et l'érection apparaît chez l'animal.

1.2.4.6 Action au niveau périphérique et/ou central :

L'action des toxines au niveau du système nerveux central en plus du niveau local est encore en débat. En effet, les voies du NO sont présentes au niveau du pénis, mais également au niveau du cerveau, dans les régions impliquées dans les mécanismes de l'érection. De plus, selon certaines données, ces toxines pourraient passer la barrière hémato-encéphalique (même si les études sont contradictoires) [153] [147].

Les toxines agiraient donc au niveau périphérique directement sur le pénis, mais également peut être via le système nerveux central.

1.2.5 Etudes sur des groupes d'animaux souffrant de dysfonction érectile :

1.2.5.1 Les sujets âgés :

Les personnes âgées sont plus particulièrement touchées par la dysfonction érectile, notamment à cause de la modification de l'angioarchitecture caverneuse associée à une diminution de la production de NO.

Afin de vérifier l'efficacité de Tx2-6 sur cette population particulière, la toxine a été injectée chez des rats jeunes (14 semaines) et des rats âgés (70 semaines). Il a été montré que l'activité de la NOS est augmentée chez les sujets jeunes, mais également chez les rats âgés [154].

1.2.5.2 Les sujets diabétiques :

Les mécanismes de la dysfonction érectile chez les patients diabétiques sont la plupart du temps multifactoriels et conduisent parfois à la résistance au traitement actuel. Aux Etats unis, la prévalence des patients diabétiques atteints de dysfonction érectile est de 28%, alors qu'elle n'est que de 9,6% dans la population générale. La dysfonction de la voie du NO semble particulièrement mise en cause chez ces patients.

De ce fait, des études conduites sur des souris diabétiques ont donc été mises en place afin de tester l'efficacité de Tx2-6 pour cette population particulière. Il a été montré que la toxine favorisait la voie du NO et produisait une érection [150].

1.2.5.3 Les sujets souffrant d'hypertension artérielle :

De la même manière, l'activité de la toxine a également été confirmée sur une population de rats hypertendus. Les animaux étaient précédemment traités par DOCA (DeOxyCorticosterone Acetate, un minéralocorticoïde) associé à un régime salé.

L'atténuation de la fonction érectile chez ces animaux était pleinement restaurée après injection de Tx2-6 via la voie du NO [151].

1.2.6 Synthèse des toxines :

De par la faible quantité de peptides purs pouvant être obtenus par extraction du venin de *Phoneutria*, il a été rendu nécessaire de trouver une voie d'obtention d'une plus grande quantité de toxines et à faible coût. La synthèse de ces peptides a donc été développée afin de pouvoir mieux les étudier et pourquoi pas envisager l'étude et la production de peptides dérivés potentiels utilisés en tant qu'agents thérapeutiques.

Ce sont donc des toxines peptidiques composées d'une seule chaîne d'acides aminés, et contenant dix résidus cystéines. Comme toutes les toxines d'araignées, elles sont traduites dans un premier temps sous forme de prépropeptides: le précurseur doit alors être clivé *in vivo* afin de libérer le peptide fonctionnel actif.

La voie de synthèse proposée par Torres et collaborateurs [149], consiste à produire des toxines recombinantes grâce à la culture d'*Escherichia coli*. La région codante pour le peptide fonctionnel Tx2-6 (et non pas le gène du prepropeptide, puisque *E. coli* ne possède pas les enzymes nécessaires au clivage) est inséré dans le génome de la bactérie, en utilisant la thioredoxine en produit de fusion. D'autres systèmes d'expression recombinant ont également été utilisés pour la production de ces peptides, comme pET32.

Le peptide recombinant obtenu possède alors la même structure que la toxine d'araignée, et possède également les mêmes propriétés pharmacologiques et la même toxicité chez les animaux. Ces observations permettent d'affirmer que les toxines sont correctement repliées et possèdent donc la conformation biologiquement active du peptide: les ponts disulfures, essentiels à l'activité de la toxine, sont correctement formés pour produire le motif ICK.

1.2.7 Conclusion :

Les toxines ciblant les canaux sodiques voltage dépendants extraits de *Phoneutria nigriventer* ont donc permis de connaître davantage les mécanismes impliqués dans l'érection. De plus en plus d'études paraissent sur ce sujet et leur mécanisme d'action est de mieux en mieux compris.

En plus d'être des outils pharmacologiques intéressants de compréhension physiopathologiques, ces toxines pourraient servir de modèle afin de développer des dérivés, pouvant potentiellement prétendre à faire partie de l'arsenal thérapeutique dans le traitement de la dysfonction érectile chez l'homme.

2) Les toxines sodiques insecticides :

Les insecticides ont un large domaine d'applications puisqu'ils permettent de lutter contre de nombreux parasites phytophages et hématophages, et sont ainsi largement utilisés dans le milieu agro-industriel, pour traiter les animaux de compagnie mais également employés pour des objectifs de santé publique face à des pathologies transmises par les insectes. Le développement de toxines insecticides semble donc être un enjeu de recherche intéressant au vu des applications potentielles.

2.1 Les canaux sodiques d'insectes :

A ce jour, 18 gènes codant pour des canaux sodiques d'insectes ont été isolés [15]. Le premier gène découvert fût le gène para isolé par l'équipe de Barry Ganetzky en 1989. Plus récemment, MdNav1 chez la mouche *Musca domestica* et BgNav1 chez la blatte *Blattella germanica* ont été identifiés. D'autres protéines ont auparavant été classées comme canaux sodiques d'insectes de par leur homologie génétique et structurale, tels que DSC1 et BSC1, mais il a ensuite été montré qu'il s'agissait de canaux calciques. Les canaux sodiques peuvent posséder des caractéristiques biophysiques différentes selon le type de tissu ou de cellules (des courants sodiques aux propriétés distinctes sont ainsi retrouvés). Ce phénomène est dû, entre autres, à l'étape d'épissage et aux mécanismes de modifications post transcriptionnels [155].

Les canaux sodiques d'insectes sont associés à une petite protéine transmembranaire de 65 kDa: TipE. Celle ci est une protéine dont la fonction est proche de celle des sous unités beta de mammifères (variation de l'amplitude du courant généré, modification des cinétiques du canal....).

Comme vu précédemment, les canaux d'insectes possèdent un haut degré de similarité structurale avec les canaux sodiques de mammifères (le gène para partage entre 50 et 60% d'homologie avec les différents types de canaux humains [15]). Ceci est problématique puisque les insecticides développés doivent être sélectifs des canaux d'insectes vis à vis de ceux des mammifères afin de minimiser les impacts écologiques et sur la santé publique.

2.2 Les insecticides actuels :

Les pyréthrine, molécules extraites des fleurs des espèces de *Chrysanthemum*, sont des insecticides naturels agissant sur les canaux sodiques voltage dépendants. Elles ont servi de modèle structurel afin de concevoir des insecticides synthétiques, tels que le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) et les pyréthriinoïdes. D'autres composés ont également le même mécanisme d'action, comme les oxadiazines, les N-alkylamines, ou encore les dihydropyrazoles [123].

