

Année 2012

**LES TOXINES D'ORIGINE ANIMALE
POSSÉDANT DES PROPRIÉTÉS
ANALGÉSIIQUES : MODES D'ACTION ET
APPLICATIONS EN MÉDECINE HUMAINE**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

Le

par

Florent, Marie NAVARRO

Né le 22 Octobre 1986 à Montpellier (Hérault)

JURY

Président : Pr.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL

Membres

Directeur : Hélène COMBRISSE

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort

Assesseur : Christophe DESBOIS

Maitre de conférences à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur GOGNY Marc

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard
Professeurs honoraires: Mme et MM. : BRUGERE Henri, BRUGERE-PICOUX Jeanne, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard,
CRESPEAU François, DEPUTTE Bertrand, MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, POUCHELON Jean-Louis, ROZIER Jacques

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur

<p>- UNITE DE CARDIOLOGIE Mme CHETBOUL Valérie, Professeur * Mme Gkouni Vassiliki, Praticien hospitalier</p> <p>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. AUDIGIE Fabrice, Professeur M. DENOIX Jean-Marie, Professeur Mme DUPAYS Anne-Gaëlle, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier * Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences</p> <p>- UNITE D'IMAGERIE MEDICALE Mme BEDU-LEPERLIER Anne-Sophie, Maître de conférences contractuel Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier</p> <p>- UNITE DE MEDECINE Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences contractuel M. BLOT Stéphane, Professeur* Mme MAUREY-GUENEC Christelle, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT M. GRANDJEAN Dominique, Professeur * Mme YAGUIYAN-COLLIARD Laurence, Maître de conférences contractuel Mme CLERO Delphine, Maître de conférences contractuel</p> <p>- DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur</p> <p>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences *</p>	<p>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. BLAGA Radu Gheorghe, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. CHERMETTE René, Professeur * M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. BENSIGNOR Emmanuel, Professeur contractuel</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur* M. NIEBAUER Gert, Professeur contractuel Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences Mme MASSE-MOREL Gaëlle, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP)* M. MAUFFRE Vincent, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel, (rattaché au DPASP)</p> <p>- DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS Mme ROUX Françoise, Maître de conférences</p>
--	---

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur

<p>- DISCIPLINE : BIostatISTIQUES M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences</p> <p>- UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur Mme DUFOUR Barbara, Professeur* Mme HADDAD/HOANG-XUAN Nadia, Professeur Mme PRAUD Anne, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel</p>	<p>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. ADJOU Karim, Maître de conférences * M. BELBIS Guillaume, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel, M. HESKIA Bernard, Professeur contractuel M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. ARNE Pascal, Maître de conférences* M. BOSSE Philippe, Professeur M. COURREAU Jean-François, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY-BARASSIN Isabelle, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Professeur</p>
---	--

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

<p>- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES M. CHATEAU Henry, Maître de conférences* Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur Mme ROBERT Céline, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Professeur certifié</p> <p>- UNITE DE BIOCHIMIE M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences* M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE M. PHILIPS, Professeur certifié</p> <p>- UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur*</p> <p>-UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences* M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur Mme LALOY Eve, Maître de conférences contractuel M. REYES GOMEZ Edouard, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel</p>	<p>- UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. MAGNE Laurent, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur M. PERROT Sébastien, Maître de conférences M. TISSIER Renaud, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur Mme PILOT-STORCK Fanny, Maître de conférences M. TIRET Laurent, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences *</p> <p>- DISCIPLINE : ETHOLOGIE Mme GILBERT Caroline, Maître de conférences</p>
--	---

* responsable d'unité

REMERCIEMENTS

Au Professeur de la Faculté de Médecine de Créteil

Merci pour l'honneur de votre présence en ce jour de soutenance.

A Madame le Professeur Hélène Combrisson

Merci pour vos relectures rapides, votre disponibilité et vos conseils avisés.

A Monsieur le Docteur Christophe Desbois

Merci pour votre relecture

A Monsieur Nicolas Andreotti

Merci de m'avoir transmis une de vos publications

A Madame Sylvie Diochot

Merci pour votre aide dans mes recherches bibliographiques

A Monsieur le Docteur Max Goyffon

Merci pour vos conseils avisés

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX.....	7
LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION.....	13
PREMIERE PARTIE : L'anatomie et la physiologie de la douleur	15
I. Organisation anatomique des structures conduisant l'influx nociceptif.....	15
I.1. Les mécanismes périphériques impliqués dans la nociception.....	15
I.2. Les projections spinales des fibres périphériques	16
I.3. La transmission de l'influx depuis la corne dorsale jusqu'à l'encéphale	17
I.3.1. Les neurones spinaux impliqués dans la transmission de l'information nociceptive	17
I.3.2. Plasticité de l'activité neuronale	18
I.3.3. Le transfert vers l'encéphale	18
I.3.3.1. Le faisceau spino-thalamique	18
I.3.3.2. Le faisceau spino-réticulaire	19
I.3.3.3. Les faisceaux spino-mésencéphaliques.....	19
I.3.3.4. Autres faisceaux.....	19
I.4. Le traitement des messages nociceptifs dans l'encéphale	19
I.4.1. les relais réticulaires.....	20
I.4.2. Les relais bulbaires, pontiques et mésencéphaliques	20
I.4.3. Les relais thalamiques	20
I.4.4. Les relais corticaux	21
I.5. Les mécanismes de contrôle des neurones spinaux impliqués dans la nociception... 21	
I.5.1. Les contrôles segmentaires	21
I.5.2. Les contrôles d'origine supraspinale	21
I.5.3. Les contrôles inhibiteurs diffus.....	22
II. Physiologie de la douleur	25

II.1. La genèse du potentiel d'action au niveau des terminaisons libres des nocicepteurs.....	25
II.1.1. Les nocicepteurs « peptidergiques » et « non peptidergiques »	25
II.1.2. Les récepteurs élémentaires	25
II.1.2.1. Les canaux à potentiel récepteur transitoire (Transient Receptor Potential = TRP).....	25
II.1.2.2. Les canaux ioniques sensibles à l'acidité (Acid Sensing Ion Channel = ASIC)	27
II.1.2.3. Les récepteurs purinergiques	27
II.1.3. Les canaux sodiques voltage-dépendants	27
II.2. Rôle de l'inflammation	28
II.3. Les médiateurs de l'inflammation (Le Bars et Willer (2004))	29
II.3.1. Les kinines	29
II.3.2. Les cytokines	29
II.3.3. Les prostanoïdes	30
II.3.4. Les neurotrophines	30
II.3.5. Les peptides	30
II.3.6. Les récepteurs NMDA et AMPA/kainate.....	30
II.3.7. Les récepteurs β -adrénergiques	31
II.3.8. les opioïdes	31
II.4. La libération des neuromédiateurs dans la moelle.....	31
II.4.1. Les canaux calciques voltage-dépendants	31
II.4.2. Les récepteurs présynaptiques	33
II.4.3. Les acides aminés excitateurs	33
II.4.4. Le double effet du NO	34
II.4.5. Les neuropeptides et les opioïdes	35
III. Classification des syndromes douloureux	39
III.1. La douleur physiologique	39
III.2. La douleur inflammatoire.....	39
III.3. La douleur neuropathique.....	40
DEUXIEME PARTIE : Les toxines aux propriétés analgésiques découvertes chez les vertébrés	41
I. Les toxines extraites du venin des serpents	41
I.1. Généralités sur les venins de serpents.....	41