2.2.1 Les pyréthriinoïdes :

Les pyrethriinoïdes agissent en inhibant l'inactivation du canal et en stabilisant sa position ouverte [156]. Les pyréthriinoïdes sont classés en deux catégories selon leur symptomatologie d'intoxication et leur structure chimique. Les pyréthriinoïdes de type 2 possèdent un groupement chimique alpha-cyano présent sur l'alcool phénylbenzyl, ce qui n'est pas le cas des pyréthriinoïdes de type 1 [155].

L'intoxication par les pyréthriinoïdes de type 1 entraîne un tremblement généralisé, des convulsions, voir un coma et décès en cas de forte dose (on parle de syndrome T, pour "Trevor"). En cas d'intoxication avec des pyréthriinoïdes de type 2, les symptômes observés seront salivation, mouvements brusques et convulsions progressives (on parle dans ce cas de syndrome CS pour "Choreoathetosis and Salivation". Cette classification reste malgré tout imparfaite et la distinction entre les deux types n'est pas si nette [157].

Suivant les différents variants des canaux sodiques d'insectes, les pyréthriinoïdes n'ont pas la même efficacité. Par exemple chez les blattes, le canal BgNav2-1 est 100 fois moins sensible à la deltaméthrine que BgNav1-1 [155].

De même chez les mammifères, les canaux sodiques TTX-R (notamment Nav1.8) sont plus sensibles à l'action des pyréthriinoïdes que les canaux TTX-S. Cependant chez les mammifères, les pyréthriinoïdes possèdent souvent une toxicité aiguë faible à modérée compte tenu d'une absorption relativement peu importante selon les voies d'intoxication et une métabolisation rapide.

2.2.2 Les oxadiazines avec l'indoxacarbe :

L'indoxacarbe est métabolisé chez les insectes en un métabolite toxique (le DCJW), alors que chez les mammifères, il est transformé en métabolites non toxiques (ce qui permet la sélectivité recherchée) [155].

2.3 La résistance aux insecticides :

Suite à l'usage abusif des insecticides, de nombreuses résistances sont apparues chez les insectes. Les premières résistances aux insecticides ont été observées dès le début des années 1950 après leur utilisation massive dans les années 1940 [158]. Le mécanisme de résistance le plus connu est le kdr (pour "knock down resistance") qui diminue la sensibilité des insectes au DDT et aux pyréthriinoïdes grâce à une ou plusieurs mutations génétiques du canal sodique de ces insectes. Actuellement, plus de dix points de mutations ont été identifiés. La plus fréquente de ces mutations est le remplacement de la leucine sur le segment 6 du domaine II par une phénylalanine, une

histidine ou une sérine, qui réduirait de 5 à 10 fois selon les types de canaux la sensibilité aux pyréthriinoïdes. De plus, des mutations dites "super kdr" ont été identifiées, donnant naissance à des souches très résistantes aux insecticides (comme la mutation d'une méthionine en thréonine sur la boucle reliant les segments 4 et 5 du domaine II) [155].

Ainsi, les insectes sont de plus en plus résistants aux insecticides employés à l'heure actuelle. La découverte de nouveaux insecticides possédant un mécanisme d'action différent permettrait alors une lutte plus efficace.

En plus des mécanismes de résistance, la découverte de nouveaux insecticides est devenue nécessaire suite au bannissement de certains insecticides employés jusque là, tels que le DDT ou les organophosphates. L'objectif est de découvrir des molécules plus actives biologiquement sur les insectes, tout en limitant leur impact sur l'environnement et leur toxicité sur les mammifères [126].

Le canal sodique est une cible intéressante puisqu'il est présent ubiquitairement chez tous les insectes, ce qui permet d'obtenir un large spectre d'action potentiel. De plus, de par la présence de plusieurs sites d'interactions sur le canal, il serait possible de mettre au point différentes molécules ne possédant pas de résistance croisée.

Ainsi nous nous intéresserons aux toxines ciblant les canaux sodiques d'insectes, mais liant des sites d'interactions autres que les pyréthriinoïdes afin de contourner les mécanismes de résistance actuels (les principaux sites concernés seront les sites 1, 3 et 4).

2.4 Les études réalisées sur ces toxines :

La sélectivité envers les insectes est avant tout explorée par le biais de tests in vivo par injection de la toxine sur des insectes et des mammifères (principalement rats, souris...). De nombreuses espèces d'insectes peuvent être étudiées, mais les travaux se portent plus particulièrement sur certains insectes d'intérêts tels que les mouches ou les moustiques (en vue d'applications biomédicales) ou les larves de Tobacco budworm (en vue d'applications agro-industrielles) [126].

Les résultats sont données selon différentes unités: en PD50 (dose paralysant 50% des insectes testés), LD50 (dose tuant 50% des insectes testés), ou CPU (unités paralysant ou contractant 50% des individus). Ces différentes mesures rendent très difficile la comparaison entre les différentes études publiées.

2.5 Les toxines d'intérêt :

2.5.1 Les toxines d'araignées :

Parmi les toxines retrouvées chez les araignées, certaines sont plus sélectives des canaux d'insectes et semblent être prometteuses.

L'Hainantoxine I est une toxine ciblant le site 1, et elle est 15 fois plus active sur les canaux d'insectes que sur le canal Nav1.2 de rat [15].

Concernant le site 3, les toxines intéressantes semblent être Magi2 (paralysant les insectes sans toxicité sur les mammifères) et Tx4(6-1) qui n'interfère pas avec les cinétiques de Nav1.2 et Nav1.4 de mammifères.

Enfin, certaines toxines ciblant le site 4 sont également étudiées: les delta palutoxines (n'ayant pas d'effet sur Nav1.2 même à 10microM), les micro-agatoxines et les curtatoxines (neurotoxines entraînant une paralysie convulsive sélective sur les insectes) [126].

2.5.2 Les toxines de scorpions :

Il a été découvert de nombreuses toxines hautement sélectives des insectes chez les scorpions, et les toxines alpha comme beta peuvent être des toxines intéressantes comme insecticides (les toxines dites "alpha like", actives sur les insectes et les mammifères n'ont ici aucun intérêt) [14].

Parmi les toxines alpha, liant le site 3, on peut citer entre autres LqhαIT ou BotIT1 parmi les plus étudiées.

Parmi les toxines beta de scorpions liant le site 4, AahIT semble être très prometteuse et est utilisée dans de nombreux travaux [126].

2.5.3 Les toxines d'anémone de mer :

Enfin, certaines toxines d'anémones de mer sont également sélectives vis à vis des insectes. Ainsi, ATX-I, Sh-I ou encore Av3 liant le site 3 des canaux sodiques pourraient également trouver une application en tant qu'insecticides.

Certaines études ont même montrer la synergie d'action entre le DDT et la toxine ATX-II [74].

2.6 Stratégies d'utilisation :

Trois principales stratégies sont envisagées à l'heure actuelle pour l'utilisation de ces toxines.

2.6.1 Les baculovirus recombinants :

La première stratégie consiste à insérer le gène de la toxine sur des parties non essentielles du génome d'un baculovirus. Les baculovirus sont des virus naturellement sélectifs des insectes, incapables d'infecter les plantes ou les mammifères. En insérant le gène d'une toxine, le temps nécessaire à la mort de l'insecte est diminué (environ 50% plus rapide selon les études) et son potentiel pesticide est augmenté [123].

Des expériences ont été menées en utilisant le baculovirus *Autographa californica*. La première toxine sélective d'insecte à avoir été insérée et à obtenir des résultats satisfaisants fut AahIT en 1971 (la rapidité d'action était augmentée de 40% et les dommages subis par la récolte étaient diminués de 60% [126]). Depuis, de nombreuses toxines de scorpions d'araignées et d'anémones de mer ont été testées.

La principale difficulté de cette technique est d'obtenir une toxine parfaitement repliée et donc active. Les toxines les plus prometteuses dans cette application seraient donc des toxines de petite taille et possédant le motif structural ICK conférant à la toxine une plus grande stabilité (les toxines d'araignées sont principalement indiquées dans cette méthodologie).

Cette méthode est cependant limitée par des problématiques techniques mais également économiques pour la production commerciale à grande échelle. De nombreux travaux sont encore nécessaires afin de considérer les baculovirus recombinants comme alternative aux insecticides actuels [14].

2.6.2 Les plantes transgéniques :

La seconde stratégie consiste à inclure le gène de la toxine directement dans la plante d'intérêt pour les applications agricoles visant les insectes phytophages. Des plantes transgéniques sont alors créées, leur permettant ainsi d'être toxiques vis à vis de leurs prédateurs. Cette technique fut employée dès le milieu des années 1980 [126].

Une étude a été mis en place en incorporant le gène de la toxine de scorpion ButaIT dans la levure *Pichia pastoris*. Les larves d'insectes (notamment *Lacanobia oleracea*) nourries par ces levures étaient alors intoxiquées. Une autre étude utilisant le gène de BmK IT dans la plante *Brassica napus* a aussi montré que la plante transgénique était alors résistante aux attaques d'insectes [123].

Cependant, cette technique semble difficile à généraliser, de par les difficultés biotechnologiques d'introgession de gène étranger à la plante et également de par l'opinion publique globalement négative sur les plants transgéniques. De plus l'utilisation de cette technique requiert que la toxine soit toxique par voie orale, ce qui n'est pas le cas de toutes les toxines.

Des modèles ont également montré l'intérêt d'associer ces deux techniques (baculovirus et plantes transgéniques) afin d'avoir un effet synergique.

2.6.3 Mise au point de dérivés synthétiques :

La troisième méthode consiste à étudier les relations structure-activité et à utiliser la structure de la toxine comme modèle afin de concevoir de nouveaux insecticides chimiques. Cependant, cette approche n'est pas très avancée à l'heure actuelle du fait que les résidus impliqués dans l'interaction canal-toxine qui permettent la sélectivité entre les insectes et les mammifères sont encore très peu connus [123].

2.7. Conclusion :

Même si la possibilité d'utiliser des toxines pour permettre l'avancée des recherches sur les insecticides semble intéressante, il reste encore beaucoup de travaux à mener afin de concrétiser cette idée.

Il est à noter qu'en parallèle, les toxines ciblant les canaux potassiques et calciques voltage dépendants sont également en cours d'études dans cette même indication [123].

CONCLUSION

Les neurotoxines sont des entités naturelles pouvant modifier profondément l'activité de nos cellules neuronales. Ces toxines peuvent cibler différentes protéines présentes à la surface membranaire des cellules neuronales, dont les canaux ioniques. En initiant le processus de dépolarisation membranaire responsable de la création d'un potentiel d'action, les canaux sodiques voltage dépendants sont donc une cible de choix pour ces neurotoxines.

Les toxines ciblant les canaux sodiques voltage dépendants proviennent de tout horizon. Elles sont en effet produites par de nombreux organismes très différents: bactéries, végétaux ou animaux, autant en milieu terrestre qu'aquatique. En plus d'être des armes redoutables autant en défense envers les prédateurs qu'en attaque pour capturer des proies, ces toxines possèdent également de nombreux autres rôles chez ces organismes (outils de signalisation, contrôle de l'osmolalité...). Ces toxines se distinguent également par leur structure chimique: ce sont de petites molécules liposolubles ou hydrosolubles, des polyethers cycliques ou encore des structures peptidiques. Enfin, même si elles ciblent toutes les canaux sodiques voltage dépendants, elles possèdent chacune un mécanisme d'action distinct en ciblant divers sites d'interaction, impliquant chacun des résidus différents. Les modifications engendrées par la liaison au canal peuvent ainsi être très variées, puisqu'elles peuvent modifier les processus d'activation et/ou d'inactivation du canal, mais également la sélectivité ionique ainsi que l'intensité de conduction sodique, en fonction des toxines concernées.

Pour plusieurs raisons, ces toxines sont l'objet d'études à l'heure actuelle et encore de nombreuses données restent encore à être collectées. Ces toxines sont responsables d'un grand nombre d'intoxications autour du monde, et les moyens de prévention et de traitement restent encore limités. Cependant, elles sont surtout étudiées de par le fait que ce sont de véritables outils de compréhension du canal, permettant d'enrichir les connaissances actuelles sur la structure, les caractéristiques et les rôles de ce canal en pathologie humaine. En plus d'apporter de nouvelles

connaissances théoriques, ces toxines peuvent également être la clé de découvertes de nouveaux moyens thérapeutiques. Les canaux sodiques voltage dépendants jouent un rôle déterminant dans les mécanismes de la douleur, et il paraît envisageable de s'appuyer sur ces toxines afin de mettre au point de nouveaux antalgiques aux propriétés pharmacodynamiques nouvelles. Les bénéfices des recherches pourraient également s'étendre dans d'autres domaines, dans d'autres pathologies humaines impliquant ces canaux (comme la dysfonction érectile chez l'homme), mais également dans le milieu industriel et dans le cadre de la santé publique pour la lutte contre les insectes nuisibles (de par les propriétés sélectives de certaines toxines envers les canaux sodiques d'insectes).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Stevens M, Peigneur S, Tytgat J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Front Pharmacol.* 2011; 2 (71) : 1-13.
- [2] Catterall WA. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J Physiol* 2012; 590 (11) : 2577-89.
- [3] Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology* 2003 ; 207(4).
- [4] Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacol Rev* 2005 ; 57 (4): 397-409.
- [5] Catterall WA. From Ionic Currents to Molecular Review Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* 2000 ; 26 : 13–25.
- [6] Knapp O, McArthur JR, Adams DJ. Conotoxins Targeting Neuronal Voltage-Gated Sodium Channel Subtypes: Potential Analgesics? *Toxins* 2012 ; 4 : 1236-60.
- [7] Savio-Galimberti E, Gollob MH, Darbar D. Voltage-gated sodium channels: biophysics, pharmacology, and related channelopathies. *Front Pharmacol.* 2012 ; 3 (124) : 1-13.
- [8] Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Sodium Channels. *Pharmacol Rev* 2003 ; 55 (4) : 575-8.
- [9] Koopmann TT, Bezzina CR, Wilde AM. Voltage-gated sodium channels: Action players with many faces. *Annals of Medicine* 2006 ; 38 : 472–82.
- [10] Watanabe E, Fujikawa A, Matsunaga H, Yasoshima Y, Sako N, Yamamoto T et al. Nav2/NaG Channel Is Involved in Control of Salt-Intake Behavior in the CNS. *The Journal of Neuroscience* 2000 ; 20 (20) : 7743–51.
- [11] Motoike HK, Liu H, Glaaser IW, Yang AS, Tateyama M, Kass RS. The Na Channel Inactivation Gate Is a Molecular Complex: A Novel Role of the COOH-terminal Domain. *J. Gen. Physiol* 2004 ; 123 : 155-65.
- [12] Cestele S, Catterall WA. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 2000 ; 82 : 883-92.
- [13] Wang SA, Wang GK. Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins. *Cellular Signalling* 2003 ; 15 : 151–9.