I.2. Les études sur les venins de serpents asiatiques	41
I.2.1. L'hannalgésine	42
I.2.2. La cobratoxine	43
I.2.3. La cobrotoxine	44
I.2.4. La najanalgésine.....	45
I.3. Les toxines de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (figure 12)	45
I.3.1. Le venin brut	45
I.3.2. La crotoxine	46
I.3.3. La crotamine	47
I.3.4. La crotalphine	47
I.4. Bilan sur les toxines de serpents	48
II. Les toxines extraites de la peau des amphibiens	49
II.1. Les opioïdes cutanés des amphibiens	49
II.1.1. Généralités sur les opioïdes cutanés des amphibiens	49
II.1.2. La dermorphine et ses analogues naturels	49
II.1.3. Les analogues synthétiques de la dermorphine	51
II.1.4. Les deltorphines.....	53
II.2. Une toxine agissant sur les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique : l'épibatidine.....	54
II.3. Une toxine agissant sur les canaux sodium voltage dépendants : l'anntoxine	56
TROISIEME PARTIE : Les toxines aux propriétés analgésiques découvertes chez les invertébrés	59
I. Les toxines extraites du venin des cônes marins du genre <i>Conus</i> :.....	59
I.1. Généralités sur les venins des cônes marins	59
I.2. Les conotoxines agissant sur les canaux calcium voltage-dépendants	62
I.2.1. La ω -conotoxine MVIIA (SNX111, ziconotide, Prialt®).....	62
I.2.2. Les autres ω -conotoxines possédant des propriétés analgésiques	65
I.3. Les conotoxines qui ciblent les canaux sodium voltage-dépendants.....	66
I.4. Les conotoxines qui ciblent les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine.....	67
I.5. Les conopeptides qui ciblent les récepteurs NMDA.....	69
I.6. La conotoxine qui inhibe la capture de la noradrénaline dans la fente synaptique....	69
I.7. Bilan sur les toxines des cônes marins.....	70
II. Les toxines extraites du venin des araignées	71
II.1. Généralités sur le venin des araignées	71

II.2. Les toxines inhibitrices des canaux ASIC	71
II.3. Les toxines inhibitrices des canaux sodiques voltage-dépendants	73
II.3.1. La toxine GsAFI de <i>Grammostola rosea</i>	73
II.3.2. Les toxines de <i>Thrixopelma pruriens</i>	74
II.4. Les toxines inhibitrices des canaux calciques voltage-dépendants	75
II.4.1. L’Huwentoxine-1 (figure 37)	75
II.4.2. Les Neurotoxines Tx3-3 et 3-6	76
II.4.2.1. Tx3-3 (figure 39)	76
II.4.2.2. Ph α 1 β (figure 40).....	77
II.5. Les toxines inhibitrices du récepteur P2X3	78
II.6. Les toxines inhibitrices des récepteurs mécano-sensibles	79
II.6.1. La GsAFII (figure 42).....	79
II.6.2. la GsMTx4 (figure 43).....	79
III. Les toxines extraites du venin des scorpions.....	81
III.1. Généralités sur les venins de scorpions	81
III.2. Les toxines possédant des propriétés analgésiques dans le venin de <i>Mesobuthus</i> <i>martensii</i> (figure 44).....	81
III.2.1. Les toxines BmK AS, BmK AS-1 et BmK IT2	81
III.2.2. La toxine BmK AGAP	82
III.2.3. La toxine BmK IT-AP (<i>Insect Toxin – Analgesic Peptid</i>)	82
III.2.4. La toxine BmK 9	82
III.2.5. La Drosotoxine et la DrTx(1-42)	82
III.2.6. Autres toxines.....	83
III.3. Les toxines extraites du venin d’autres espèces de scorpions	83
IV. Les toxines extraites du venin d’anémones de mer	85
IV.1. La toxine APETx2	85
IV.2. La toxine APHC1	86
V. Le dérivé MSVIII-19 d’une toxine extraite d’une éponge marine	87
VI. Propriétés analgésiques du venin d’abeille.....	89
CONCLUSION	91
BIBLIOGRAPHIE	93

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma des projections centrales des fibres cutanées (d'après Adam et Le Bars (2006)) :	17
Figure 2 : Schéma bilan des voies de la douleur de la genèse de l'influx nerveux à l'inhibition par les différents noyaux cérébraux (d'après Le Bars et Willer (2004)) :	23
Figure 3 : Modalités de l'activation du neurone afférent primaire sous l'effet de la chaleur (d'après Le Bars et Willer (2004)) :	26
Figure 4 : Schéma du mécanisme d'inflammation neurogène (d'après Adam et le Bars (2006)) :	29
Figure 5 : Schéma des interactions entre les récepteurs de la terminaison libre et les agents inflammatoires. Les facteurs susceptibles d'activer les nocicepteurs sont représentés en trait plein et ceux susceptibles de les sensibiliser sont en pointillés (d'après Le Bars et Willer (2004)) :	32
Figure 6 : Schéma d'explication de la libération des neuromédiateurs dans la moelle (d'après Le Bars et Willer (2004)) :	34
Figure 7 : Schéma de la position des récepteurs aux opioïdes endogènes dans le système nerveux (d'après Pleuvry (2005)) :	37
Figure 8 : Photographie d'un <i>Ophiophagus hannah</i> (d'après The Reptile Database):	42
Figure 9 : Photographie d'un <i>Naja kaouthia</i> (d'après The Reptile Database):	42
Figure 10 : Photographie d'un <i>Naja naja atra</i> (d'après The Reptile Database):	42
Figure 11 : Illustration de la cobratoxine avec ses trois boucles (d'après Kostantakaki <i>et al.</i> (2007)) :	44
Figure 12 : Illustration de cinq cobratoxines fixées au récepteur pentamérique (A, B, C, D et E) (d'après Bourne <i>et al.</i> (2005)) :	44
Figure 13 : Photographie d'un <i>Crotalus durissus terrificus</i> (d'après The Reptile Database) :	45
Figure 14 : Illustration de la crotoxine avec la sous-unité CB et la sous-unité CA (d'après Faure <i>et al.</i> (2011)) :	47
Figure 15 : Photographie d'une <i>Phyllomedusa bicolor</i> (d'après AmphibiaWeb)	49
Figure 16 : Photographie de <i>Phyllomedusa sauvagii</i> (d'après AmphibiaWeb)	49
Figure 17 : Figure de l'épibatidine (d'après Watt <i>et al.</i> (2000)) :	55
Figure 18 : Photographie d' <i>Epipedobates tricolor</i> (d'après AmphibiaWeb) :	56
Figure 19 : Figure de l'ABT-594 (d'après Donnelly-Roberts <i>et al.</i> (1998)) :	56
Figure 20 : Représentation de l'anntoxine (d'après You <i>et al.</i> (2009)) :	56
Figure 21 : Photographie au microscope électronique des harpons des cônes piscivores <i>Conus catus</i> , <i>Conus purpurascens</i> et <i>Conus geographus</i> . La barre d'échelle correspond à 100 µm (d'après Bingham <i>et al.</i> (2010)) :	60
Figure 22 : Schéma illustrant l'anatomie d'un cône piscivore en chasse (d'après Schmidtko <i>et al.</i> (2010)) : ...	60
Figure 23 : Photographie de la coquille d'un <i>Conus magus</i> (d'après www.coneshell.net):	63