- [14] Bosmans F, Tytgat J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha toxins. *Toxicon* 2007 ; 49(2) : 142–58.
- [15] King GF, Escoubas P, Nicholson GM. Peptide toxins that selectively target insect NaV and CaV channels. *Channels* 2008 ; 2(2) : 100-16.
- [16] Chateau-Degat ML, Beuter A, Vauterin G, Nguyen NL, Chinain M, Darius T et al. Neurologic signs of ciguatera disease: evidence of their persistence. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2007 ; 77(6) : 1170-5.
- [17] Chau R, Kalaitzis JA, Neilan BA. On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin. *Aquatic Toxicology* 2011 ; 104 : 61–72.
- [18] Hanifin CT. The Chemical and Evolutionary Ecology of Tetrodotoxin (TTX) Toxicity in Terrestrial Vertebrates. *Mar Drugs* 2010 ; 8 : 577-93.
- [19] Diagana M, Druet-Cabanac M, Traore H, Preux PM. Manifestations neurologiques des intoxications par les poissons, mollusques et crustacés. *Rev Neurol* 2003 ; 159 (5) : 512-7.
- [20] Williams BL. Behavioral and Chemical Ecology of Marine Organisms with Respect to Tetrodotoxin. *Mar Drugs* 2010 ; 8 : 381-98.
- [21] Chau J, Ciufolini MA. The Chemical Synthesis of Tetrodotoxin: An Ongoing Quest. *Mar Drugs* 2011 ; 9 : 2046-74.
- [22] French RJ, Yoshikami D, Sheets MF, Olivera BM. The Tetrodotoxin Receptor of Voltage-Gated Sodium Channels-Perspectives from Interactions with μ -Conotoxins. *Mar Drugs* 2010 ; 8 : 2153-61.
- [23] Lee CH, Ruben PC. Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, Tetrodotoxin. *Channels* 2008 ; 2(6) : 407-12.
- [24] Derby CD, Agio JF. The Neuroecology of Chemical Defenses. *Integrative and Comparative Biology* 2011 ; 51(5) : 771–80
- [25] Zimmer T. Effects of Tetrodotoxin on the Mammalian Cardiovascular System. *Mar Drugs* 2010 ; 8 : 741-62.
- [26] Geistdoerfer P, Goyffon M. Animaux aquatiques dangereux. In : *Encyclo Méd Chir*, [Article 16-078, C-10], 2004.
- [27] Wiese M, D'Agostino PM, Mihali TK, Moffitt MC, Neilan BA. Neurotoxic Alkaloids : Saxitoxin and Its Analogs. *Mar Drugs* 2010 ; 8 : 2185-211.
- [28] Campbell K, Rawn DFK, Niedzwiadek B, Elliott CT. Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin binders for optical biosensor technology: problems and possibilities for the future: a review. *Food Additives and Contaminants* 2011 ; 28(6) : 711–25.
- [29] Llewellyn LE. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Na. Prod Rep* 2006 ; 23 : 200–22.

- [30] Rapala J, Robertson A, Negri AP, Berg KA, Tuomi P, Lyra C et al. First Report of Saxitoxin in Finnish Lakes and Possible Associated Effects on Human Health. Wiley InterScience. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.20109/pdf>, consulté le 01/08/2013.
- [31] Dittmann E, Fewer DP, Neilan BA. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiol Rev* 2012 ; 37 (2013) : 23–43.
- [32] Pearson L, Mihali T, Moffitt M, Kellmann R, Neilan B. On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. *Mar. Drugs* 2010 ; 8 : 1650-80.
- [33] Institut de veille sanitaire. Guide pour l'investigation épidémiologique, Saxitoxine 2001. http://www.invs.sante.fr/publications/guides_biotox/guide_saxitoxine.pdf, consulté le 01/08/13.
- [34] Ministère de la santé et des solidarités. Bioterrorisme et mesures environnementales en milieu de soins 2006. http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/fiches_bioterrorisme.pdf, consulté le 01/08/13.
- [35] Friedman M, Fleming LE, Fernandez M, Bienfang P, Schrank K, Dickey R et al. Ciguatera fish poisoning: treatment, prevention and management. *Mar drugs* 2008 ; 6 : 456-79.
- [36] Slobbe L, Van Genderen PJJ, Wismans PJ. Two patients with ciguatera toxicity: a seafood poisoning in travellers to (sub)tropical areas. *The netherlands journal of medicine* 2008 ; 66(9) : 389-91.
- [37] Masayuki I, Miyazaki K, Hisatoshi U, Maruyama M, Hirama M. First and second generation total synthesis of ciguatoxin CTX3C. *PNAS* 2004 ; 101 (33) : 12013-8.
- [38] Develoux M, Le Loup G, Pialoux G. A case of ciguatera fish poisoning in a french traveler. *Eurosurveillance* 2008 ; 13 (45) : 1-2.
- [39] Winter FD. Ciguatera poisoning: an unwelcome vacation experience. *Proc (bayl univ med cent)* 2009 ; 22(2) : 142-3.
- [40] Parsons ML, Settlemier CJ, Ballauer JM. An examination of the epiphytic nature of *Gambierdiscus toxicus*, a dinoflagellate involved in ciguatera fish poisoning. *Harmful algae* 2011 ; 10(6) : 598-605.
- [41] Goater S, Derne B, Weinstein P. Critical issues in the development of health information systems in supporting environmental health: a case study of ciguatera. *Environmental Health Perspectives* 2011 ; 119 (5) : 585-589.
- [42] Ghiaroni V, Fuwa H, Inoue M, Sasaki M, Miyazaki K, Hirama M et al. Effect of ciguatoxin 3C on voltage-gated Na⁺ and K⁺ currents in mouse taste cells. *Chem. Senses* 2006 ; 31 : 673-80.
- [43] Senthilkumaran S, Meenakshisundaram R, Michaels AD, Suresh P, Thirumalaikolundusubramanian P. Cardiovascular complications in ciguatera fish poisoning: a wake up call. *Heart views* 2011 ; 12(4) : 166-8.
- [44] Mak YL, Wu JJ, Chan WH, Murphy MB, Lam JCW, Chan LL et al. Simultaneous quantification of Pacific ciguatoxins in fish blood using liquid chromatography tandem mass

spectrometry. *Anal bioanal chem* 2013 ; 405 : 3331-40.

[45] Darius HT, Drescher O, Ponton D, Pawlowicz R, Laurent D, Dewailly E et al. Use of folks tests to detect ciguateric fish: a scientific evaluation of their effectiveness in Raivavae Island (Australes, French Polynesia). *Food additives contaminants* 2013 ; 30 (3) : 550-66.

[46] Radwan FFY, Wang Z, Ramsdell JS. Identification of a Rapid Detoxification Mechanism for Brevetoxin in Rats. *Toxicological Sciences* 2005 ; 85 : 839–46.

[47] Watkins SM, Reich A, Fleming LE, Hammond R. Neurotoxic Shellfish Poisoning. *Mar. Drugs* 2008 ; 6 : 431-55.

[48] Hitchcock GL, Fourqurean JW, Drake JL, Mead RN, Heil CA. Brevetoxin persistence in sediments and seagrass epiphytes of east Florida coastal waters. *Harmful Algae* 2012 ; 13 : 89–94.

[49] Naar JP, Flewelling LJ, Lenzia A, Abbott JP, Granholm A, Jacocks HM et al. Brevetoxins, like ciguatoxins, are potent ichthyotoxic neurotoxins that accumulate in fish. *Toxicon* 2007 ; 50(5) : 707–23.

[50] Mendoza WG, Meadb RN, Brandc LE, Shead D. Determination of brevetoxin in recent marine sediments. *Chemosphere* 2008 ; 73(8) : 1373–7.

[51] Crimmins MT, Zuccarello JL, Ellis JM, McDougall PJ, Haile PA, Parrish JD et al. Total Synthesis of Brevetoxin A. *Org Lett.* 2009 ; 11(2) : 489–92.

[52] Baden DG, Bourdelais AJ, Jacocks H, Michelliza S, Naar J. Natural and Derivative Brevetoxins: Historical Background, Multiplicity, and Effects. *Environmental Health Perspectives* 2005 ; 113(5) : 621-5.

[53] Errera RM, Campbell L. Osmotic stress triggers toxin production by the dinoflagellate *Karenia brevis*. *PNAS* 2011 ; 108 (26) : 10597–601.

[54] Guo F, An T, Rein KS. Human metabolites of brevetoxin PbTx-2: Identification and confirmation of structure. *Toxicon* 2010 ; 56(4) : 648–51.

[55] Abraham WM, Bourdelais AJ, Ahmed A, Serebriakov I, Baden DG. Effects of Inhaled Brevetoxins in Allergic Airways: Toxin–Allergen Interactions and Pharmacologic Intervention. *Environmental Health Perspectives* 2005 ; 113 (5) : 632-7.

[56] Benson JM, Hahn FF, March TH, McDonald JD, Gomez AP, Sopori MJ. Inhalation Toxicity of Brevetoxin 3 in Rats Exposed for Twenty-Two Days. *Environmental Health Perspectives* 2005 ; 113 (5) : 626-31.

[57] Benson JM , Wolf ML, Kajon A ,Tibbetts BM, Bourdelais AJ ,Baden DG et al. Brevetoxin Inhalation Alters the Pulmonary Response to Influenza A in the Male F344 Rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 2011 ; 74 : 313–24.

[58] Fleming LE, Bean JA, Kirkpatrick B, Cheng YS, Pierce R, Naar J, et al. Exposure and Effect Assessment of Aerosolized Red Tide Toxins (Brevetoxins) and Asthma. *Environmental Health Perspectives* 2009 ; 117 (7) : 1095-100.

- [59] Bourdelais AJ, Campbell S, Jacocks H, Naar J, Wright JLC, Carsi J et al. Brevenal Is a Natural Inhibitor of Brevetoxin Action in Sodium Channel Receptor Binding Assays. *Cell Mol Neurobiol* 2004 ; 24(4) : 553–63.
- [60] Favreau P. Le venin de cônes: source de nouveaux outils pour l'étude de récepteurs et canaux ioniques. *Annales de l'institut pasteur actualités* 1999 ; 10 (2) : 273-84.
- [61] Terlau H, Olivera BM. Conus Venoms: A Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides. *Physiol Rev* 2004 ;84 : 41–68.
- [62] Lewis RJ, Dutertre S, Vetter I, MacDonald JC. Conus Venom Peptide Pharmacology. *Pharmacol Rev* 2012 ; 64 : 259–98.
- [63] Jacob RB, McDougal OM. The M-superfamily of conotoxins: a review. *Cell Mol Life Sci*. 2010 ; 67(1) : 17–27.
- [64] Olivera BM. Conus Peptides: Biodiversity-based Discovery and Exogenomics. *J. Biol. Chem.* 2006 ; 281 : 31173-7.
- [65] Chen R, Chung SH. Binding modes of μ -conotoxin to the bacterial sodium channel (NavAb). *Biophysical Journal* 2012 ; 102 : 483-8.
- [66] Li RA, Tomaselli GF. Using the deadly μ -conotoxins as probes of voltage-gated sodium channels. *Toxicon* 2004 ; 44(2) : 117–22.
- [67] Schroeder CI, Adams D, Thomas L, Alewood PF, Lewis RJ. N- and C-Terminal Extensions of μ -Conotoxins Increase Potency and Selectivity for Neuronal Sodium Channels. *Pept Sci* 2012 ; 98 : 161–5.
- [68] Becker S, Terlau H. Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008 ; 79 : 1–9.
- [69] Khoo KK, Gupta K, Green BR, Zhang MM, Watkins M, Olivera BM et al. Distinct Disulfide Isomers of μ -Conotoxins KIIIA and KIIIB Block Voltage-Gated Sodium Channels. *Biochemistry* 2012 ; 51 : 9826–35.
- [70] Frazão B, Vasconcelos V, Antunes A. Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: An Overview. *Mar. Drugs* 2012 ; 10 : 1812-51.
- [71] Rachamim T, Sher D. What Hydra can teach us about chemical ecology, how a simple, soft organism survives in a hostile aqueous environment. *Int. J. Dev. Biol* 2012 ; 56 : 605-11.
- [72] Moran Y, Gordon D, Gurevitz M. Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels, molecular and evolutionary features. *Toxicon* 2009 ; 54(8) : 1089–101.
- [73] Urbarova I, Karlsen BO, Okkenhaug S, Seternes OM, Johansen SD, Emblem A. Digital marine bioprospecting: mining new neurotoxin drug candidates from the transcriptomes of cold water sea anemones. *Mar. Drugs* 2012 ; 10 : 2265-79.