Figure 24 : Structure du ziconotide (d'après Han <i>et al.</i> (2008)) :	63
Figure 25 : Schéma du mode d'action du ziconotide au niveau de la synapse entre le neurone afférent primaire et les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (d'après Schmidtko <i>et al.</i> (2010)) : ..	65
Figure 26 : Structure de la toxine μ O-MrVIB (d'après Han <i>et al.</i> (2008)) :	67
Figure 27 : Photographie de la coquille de <i>Conus marmoreus</i> (d'après www.coneshell.net):	67
Figure 28 : Photographie de la coquille de <i>Conus victoriae</i> (d'après www.coneshell.net):	68
Figure 29 : Structure de la conantokine G (d'après Han <i>et al.</i> (2008)) :	69
Figure 30 : Séquence de la Psalmotoxine-1 avec les ponts disulfures déterminés expérimentalement (d'après ArachnoServer) :	72
Figure 31 : Photographie de <i>Psalmopoeus cambridgei</i> femelle (d'après ArachnoServer) :	73
Figure 32 : Séquence de GsAFI avec les ponts disulfures déduits par homologie avec β -TRTX-Gr1a et la ProTxII (d'après ArachnoServer) :	73
Figure 33 : Photographie d'une <i>Grammostola rosea</i> femelle (d'après ArachnoServer) :	74
Figure 34 : Séquence de la ProTxI avec les ponts disulfures déduits par homologie (d'après ArachnoServer) :	74
Figure 35 : Séquence de la ProTxII avec les ponts disulfures déduits expérimentalement (d'après ArachnoServer) :	75
Figure 36 : Photographie d'une <i>Thrixopelma pruriens</i> femelle (d'après ArachnoServer) :	75
Figure 37 : Séquence de l'Huwentoxine-1 avec les ponts disulfures déduits expérimentalement (d'après ArachnoServer) :	76
Figure 38 : Photographie d'une femelle <i>Haplopelma huwenum</i> (d'après ArachnoServer) :	76
Figure 39 : Séquence de la Tx3-3 avec les ponts disulfures hypothétiques (d'après ArachnoServer) :	77
Figure 40 : Séquence de la Ph α 1 β avec les ponts disulfures hypothétiques (d'après ArachnoServer) :	78
Figure 41 : Photographie d'une femelle <i>Phoneutria nigriventer</i> (d'après ArachnoServer) :	78
Figure 42 : Séquence de GsAFII avec les ponts disulfures déduits par homologie avec la κ -theraphotoxin-Gr2a (d'après ArachnoServer) :	79
Figure 43 : Séquence de la GsMTx4 avec les ponts disulfures déduits expérimentalement (d'après ArachnoServer) :	80
Figure 44 : Photographie de <i>Mesobuthus martensii</i> (d'après UniProt (2012)) :	83
Figure 45 : Structure de la dysiherbaïne (à gauche) et de MSVIII-19 (à droite) (d'après Frydenvang <i>et al.</i> (2009)).....	87
Figure 46 : Schéma bilan représentant l'action des toxines sur leur(s) cible(s) (trait barré = inhibition et flèche = activation) (d'après Lewis <i>et al.</i> (2012)) :	92

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tableau résumant les différentes abréviations des acides aminés (d'après le site de l'International Union of Pure and Applied Chemistry = IUPAC) :	9
Tableau 2 : Séquence et cibles des opioïdes endogènes (d'après Pleuvry (2005) et Mizoguchi <i>et al.</i> (2011)) : .	36
Tableau 3 : Tableau des séquences primaires en acides aminés de la dermorphine et de ses analogues naturels (d'après Mizoguchi <i>et al.</i> (2011)) :	50
Tableau 4 : Les analogues synthétiques contenant de la D-Arg ² et leur séquence primaire (d'après Mizoguchi <i>et al.</i> (2011)) :	53
Tableau 5 : Nomenclature des toxines selon leur cible pharmacologique (d'après King <i>et al.</i> (2008) et Kaas <i>et al.</i> (2010)) :	61
Tableau 6 : Classification des différents motifs de cystéines des conopeptides (d'après Kaas <i>et al.</i> (2010)) : .	62

LISTE DES ABREVIATIONS

Tableau 1 : Tableau résumant les différentes abréviations des acides aminés (d'après le site de l'*International Union of Pure and Applied Chemistry = IUPAC*) :

Acides Aminés	Abréviations à 3 lettres	Abréviations à 1 lettre
Acide aspartique	Asp	D
Acide glutamique	Glu	E
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V
Acide aminé non spécifié	Xaa	X

5-HT : 5-HydroxyTryptamine = sérotonine

5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT₄ et 5-HT₅: récepteur à la sérotonine 1A, 1B, 2A, 3, 4 et 5

(P (CPP : CEFB) A): Poly[1,3-bis(ρ -Carboxy-Phenoxy)Propan-co- ρ -CarboxyEthyl-Formamido)BenzoïcAnhydride]
 [Dmt¹]DALDA : Diméthyl DALDA
 ABT-594 : (R)-5-(2-Azétidinylméthoxy)-2-chloropyridine
 AChBP : *AcetylCholine Binding Protein*
 ACTH : *AdrenoCorticoTropic Hormone*
 AD₅₀ : *Analgesic Dose 50%* = dose nécessaire à l'obtention de 50% d'effet analgésique
 ADAMB : Amidino-D-Arg-MetBêta
 ADP : Adénosine DiPhosphate
 amidino-TAPA : N^α-Amidino-Tyr-D-Arg-Phe- β -Ala-OH
 Amm : *Androctonus mauritanicus mauritanicus*
 AMPA : *2-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole-Propionic Acid*
 AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
 APETx2 : *AnthoPleura Elegantissima Toxin 2*
 APHC1 : *Analgesic Peptides of Heteractis Crispa 1*
 ARN : Acide RiboNucléique
 ASIC : *Acid Sensing Ion Channel*
 ATP : Adénosine TriPhosphate
 B₂ : Récepteur de la Bradykinine 2
 BDNF : *Brain-Derivated Neurotrophic Factor*
 BLT : Récepteur des LeucoTriènes
 BmK : *Buthus martensii* Karsch
 BmK IT-AP : *Buthus martensii* Karsch *Insect Toxin – Analgesic Peptid*
 Ca : Calcium
 CA : Sous-unité CA de la crotoxine appelée crotapotine
 Ca_v : Canaux Calciques Voltage-dépendants
 CB : Sous-unité CB de la crotoxine
 CD14 : *Cluster of Differentiation 14*
 CGRP : *Calcitonin Gene-Related Peptide*
 CIDN : Contrôles Inhibiteurs Diffus Nociceptifs
 cm² : Centimètre carré
 COX-1 et -2 : CycloOXygénase-1 et -2
 cPKG : Protéine Kinase dépendante du GMPc
 CRH : *Corticotropic Releasing Hormone*
 Da : Dalton
 DAG : DiAcyl Glycérol
 DALDA : [D-Arg², Lys⁴]Dermorphine Aminée
 DL₅₀ : Dose Létale pour 50% des animaux l'ayant reçu
 DrTx(1-42) : DrosoToxine(1-42)
 EMG : ElectroMyoGramme
 eNOS : *Endothelial Nitric Oxide Synthase*
 EP₁ et EP₂ : Récepteur de la prostaglandine E₂ 1 et 2
 EVA : Echelle Visuelle Analogique
 g : Gramme
 GABA : *Gamma AminoButyric Acid*
 GABA_A et GABA_B : Récepteurs du GABA A et B
 GDP : Guanosine DiPhosphate
 GI : Noyau Gigantocellulaire
 G_i : Protéine G inhibitrice
 GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique

GDNF : *Glial Neurotrophic-Derived Factor*
 GPCR : *G-Protein Coupled Receptor*
 G_s : Protéine G stimulatrice
 GsMTx4 : MécanoToxine 4 de *Grammostola spatulata*
 GTP : Guanosine TriPhosphate
 H⁺ : Proton
 h : Heure
 H1: Récepteur de l'Histidine 1
 Hist : Histidine
 IASP : *International Association for the Study of Pain*
 ICK : *Inhibitor Cystine Knot*
 icv : Intra-cérébro-ventriculaire
 IL : InterLeukine
 iNOS : *Inducible Nitric Oxide Synthase*
 ip : Intrapéritonéal
 IP : Récepteur de la prostaglandine I₂
 IP₃ : Inositol triPhosphate
 ipl : Intraplantaire
 in : Intranasal
 it : Intrathécal
 IUPAC : *International Union of Pure and Applied Chemistry*
 iv : Intraveineux
 L-NAME : L-N^G-Nitro Arginine Méthyl Ester
 LCS : Liquide Cérébro Spinal
 LTB₄ : LeucoTriène B4
 Ltd : Limited
 Lqq : *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*
 kg : Kilogramme
 m/s : Mètre par seconde
 mg : Milligramme
 mGluR1 et 5 : *Metabotropic Glutamate Receptor 1 et 5*
 min : Minute
 µg : Microgramme
 µm : Micromètre
 N/OFQ : Nociceptine / Orphanine FQ
 Na : Sodium
 nAChR : *Nicotinic AcetylCholine Receptor*
 Na_v : Canaux sodiques Voltage-dépendants
 NET: *NorEpinephrine Transporter*
 ng : Nanogramme
 NGF : *Nerve Growth Factor*
 NK1 : Récepteur de la NeuroKine 1, récepteur de la substance P
 NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate
 nmol : Nanomole
 nNOS : *Nervous Nitric Oxide Synthase*
 NO : *Nitric Oxide*
 NTS : Noyau du Tractus Solitaire
 P1Y₂ : Récepteur métabotrope à l'adénosine
 P2X3 : Récepteur Purinergique
 PB : Aire ParaBrachiale

pCPA : Para-ChloroPhénylAlanine
PcTx1 : PsalmoToxine 1
PG : ProstaGlandine
pH : Potentiel d'Hydrogène
Ph. : *Phyllomedusa*
PIP₂ : Phosphatidyl Inositol biPhosphate
PK : Protéine Kinase
PLC : PhosphoLipase C
PLGA : Poly-(Lactide-co-Glycolide)
pmol : Picomole
po : *Per os*
PO₄ : Phosphate
ProTxI et II : ProToxine I et II
RBVLc : Région Bulbaire VentroLatérale caudale
RBVLr : Région Bulbaire VentroLatérale rostrale
RBVM : Région Bulbaire Ventro-Médiale
RT-qPCR : *Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction*
sc : Sous-cutané
SGPA : Substance Grise PériAqueducale
sP : Substance P
SRD : *Subnucleus Reticularis Dorsalis*
TAPA : Tyr-D-Arg-Phe-β-Ala-OH
TAPA-NH₂ : Tyr -D-Arg-Phe-β-Ala-NH₂
TAPS : Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH
TNF-α : *Tumor Necrosis Factor-α*
Trk : Tyrosine kinase
TRPA1 : *Transient Receptor Potential sub-family A1*
TRPV-1 et -4 : *Transient Receptor Potential Vanilloïd – 1 et 4*
TTX-R : Résistant à la TétrodoToXine
TTX-S : Sensible à la TétrodoToXine
VIP : *Vasoactive Intestinal Peptide*

INTRODUCTION

Les toxines animales sont étudiées pour leur potentiel biotechnologique et leurs applications thérapeutiques comme par exemple le traitement des maladies nerveuses et cardiovasculaires, les cancers, le diabète, les désordres auto-immuns et la douleur selon Andreotti *et al.* (2010). L'Association internationale pour l'étude de la douleur (*International Association for the Study of Pain* = IASP) définit la douleur comme étant une expérience sensorielle aversive, déclenchée par une atteinte réelle ou potentielle qui provoque des réactions motrices et végétatives protectrices, conduit à l'apprentissage d'un comportement d'évitement et peut modifier le comportement spécifique de l'espèce, y compris le comportement social. Deux types de douleurs peuvent être décrits, la douleur aiguë et la douleur chronique. La douleur aiguë est un système d'alarme qui protège l'organisme en induisant des réponses réflexes et comportementales dont la finalité est de supprimer les causes qui ont déclenché cette sensation. Quant à elle, la douleur chronique peut subsister un temps indéfini et apparaît dans un but et par des moyens mal définis selon McCurdy et Scully (2005). La douleur est la principale cause qui amène un individu à consulter un médecin (Adam et Le Bars (2006)). De ce fait, Rajendra *et al.* (2004) écrivent qu'en raison de leurs fonctions pharmacologiques diversifiées couplées à une forte spécificité de cible, les toxines animales reçoivent une grande attention pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques incluant la gestion de la douleur. Les toxines qui nous intéressent dans cette synthèse bibliographique sont principalement extraites de venin de serpents, de scorpions, d'araignées, de cônes marins ou sont présentes à la surface de la peau de batraciens.

Quelles sont les toxines possédant un pouvoir antalgique ? Comment agissent-elles ? Quelles sont les applications en médecine ?

Dans un premier temps, un rappel sur les voies et la physiologie de la douleur est nécessaire pour comprendre le mode d'action des toxines. Dans un deuxième temps, les toxines des vertébrés et leurs modes d'action seront détaillés avant de s'intéresser aux toxines des invertébrés.