- [74] Bosmans F, Tytgat J. Sea anemone venom as a source of insecticidal peptides acting on voltage-gated Na⁺ channels. *Toxicon* 2007 ; 49(4) : 550–60.
- [75] Groome JR, Lehmann-Horn F, Holzherr BD. Open- and closed-state fast inactivation in sodium channels, differential effects of a site-3 anemone toxin. *Channels* 2011 ; 5(1) : 65-78.
- [76] Grobosch T, Binscheck T, Martens F, Lampe D. Accidental Intoxication with *Veratrum album*. *Journal of Analytical Toxicology* 2008 ; 32 : 768-73.
- [77] Yoshinaka-Niitsu A, Yamagaki T, Harada M, Tachibana K. Solution NMR analysis of the binding mechanism of DIVS6 model peptides of voltage-gated sodium channels and the lipid soluble alkaloid veratridine. *Bioorganic medicinal chemistry* 2012 ; 20 (9) : 2796-802.
- [78] Ulbricht W. Effects of veratridine on sodium currents and fluxes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1998 ; 133 : 1-54.
- [79] Barnes S, Hille B. Veratridine Modifies Open Sodium Channels. *J. Gen. Physiol.* 1988 ; 91 : 421-43.
- [80] Fekete A, Franklin L, Ikemoto T, Rozsa B, Lendvai B, Vizi ES et al. Mechanism of the persistent sodium current activator veratridine-evoked Ca²⁺ elevation: implication for epilepsy. *J.neurochem.* 2009 ; 111 : 745-56.
- [81] McKinney LC, Chakraverty S, De Weer P. Purification, Solubility and pKa of veratridine. *Analytical biochemistry* 1986 ; 153 : 33-8.
- [82] Gaillard Y, Cheze M, Pépin G. Intoxications humaines par les végétaux supérieurs : revue de la littérature. *Annales de Biologie Clinique* 2001 ; 59 (6) : 764-5.
- [83] Ye X, Wang Y, Yang M, Wang Q, Liang Q, Ma Z et al. Investigating the in vitro metabolism of veratridine: characterization of metabolites and involved cytochrome P450 isoforms. *Journal of chromatography B* 2009 ; 877 (3) : 141-8.
- [84] Ootom SA, Handu SS, Wazir JF, James H, Sharma PR, Hasan ZA et al. Veratridine-Induced Wet Dog Shake Behaviour and Apoptosis in Rat Hippocampus. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2006 ; 98 : 423–6.
- [85] Larabi K. Intoxication par l'aconitine. *Presse Med* 2012 ; 42(3) : 353-4.
- [86] Beike J, Frommherz L, Wood M, Brinkmann B, Köhler H. determination of aconitine in body fluids by LC/MS/MS. *Int J Legal Med* 2004 ; 118 (5) : 289-93.
- [87] Flesch F. Intoxications d'origine végétale. *Encycl MedChir, Traité de Médecine Akos* 2005 : 7-1057.
- [88] Fujita Y, Terui K, Fujita M, Kakizaki A, Sato N, Oikawa K et al. Five Cases of Aconite Poisoning: Toxicokinetics of Aconitines. *Journal of Analytical Toxicology* 2007 ; 31 : 132-7.
- [89] Wiesner K, Kao WL, Santroch J. A synthesis in the series of aconitine and delphinine. *Canadian Journal of Chemistry* 1969 ; 47: 2431-7.

- [90] Wright SN. Comparison of aconitine-modified human heart (hH1) and rat skeletal (μ 1) muscle Na^+ channels: an important role for external Na^+ ions. *Journal of Physiology* 2002 ; 538 (3) : 759–71.
- [91] Yeih DF, Chiang FT, Huang SKS. Successful treatment of aconitine induced life threatening ventricular tachyarrhythmia with amiodarone. *Heart* 2000 ; 84 (4) : 84-5.
- [92] Jansen SA, Kleerekooper I, Hofman ZLM, Kappen IFPM, Stary-Weinzinger A, Van der Heyden MAG. Grayanotoxin Poisoning: ‘Mad Honey Disease’ and Beyond. *Cardiovasc Toxicol* 2012 ; 12 : 208–15.
- [93] Chen SPL, Lam YH, Ng VCH, Lau FL, Sze YC, Chan WT et al. Mad honey poisoning mimicking acute myocardial infarction. *Hong Kong Med J* 2013 ; 19 (4) : 354-6.
- [94] Demir H, Denizbasi A, Onur O. Mad Honey Intoxication: A Case Series of 21 Patients. *ISRN Toxicology* 2011 : 1-3.
- [95] Yarlioglues M, Akpek M, Ardic I, Elcik D, Sahin O, Kaya MG. Mad-Honey Sexual Activity and Acute Inferior Myocardial Infarctions in a Married Couple. *Tex Heart Inst J* 2011 ; 38 (5) : 577-80.
- [96] Choo YK, Kang HY, Lim SH. Cardiac Problems in Mad-Honey Intoxication. *Circ J* 2008 ; 72 : 1210–1.
- [97] Dubey L, Maskey A, Regmi S. Bradycardia and Severe Hypotension Caused by Wild Honey Poisoning. *Hellenic J Cardiol* 2009 ; 50 : 426-8.
- [98] Gunduz A, Durmus I, Turedi S, Nuhoglu I, Ozturk S. Mad honey poisoning-related asystole. *Emerg Med J* 2007 ; 24 : 592–3.
- [99] Osken A, Yaylaci S, Aydin E, Cakar MA, Tamer A, Gunduz H. Slow ventricular response atrial fibrillation related to mad honey poisoning. *J Cardiovasc Dis Res* 2012; 3 (3) : 245-7.
- [100] Summers K, Clough ME. The evolution of coloration and toxicity in the poison frog family (Dendrobatidae). *PNAS* 2001 ; 98 (11) : 6227-32.
- [101] Dumbacher JP, Wako A, Derrickson SR, Samuelson A, Spande TF, Daly JW. Melyrid beetles (Choresine): A putative source for the batrachotoxin alkaloids found in poison-dart frogs and toxic passerine birds. *PNAS* 2004 ; 101 (45) : 15857-60.
- [102] Daly JW. The chemistry of poisons in amphibian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995 ; 92 : 9-13.
- [103] Dumbacher JP, Spande TF, Daly JW. Batrachotoxin alkaloids from passerine birds: A second toxic bird genus (*Ifrita kowaldi*) from New Guinea. *PNAS* 2000 ; 97 (24) : 12970-5.
- [104] Wang SY, Tikhonov DB, Mitchell J, Zhorov BS, Wang GK. Irreversible Block of Cardiac Mutant Na^+ Channels by Batrachotoxin. *Channels* 2007 ; 1 (3) : 179-88.