PREMIERE PARTIE : L'anatomie et la physiologie de la douleur

I. Organisation anatomique des structures conduisant l'influx nociceptif

I.1. Les mécanismes périphériques impliqués dans la nociception

Il n'existe pas de récepteurs spécialisés dans la détection des stimuli nociceptifs. Les messages nociceptifs sont générés au niveau de terminaisons libres amyéliniques, constituants des arborisations en plexus dans les tissus cutanés, osseux et articulaires. Dans la peau, la densité moyenne de ces terminaisons n'est jamais inférieure à 600/cm² (Le Bars et Willer (2004)). Les messages sont ensuite véhiculés par des fibres nerveuses périphériques qui, rassemblées au sein des nerfs, envoient leurs messages vers la moelle épinière où s'effectue le premier relais. Ces neurones à terminaisons libres sont appelés nocicepteurs s'ils codent préférentiellement des stimuli nociceptifs.

La classification la plus utilisée des neurones sensitifs primaires est fondée sur leur vitesse de conduction, elle-même corrélée au degré de myélinisation de leur axone, et permet de distinguer trois groupes dénommés A α /A β , A δ et C. Les influx nociceptifs sont transmis par les fibres A δ , peu myélinisées, de diamètre compris entre 1 et 5 μ m, qui conduisent l'influx nerveux à une vitesse moyenne de 20 m/s et les fibres C non myélinisées, de diamètre compris entre 0,3 et 1,5 μ m, qui conduisent lentement l'influx nerveux, environ 2 m/s (Gilles (2006) et Adam et Le Bars (2006)). Ces fibres correspondent pour la plupart aux nocicepteurs car moins de 75% des fibres A δ sont à seuil bas et le reste correspond aux nocicepteurs à seuil de déclenchement élevé. Les récepteurs à haut seuil ne répondent qu'à des dégâts tissulaires, lorsque l'intégrité des tissus est remise en cause. Les fibres A α /A β sont des fibres rapides de gros calibres correspondant à des mécanorécepteurs à seuil bas et à des stimulations non douloureuses (Gaynor et Muir (2009)).

Les fibres C constituent de 60 à 90% de l'ensemble des fibres afférentes cutanées et la quasi-totalité des fibres afférentes viscérales. Elles sont majoritairement des récepteurs polymodaux qui réagissent aux stimuli thermiques, mécaniques et chimiques. Ces fibres peuvent aussi être activées par des intensités de stimulation non douloureuse, surtout si le stimulus est mécanique (frottement d'un doigt sur une corde de guitare). Les champs périphériques de ces unités, de surface comprise entre 0,01 et 1 cm², se recouvrent très largement les uns les autres et recouvrent également les champs périphériques d'autres types de fibres, de telle sorte que l'application d'une stimulation nociceptive mécanique, même de faible étendue, aura pour conséquence d'activer de façon concomitante de nombreuses fibres A β , A δ et C (Le Bars et Willer (2004)). Les fibres A δ correspondent à des nocicepteurs mécaniques et mécano-thermiques qui provoquent une douleur aiguë rapide par rapport à la douleur lente, sourde et plus durable provoquée par les fibres C. Les fibres A δ déchargent à une fréquence supérieure à celle des fibres C ce qui permet de cibler plus précisément la source de la douleur par le système nerveux central. Les nocicepteurs polymodaux sont très sensibles au phénomène de sensibilisation lors de dégâts tissulaires ou d'inflammation. Après répétition d'un stimulus nociceptif, le seuil d'activation du nocicepteur est abaissé et, pour un stimulus d'intensité donnée, sa fréquence de décharge est augmentée. Ils sont responsables de

l'hyperalgésie qui est une sensibilité accrue à un stimulus nociceptif, à ne pas confondre avec l'allodynie qui correspond à une douleur produite par un stimulus non nociceptif. Les modalités de leur activation peuvent aussi évoluer. Ainsi, un mécano-nocicepteur peut devenir sensible aux stimuli thermiques. En fait, si un stimulus nociceptif est capable de déclencher une sensation de douleur, la lésion tissulaire qu'il aura provoquée sera responsable d'une série d'évènements étroitement liés aux processus inflammatoires engendrés par la lésion, qui vont prolonger le temps d'activation des nocicepteurs et provoquer une sensibilisation. On peut à cet égard évoquer l'existence d'un système d'alarme secondaire, en quelque sorte chargé d'informer les centres supérieurs de l'état d'endommagement d'un territoire corporel. Sa constante de temps est supérieure à celle du système d'alarme primaire activé par l'agression initiale (Guirimand et Le Bars (1996) et Gilles (2006)).

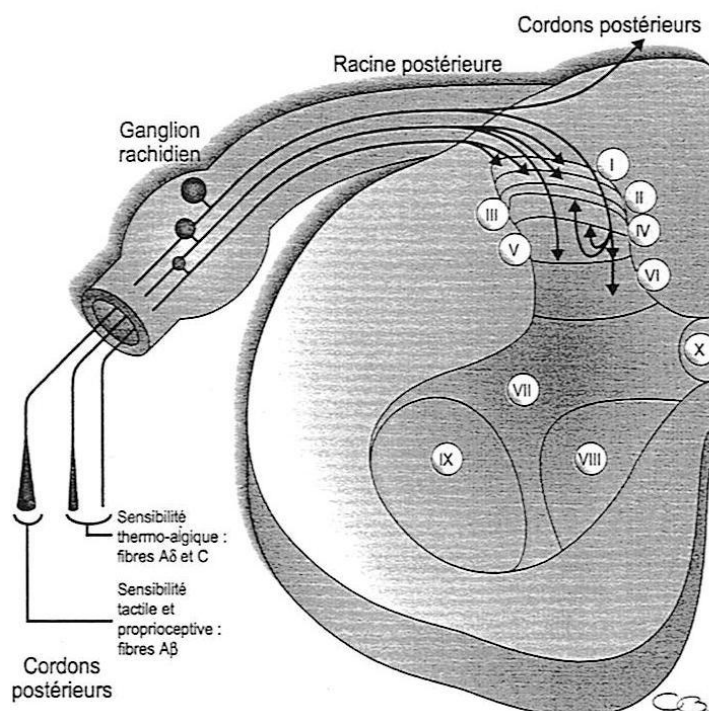
On observe aussi des nocicepteurs silencieux ou dormants qui s'activent lors de contexte nociceptif et inflammatoire particulier et qui participent au phénomène d'hyperalgésie (Gaynor et Muir (2009)).

I.2. Les projections spinales des fibres périphériques

La très grande majorité des fibres afférentes primaires atteignent le système nerveux central par les racines rachidiennes dorsales ou les ganglions trigéminaux pour les nerfs crâniens. Comme le montre la Figure 1, les fibres de gros calibre se séparent des fibres de petit calibre à la jonction radiculo-médullaire de sorte qu'à leur entrée dans la corne dorsale de la moelle, les fibres amyéliniques occupent la partie latéro-ventrale de la racine dorsale alors que les fibres plus grosses ont une position médio-dorsale.

Les fibres A β , qui transmettent les informations proprioceptives et tactiles, envoient leurs axones en partie vers la corne dorsale de la moelle (couche III à V) et en partie, *via* les cordons postérieurs, vers les noyaux graciles (de Goll) et cunéiformes (de Burdach), situés dans la partie caudale du bulbe où s'effectue le premier relais synaptique. Les neurones de ces noyaux envoient leurs axones vers le thalamus latéral *via* le lemnisque médian après décussation au niveau bulbaire, ce qui prend le nom de système lemniscal. Les neurones du thalamus latéral se projettent vers le cortex somesthésique primaire. Il s'agit d'un système de communication très rapide qui transmet des informations concernant la localisation sur le corps (somatotopie) avec seulement deux relais synaptiques. Les fibres A δ et C se divisent en une branche ascendante et une branche descendante dans le tractus de Lissauer et envoient, sur un à six segments, des collatérales vers la corne dorsale de la moelle. Lorsqu'elles sont d'origine cutanée, ces fibres se projettent préférentiellement dans les couches superficielles de la corne dorsale, essentiellement les couches I et II externe. Les fibres A δ se projettent en outre sur les couches V. Quant aux fibres d'origine musculaire, elles se terminent dans les couches I, V et VI, et les fibres afférentes primaires d'origine viscérales dans les couches I, V, VII et X, parfois bilatéralement. On constate par conséquent une convergence anatomique des fibres afférentes nociceptives cutanées, musculaires et viscérales dans les couches I, II et V de la corne dorsale de la moelle (Adam et Le Bars (2006)).

Figure 1 : Schéma des projections centrales des fibres cutanées (d'après Adam et Le Bars (2006)) :



I.3. La transmission de l'influx depuis la corne dorsale jusqu'à l'encéphale

I.3.1. Les neurones spinaux impliqués dans la transmission de l'information nociceptive

Parmi les neurones qui répondent à des stimuli nociceptifs, certains sont spécifiquement activés par ces stimuli et sont appelés des neurones spécifiquement nociceptifs tandis qu'une autre catégorie de neurones y répond de façon préférentielle mais non exclusive. Ils sont appelés neurones à convergence. Leurs champs récepteurs excitateurs (zone corporelle déclenchant une activité neuronale) sont relativement restreints et bien localisés (Le Bars et Willer (2004)).

Les neurones nociceptifs spécifiques sont essentiellement localisés dans la couche I de la moelle. Certains répondent exclusivement à un type de stimulus nociceptif, thermique ou mécanique par exemple. Leur champ récepteur est de petite taille. Ils codent dans une certaine mesure l'intensité de la stimulation. Ces neurones ne reçoivent comme afférences que des fibres Aδ et C dont les origines diverses peuvent expliquer le phénomène de convergence viscéro-somatique qui correspond à une douleur projetée sur une zone non lésée mais qui suit la loi des dermatomes selon Gaynor et Muir (2009).

Les neurones à convergence ont leurs corps cellulaires principalement localisés dans la couche V, mais aussi dans les couches plus superficielles, et leur répartition suit une organisation somatotopique. Leur champ récepteur cutané présente un gradient de sensibilité : dans la partie centrale du champ périphérique, tout stimulus, nociceptif ou non, active le neurone ; dans une zone plus périphérique, seules les stimulations nociceptives mettant en jeu les fibres Aδ ou C déclenchent une activité neuronale. Compte tenu du recouvrement des champs excitateurs, l'application d'un stimulus non nociceptif, sur un territoire donné, n'activera que les neurones dont le centre du champ excitateur est situé sur ce territoire. En revanche, un stimulus nociceptif appliqué sur le même

territoire activera non seulement ces mêmes neurones mais également les marges de beaucoup d'autres.

I.3.2. Plasticité de l'activité neuronale

Dans les conditions physiologiques normales, un stimulus nociceptif active non seulement de façon patente un groupe de neurones qui émettent alors des potentiels d'action, mais aussi de façon sous-liminaire une large frange de neurones adjacents. Au cours de processus pathologiques d'origine périphérique ou centrale (inflammation, neuropathie) cette cohorte de neurones pourrait devenir suffisamment dépolarisée pour émettre des potentiels d'action et ainsi, amplifier le transfert de l'information.

Une sensibilisation des mécanismes excitateurs se traduira donc par une augmentation de l'activité et de la taille de la population de neurones concernés par le foyer douloureux. Cette information élaborée dans la moelle est ensuite transmise au cerveau, où elle est décodée sous la forme d'une hyperalgésie. Cette hyperalgésie peut ainsi s'expliquer par une augmentation de la convergence des influx périphériques vers les neurones de la corne dorsale résultant de l'hyperexcitabilité neuronale. Ce mécanisme de sensibilisation centrale épaulerait alors les mécanismes périphériques de recrutement supplémentaire de fibres adjacentes au foyer primaire fondés sur le réflexe d'axone que nous verrons plus loin (Le Bars et Willer (2004)).

Après intégration par les neurones de la corne dorsale, les messages nociceptifs vont être orientés simultanément dans deux directions différentes : la première, vers les motoneurons, est à l'origine des réflexes extéroceptifs qui correspondent à une réaction de protection de l'organisme vis-à-vis d'un stimulus potentiellement dangereux pour son intégrité ; la seconde, vers les structures supra-spinales.

I.3.3. Le transfert vers l'encéphale

La majeure partie des messages nociceptifs croise la ligne médiane au niveau de la commissure grise ventrale, après avoir été relayée par les neurones de la corne dorsale, puis empruntent les voies ascendantes ventro-latérales ce qui est illustré dans la Figure 2.

Schématiquement, les neurones nociceptifs se projettent principalement vers la formation réticulée, le mésencéphale et le thalamus, mais aussi vers le noyau du tractus solitaire (NTS dans la Figure 2) et le bulbe ventro-latéral. Bien que ne participant pas directement à la perception douloureuse, ces derniers interviennent dans les réactions neurovégétatives qui l'accompagnent, notamment l'augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle. On constate ainsi que l'organisation de ces projections est bien différente de celle qui transmet les informations tactiles et proprioceptives au travers du système lemniscal : elle concerne de nombreuses structures étagées à tous les niveaux hiérarchiques du système nerveux central, de telle sorte que c'est le cerveau dans son ensemble, depuis le bulbe jusqu'au cortex cérébral, qui est informé de la survenue d'un événement nociceptif.

I.3.3.1. Le faisceau spino-thalamique

Ce faisceau rassemble des neurones qui cheminent dans le cadran ventro-latéral de la moelle, du côté controlatéral à leur site d'origine. Les neurones issus de la corne dorsale se projettent sur le thalamus latéral. Les neurones issus des couches VII et VIII de la corne ventrale se terminent dans les

régions médianes du thalamus. Il existe cependant un certain recouvrement entre ces deux populations puisque certains neurones projettent à la fois sur les parties médiane et latérale du thalamus (Adam et Le Bars (2006)). Ce faisceau était anciennement divisé en un tractus néospinothalamique qui conduisait la douleur dite « rapide » des fibres A δ de manière monosynaptique jusqu'à l'encéphale et le tractus paléospinothalamique qui conduisait la douleur dite « lente » des fibres C de manière polysynaptique jusqu'à l'encéphale.

I.3.3.2. Le faisceau spino-réticulaire

Les mêmes régions de la substance grise médullaire donnent naissance à des neurones spino-réticulaires dont les axones cheminent également dans le quadrant ventro-latéral. Les régions cibles du faisceau spino-réticulaire sont les noyaux gigantocellulaire (GI dans la Figure 2) et réticulaire latéral, qui reçoivent des fibres issues de la corne ventrale, et une région très caudale, dénommée *subnucleus reticularis dorsalis* (SRD), qui reçoit des fibres issues des couches I et V à VII. La mise en évidence de fibres ascendantes se projetant à la fois au niveau réticulaire et thalamique est une preuve anatomique supplémentaire de la complémentarité de ces deux systèmes (Le Bars et Willer (2004)).