- [105] Wang SY, Mitchell J, Tikhonov DB, Zhorov BS, Wang GK. How Batrachotoxin Modifies the Sodium Channel Permeation Pathway: Computer Modeling and Site-Directed Mutagenesis. *Mol Pharmacol* 2006 ; 69 : 788–95.
- [106] Li HL, Hadid D, Ragsdale DS. The Batrachotoxin Receptor on the Voltage-Gated Sodium Channel is Guarded by the Channel Activation Gate. *Mol Pharmacol* 2002 ; 61 : 905–12.
- [107] Wang SY, Barile M, Wang GK. Disparate Role of Na¹ Channel D2-S6 Residues in Batrachotoxin and Local Anesthetic Action. *Mol Pharmacol* 2001 ; 59 : 1100–7.
- [108] Sollod BL, Wilson D, Zhaxybayeva O, Gogarten JP, Drinkwater R, King GF. Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries? *Peptides* 2005 ; 26 : 131–9.
- [109] Martin-Eauclaire MF, Legros C, Bougis PE, Rochat H. Les toxines des venins de scorpion. *Annales de l'institut pasteur actualités* 1999 ; 10 (2) : 207-22.
- [110] Chippaux JP. Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Design, Development and Therapy* 2012 ; 6 : 165–73.
- [111] Chippaux JP, Goyffon M. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta Tropica* 2008 ; 107 : 71–9.
- [112] Leipold E, Borges A, Heinemann SH. Scorpion beta-toxin interference with NaV channel voltage sensor gives rise to excitatory and depressant modes. *J. Gen. Physiol.* 2012 ; 139 (4) : 305–19.
- [113] Karbat I, Frolow F, Froy O, Gilles N, Cohen L, Turkov M et al. Molecular Basis of the High Insecticidal Potency of Scorpion alpha Toxins. *J. Biol. Chem* 2004 ; 279 (30) : 31679–86.
- [114] Cohen L, Lipstein N, Karbat I, Ilan N, Gilles N, Kahn R, et al. Miniaturization of scorpion β -toxins uncovers a putative ancestral surface of interaction with voltage-gated sodium channels. *Journal of biological chemistry* 2008 ; 283 (22) : 15169-75.
- [115] Rowe AH, Xiao Y, Scales J, Linse KD, Rowe MP, Cummins TR et al. Isolation and Characterization of CvIV4: A Pain Inducing alpha Scorpion Toxin. *Plosone* 2011 ; 6 (8) : 1-13.
- [116] Devaux C, Rochat H. Bases théoriques et expérimentales du traitement des envenimations scorpioniques. *Bull Soc Pathol Exot* 2002 ; 95 (3) : 197-9.
- [117] Fabrichny IP, Mondielli G, Conrod S, Martin-Eauclaire MF, Bourne Y, Marchot P. Structural Insights into Antibody Sequestering and Neutralizing of Na Channel alpha-Type Modulator from Old World Scorpion Venom. *J. Biol. Chem.* 2012 ; 287 : 14136-48.
- [118] Klint JK, Senff S, Rupasinghe DB, Er SY, Herzig V, Nicholson GM et al. Spider-venom peptides that target voltage-gated sodium channels: Pharmacological tools and potential therapeutic leads. *Toxicon* 2012 ; 60 : 478–91.
- [119] Lachlan DR, Hodgson WC. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* 2002 ; 40 : 225-54.

- [120] King GF. The wonderful world of spiders: preface to the special *Toxicon* issue on spider venoms. *Toxicon* 2004 ; 43 : 471–5.
- [121] Escoubas P, Diochot S. Les toxines peptidiques dans les venins d'araignées. *Annales de l'institut Pasteur actualités* 1999 ; 10 (2) : 235-51.
- [122] Vassilevski AA, Kozlov SA, Grishin EV. Molecular Diversity of Spider Venom. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii* 2009 ; 49 : 211-74.
- [123] Nicholson GM. Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon* 2007; 49 : 490–512.
- [124] Atkinson RK, Wright LG. The modes of action of spider toxins on insects and mammals. *Camp. Biochem. Physiol* 1992 ; 102 (3) : 339-42.
- [125] Escoubas P, Rash L. Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. *Toxicon* 2004 ; 43 : 555–74.
- [126] De Lima ME, Figueiredo SG, Pimenta AMC, Santos DM, Borges MH, Cordeiro MN et al. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 2007 ; 146 : 264–79.
- [127] Meng E, Cai TF, Li WY, Zhang H, Liu YB, Peng K et al. Functional Expression of Spider Neurotoxic Peptide Huwentoxin-I in *E. Coli*. *Plosone* 2011 ; 6 (6): 1-6.
- [128] Bosmans F, Swartz KJ. Targeting sodium channel voltage sensors with spider toxins. *Trends Pharmacol Sci.* 2010 ; 31(4) : 175–82.
- [129] Wang RI, Yi S, Liang SP. Mechanism of action of two insect toxins huwentoxin-III and hainantoxin-VI on voltage-gated sodium channels. *Biomed & Biotechnol* 2010 ; 11 (6) : 451-7.
- [130] Leite K, Andrade E, Ramos AT, Magnoli FB, Srougi M , Troncone L. Phoneutria nigriventer spider toxin Tx2-6 causes priapism and death: A histopathological investigation in mice. *Toxicon* 2012 ; 60 : 797–801.
- [131] Isbister GK, White J. Clinical consequences of spider bites: recent advances in our understanding. *Toxicon* 2004 ; 43 : 477–92.
- [132] Roberson DP, Binshtok AM, Blasl F, Bean BP, Woolf CJ. Targeting of sodium channel blockers into nociceptors to produce long-duration analgesia: a systematic study and review. *British Journal of Pharmacology* 2011 ; 164 : 48–58.
- [133] Gold M. Na⁺ channel blockers for the treatment of pain: context is everything, almost. *Exp Neurol* 2008 ; 210 (1) : 1–6.
- [134] Nieto FR, Cobos EJ, Tejada MA, Sánchez-Fernández C, González-Cano R, Cendán CM. Tetrodotoxin (TTX) as a Therapeutic Agent for Pain. *Mar. Drugs* 2012 ; 10 : 281-305.
- [135] Dib-Hajj SD, Binshtok AM, Cummins TR, Jarvis MF, Samad T, Zimmermann K. Voltage-gated sodium channels in pain states: Role in pathophysiology and targets for treatment. *Brain*

research reviews 2009 ; 60 : 65-83.

[136] Dib-Hajj SD, Yang Y, Black JA, Waxman SG. The Nav1.7 sodium channel: from molecule to man. *Nature reviews* 2013 ; 14 : 49-60.

[137] Levinson SR, Luo S, Henry MA. The role of sodium channels in chronic pain. *Muscle Nerve* 2012 ; 46 (2) : 155–65.

[138] Wang W, Gu J, Li YQ, Tao YX. Are voltage-gated sodium channels on the dorsal root ganglion involved in the development of neuropathic pain? *Molecular pain* 2011 ; 7 (16) : 1-9.

[139] Momin A, Wood J. Sensory neuron voltage-gated sodium channels as analgesic drug targets. *Current Opinion in Neurobiology* 2008 ; 18 : 383–8.

[140] Cummins TR, Sheets PL, Waxman SG. The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *Pain* 2007 ; 131 : 243–57.

[141] Eijkelkamp N, Linley JE, Baker MD, Minett MS, Cregg R, Werdehausen R, et al. Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels. *Brain* 2012 ; 135 : 2585–612.