I.3.3.3. Les faisceaux spino-mésencéphaliques

Les faisceaux spino-mésencéphaliques se projettent essentiellement sur deux structures du tronc cérébral : la substance grise périaqueducule (SGPA dans la Figure 2) et l'aire parabrachiale (PB dans la Figure 2), située dans la région dorso-latérale du pont. L'aire parabrachiale reçoit des informations en provenance de la couche I de la moelle par des fibres qui cheminent dans le funicule dorso-latéral (Adams et Le Bars (2006)).

I.3.3.4. Autres faisceaux

Certains faisceaux ne sont connus que chez l'animal. Ainsi, les neurones à convergence pourraient également envoyer des messages nociceptifs vers les centres supérieurs, notamment thalamiques, *via* le faisceau spinocervical (de Morin) et les cordons dorsaux. Quant aux neurones de la corne ventrale, ils projettent essentiellement sur la formation réticulée bulbaire et le thalamus médian. Enfin, l'ensemble des neurones nociceptifs spinaux se projette vers le noyau du tractus solitaire. Bien que ne participant probablement pas directement à la perception douloureuse, ce dernier faisceau pourrait intervenir dans les réactions neurovégétatives qui l'accompagnent, notamment l'augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle (Le Bars et Willer (2004)).

I.4. Le traitement des messages nociceptifs dans l'encéphale

Nous venons de souligner la multiplicité des voies ascendantes susceptibles de faire parvenir les messages nociceptifs jusqu'au cerveau. L'étage le plus étudié est le thalamus, où se trouvent les relais majeurs de toutes les informations sensorielles vers le cortex cérébral. Les relais bulbaire et ponto-mésencéphaliques sont cependant des structures largement impliquées, elles aussi, dans les processus de traitement de l'information nociceptive.

I.4.1. les relais réticulaires

La formation réticulée bulbaire correspond à une zone de contrôle et d'interactions de multiples systèmes, principalement la vigilance, la respiration, la régulation cardio-vasculaire, la motricité et la nociception. La plupart des neurones de cette structure sont activés par différentes modalités sensorielles. Cependant, il existe un noyau dans la partie caudale du bulbe, le SRD, qui joue un rôle spécifique dans la douleur. Ses neurones sont activés de façon quasi exclusive par les stimuli nociceptifs quelle que soit la partie du corps concernée, qu'elle soit somatique ou viscérale. L'information somatotopique y est donc perdue. En revanche, ces neurones encodent fidèlement l'intensité des stimulations nociceptives. Ce noyau se projette massivement vers le thalamus médian et constitue un relais essentiel des voies spino-réticulo-thalamiques. Ses neurones émettent également des axones descendants vers tous les segments de la moelle et jouent un rôle important dans des mécanismes spino-bulbo-spinaux de régulation.

I.4.2. Les relais bulbaires, pontiques et mésencéphaliques

Si l'on rencontre des neurones répondant aux stimulations nociceptives dans la formation réticulée et la SGPA, la région ponto-mésencéphalique la plus intéressante à cet égard est sans conteste l'aire parabrachiale latérale qui reçoit directement les informations issues de la couche I de la corne dorsale de la moelle. On y enregistre de nombreux neurones nociceptifs dont les champs sont de taille variable mais sans organisation somatotopique. Les cibles majeures de projection de ces neurones sont le noyau central de l'amygdale et l'hypothalamus ; il semble donc raisonnable de leur attribuer un rôle important dans les processus végétatifs, émotionnels et endocriniens liés à la douleur.

Mais ce ne sont pas les seuls, comme en témoigne le schéma bilan des voies de la douleur (Figure 2). En effet, les informations nociceptives parviennent également à la région bulbaire ventrolatérale rostrale et caudale (RBVLR et RBVLC dans la Figure 2) qui commandent les neurones préganglionnaires orthosympathiques et au noyau du tractus solitaire, principale source de régulation du système parasympathique *via* les noyaux du nerf vague. Au total, le tronc cérébral est le siège d'un intime enchevêtrement des systèmes nociceptifs et végétatifs, ce qui suggère l'appareillement de la nociception à un système homéostatique plus vaste. Ainsi, la pression artérielle est-elle non seulement sous l'influence des barorécepteurs et des chémorécepteurs mais aussi du système sensoriel. En outre, elle se trouve également sous la dépendance des états mentaux et émotionnels par l'intermédiaire de l'amygdale.

Les deux régions médianes que sont la SGPA et la région bulbaire rostro-ventrale (RBVM) redistribuent l'information nociceptive vers quelques cibles privilégiées, notamment la moelle. L'aire parabrachiale et l'amygdale peuvent aussi influencer l'axe hypothalamo-hypophysaire corticotrope soulignant l'intime rapport entre stress et douleur (Le Bars et Willer (2004)).

I.4.3. Les relais thalamiques

La complexité de l'organisation thalamique résulte de la multiplicité des voies susceptibles d'y acheminer des messages nociceptifs. Elles sont schématiquement de deux types dont les propriétés fonctionnelles sont différentes :

- Les voies qui se terminent dans le thalamus latéral où une certaine somatotopie est conservée,

- Les voies qui se terminent dans le thalamus médian. Il s'agit de neurones dont le champ récepteur périphérique est diffus (non somatotopique). Ils jouent un rôle non pas dans la composante sensorielle discriminante de la douleur mais dans l'élaboration de réactions motrices et émotionnelles liées à la douleur.

I.4.4. Les relais corticaux

Une participation du cortex cérébral dans la douleur a longtemps été un objet de controverses. Aujourd'hui, grâce aux nouvelles techniques d'imagerie fonctionnelle, sa contribution ne fait plus de doute. On a pu montrer que les cortex somesthésiques primaire et secondaire sont bien activés par des stimulations nociceptives mais dans une moindre mesure que les cortex cingulaire et insulaire. Rappelons que ces derniers appartiennent au système limbique dont le rôle est primordial dans la genèse des émotions. C'est en fin de compte un ensemble d'aires cérébrales qui concourent probablement à l'élaboration de la perception de la douleur.

I.5. Les mécanismes de contrôle des neurones spinaux impliqués dans la nociception

I.5.1. Les contrôles segmentaires

Nous avons souligné la multiplicité des influences excitatrices qui s'exercent sur les neurones à convergence. Cependant, l'activation des afférences cutanées de grand diamètre, responsables des sensations tactiles, peut déprimer les réponses de neurones spinaux aux stimuli nociceptifs. Il est généralement admis que ces phénomènes sont déclenchés par l'activation des fibres A β , mais c'est de l'activation des fibres A δ que résultent les inhibitions les plus puissantes. Ces effets, d'origine essentiellement métamérique, dérivent directement des propriétés des champs récepteurs des neurones de la corne dorsale dont une partie est bien excitatrice, mais une autre inhibitrice. Appliquées sur cette dernière, des stimulations naturelles non nociceptives mais répétitives sont capables d'inhiber les réponses déclenchées par stimulation de la partie excitatrice du champ récepteur. L'organisation de ces champs permet d'expliquer pourquoi l'application de stimulations non nociceptives sur une grande surface corporelle n'active pas un grand nombre de neurones à convergence pour générer un faux message nociceptif, du moins dans des conditions physiologiques. Cette éventualité est prévenue par l'activation concomitante de nombreux champs inhibiteurs dont la fonction sera d'atténuer la réponse globale.