[142] Qi FH, Zhou YL, Xu GY. Targeting voltage-gated sodium channels for treatment for chronic visceral pain. *World J Gastroenterol* 2011 ; 17 (19) : 2357-64.

[143] Gilchrist J, Bosmans F. Animal Toxins Can Alter the Function of Nav1.8 and Nav1.9. *Toxins* 2012 ; 4 : 620-32.

[144] Bosmans F, Maertens C, Verdonck F, Tytgat. The poison Dart frog's batrachotoxin modulates Nav1.8. *FEBS Letters* 2004 ; 577 : 245-8.

[145] Brady RM, Baell JB, Norton RS. Strategies for the Development of Conotoxins as New Therapeutic Leads. *Mar. Drugs* 2013 ; 11 : 2293-313.

[146] Shankarappa S, Sagie I, Tsui J, Chiang H, Stefanescu C, Zurakowski D, et al. Duration and local toxicity of sciatic nerve blockade with coinjected site 1 sodium channel blockers and quaternary lidocaine derivatives. *Reg Anesth Pain Med* 2012 ; 37 (5) : 483–9.

[147] Nunes KP, Cordeiro MN, Richardson M, Borges MN, Diniz SOF, Cardoso VN et al. Nitric Oxide-Induced Vasorelaxation in Response to PnTx2-6 Toxin from *Phoneutria nigriventer* Spider in Rat Cavernal Tissue. *J Sex Med* 2010 ; 7 (12) : 3879–88.

[148] Leite K, Andrade E, Ramos AT, Magnoli FB, Srougi M, Troncone L. *Phoneutria nigriventer* spider toxin Tx2-6 causes priapism and death: A histopathological investigation in mice. *Toxicon* 2012 ; 60 : 797–801.

[149] Torres FS, Silva CN, Lanza LF, Santos AV, Pimenta AMC, De Lima ME et al. Functional expression of a recombinant toxin – rPnTx2-6 – active in erectile function in rat. *Toxicon* 2010 ; 56 : 1172–80.

[150] Nunes KP, Wynne BM, Cordeiro MN, Borges MH, Richardson M, Leite R et al. Increased cavernosal relaxation by *Phoneutria nigriventer* toxin, PnTx2-6, via activation at NO/cGMP

signaling. *Int J Impot Res* 2012 ; 24 (2) : 69–76.

[151] Nunes KP, Costa-Gonçalves A, Lanza LF, Cortes SF, Cordeiro MN, Richardson M et al. Tx2-6 toxin of the *Phoneutria nigriventer* spider potentiates rat erectile function. *Toxicon* 2008 ; 51 (7) : 1197–206.

[152] Villanova FE, Andrade E, Leal E, Andrade PM, Borra RC , Troncone L et al. Erection induced by Tx2-6 toxin of *Phoneutria nigriventer* spider: Expression profile of genes in the nitric oxide pathway of penile tissue of mice. *Toxicon* 2009 ; 54 : 793–801.

[153] Yonamine CM, Troncone LRP, Camillo MAP. Blockade of neuronal nitric oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2-5, a lethal *Phoneutria nigriventer* spider toxin. *Toxicon* 2004 ; 44 : 169–72.

[154] Nunes KP, Haroldo AT, Borges MH, Richardson M, Webb RC, De Lima ME. Erectile Function is improved in aged rats by PnTx2-6, a toxin from *Phoneutria nigriventer* spider venom. *J Sex Med* 2012 ; 9 : 2574-81.

[155] Dong K. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci* 2007 ; 7(1) : 17–30.

[156] Narahashi T, Zhao X, Ikeda T, Nagata K, Yeh JZ. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Hum Exp Toxicol* 2007 ; 26(4) : 361–6.

[157] Soderlund DM. Molecular Mechanisms of Pyrethroid Insecticide Neurotoxicity: Recent Advances. *Arch Toxicol* 2012 ; 86 (2) : 165–81.

[158] Zakon HH. Adaptive evolution of voltage-gated sodium channels: The first 800 million years. *PNAS* 2012 ; 109: 10619–25.

La Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs

GACHE Damien

Les toxines ciblant les canaux sodiques voltage dépendants : outils d'études et applications potentielles.

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2014, 138 p.

RESUME

Les toxines ciblant les canaux sodiques voltage dépendants proviennent de tout horizon. Elles sont en effet produites par de nombreux organismes très différents: bactéries, végétaux ou animaux, autant en milieu terrestre qu'aquatique. En plus d'être des armes redoutables autant en défense envers les prédateurs qu'en attaque pour capturer des proies, ces toxines possèdent également de nombreux autres rôles chez ces organismes (outils de signalisation, contrôle de l'osmolalité...). Ces toxines se distinguent également par leur structure chimique: ce sont de petites molécules liposolubles ou hydrosolubles, des polyethers cycliques ou encore des structures peptidiques. Enfin, même si elles ciblent toutes les canaux sodiques voltage dépendants, elles possèdent chacune un mécanisme d'action distinct en ciblant divers sites d'interaction, impliquant chacun des résidus différents. Les modifications engendrées par la liaison au canal peuvent ainsi être très variées, puisqu'elles peuvent modifier les processus d'activation et/ou d'inactivation du canal, mais également la sélectivité ionique ainsi que l'intensité de conduction sodique, en fonction des toxines concernées.

Pour plusieurs raisons, ces toxines sont l'objet d'études à l'heure actuelle et encore de nombreuses données restent encore à être collectées. Ces toxines sont responsables d'un grand nombre d'intoxications autour du monde, et les moyens de prévention et de traitement restent encore limités. Cependant, elles sont surtout étudiées de par le fait que ce sont de véritables outils de compréhension du canal, permettant d'enrichir les connaissances actuelles sur la structure, les caractéristiques et les rôles de ce canal en pathologie humaine. En plus d'apporter de nouvelles connaissances théoriques, ces toxines peuvent également être la clé de découvertes de nouveaux moyens thérapeutiques. Les canaux sodiques voltage dépendants jouent un rôle déterminant dans les mécanismes de la douleur, et il paraît envisageable de s'appuyer sur ces toxines afin de mettre au point de nouveaux antalgiques aux propriétés pharmacodynamiques nouvelles. Les bénéfices des recherches pourraient également s'étendre dans d'autres domaines, dans d'autres pathologies humaines impliquant ces canaux (comme la dysfonction érectile chez l'homme), mais également dans le milieu industriel et dans le cadre de la santé publique pour la lutte contre les insectes nuisibles (de par les propriétés sélectives de certaines toxines envers les canaux sodiques d'insectes).

MOTS CLES

Neurotoxine
Canaux sodiques voltage dépendants

JURY

Pr. Luc ZIMMER, Professeur des Université-Praticien hospitalier

Dr. Bruno FOUILLET, Maître de conférences des Universités

Dr. Patrick BRETON, Expert toxicologue, Direction Générale de l'Armement

DATE DE SOUTENANCE Mardi 25 Novembre 2014

ADRESSE DE L' AUTEUR LA TOUR 26140 ALBON