Ces phénomènes d'inhibition segmentaire sont contrôlés probablement par l'intermédiaire d'acides aminés inhibiteurs comme la glycine ou le l'acide γ -aminobutyrique (*Gamma AminoButyric Acid* = GABA) et *via* les récepteurs aux opioïdes situés sur les terminaisons nerveuses des neurones afférents primaires et sur les interneurons des couches superficielles de la corne dorsale.

I.5.2. Les contrôles d'origine supraspinale

Ces contrôles sont principalement exercés depuis le tronc cérébral. Les contrôles d'origine thalamique, hypothalamique et corticale sont moins bien connus. La stimulation localisée de diverses structures bulbaires est capable d'induire une profonde analgésie. La stimulation localisée de la SGPA et de la RBVM, qui contient le noyau du raphé magnus, le noyau paragigantocellulaire et le noyau gigantocellulaire, est capable d'induire une profonde analgésie sans affecter, semble-t-il, les autres fonctions sensorielles. La stimulation électrique de la SGPA provoque une analgésie suffisante

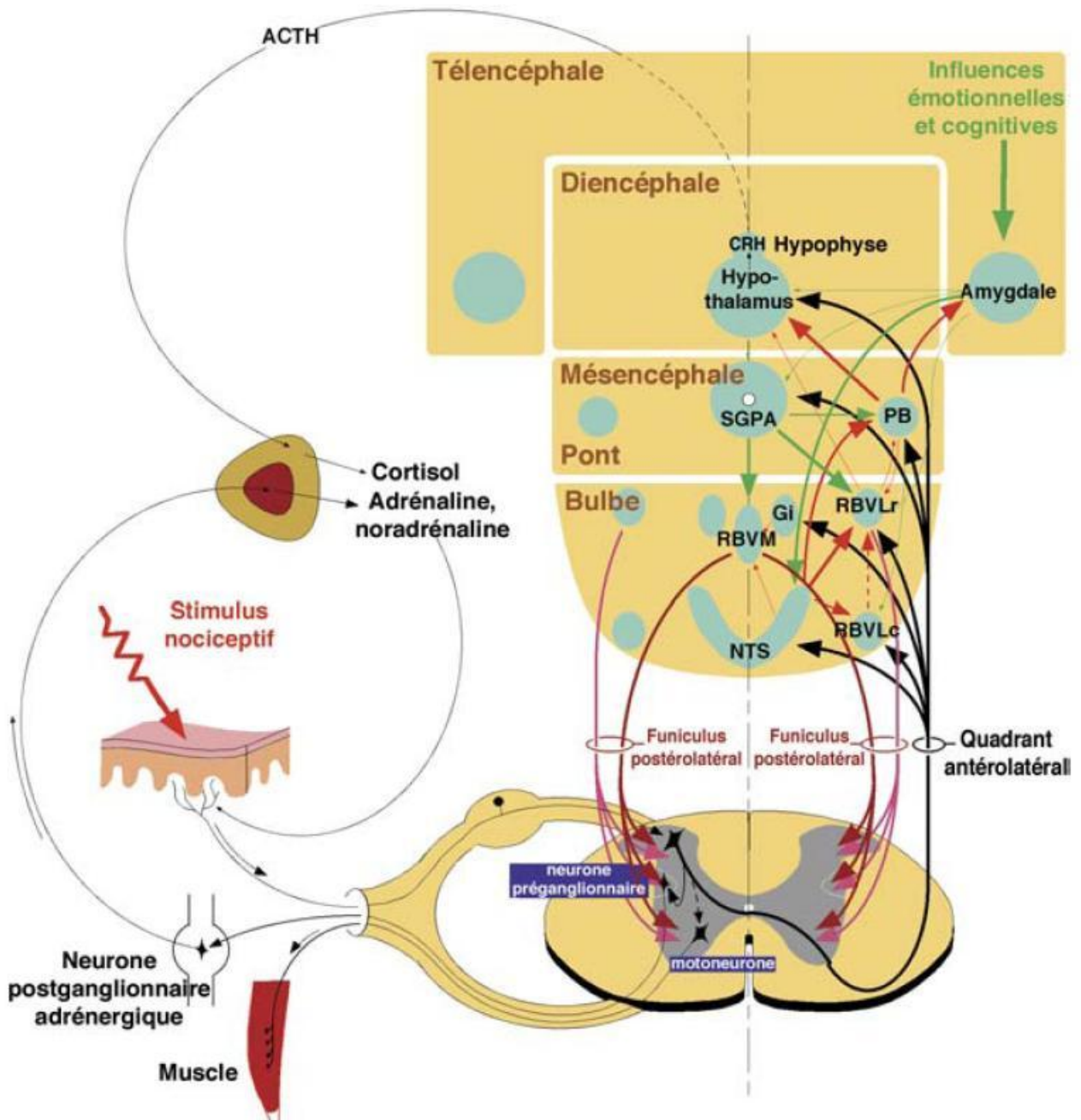
à la réalisation d'une chirurgie abdominale chez le rat sans anesthésie générale (Gebhart (2004)). Cette analgésie résulterait de l'activation de voies inhibitrices descendantes qui bloquent la transmission spinale des messages nociceptifs, en libérant dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle différents composés comme la sérotonine (en provenance de la RBVM (flèches violettes dans la Figure 2)), la noradrénaline (en provenance du *locus coeruleus* (flèches roses dans la Figure 2)) ou les opioïdes endogènes. Ce mécanisme permet de masquer une douleur par une autre ce qui est illustré par l'utilisation du tord-nez en contention équine et de la pince mouchette en contention bovine.

I.5.3. Les contrôles inhibiteurs diffus

Nous savons maintenant que la transmission des messages nociceptifs est modulée par de puissants contrôles dès les premiers relais médullaires, à la fois par des mécanismes segmentaires et par des systèmes qui mettent en jeu des structures supraspinales. Si les mécanismes segmentaires peuvent bien être déclenchés par stimulation du métamère correspondant, certains contrôles inhibiteurs descendants le sont également par la stimulation d'autres parties du corps. En effet, les neurones à convergence de la corne dorsale sont très fortement inhibés lorsque l'on applique une stimulation nociceptive, et uniquement si elle est nociceptive, sur une quelconque partie du corps, différente de leur champ périphérique excitateur. Ce phénomène a été dénommé « Contrôles Inhibiteurs Diffus induits par stimulation Nociceptive » (CIDN). A l'inverse des inhibitions segmentaires, les CIDN disparaissent chez l'animal dont la moelle est sectionnée au niveau cervical ce qui suggère l'implication d'une structure supérieure. Les parties les plus caudales du tronc cérébral seraient à l'origine de ce phénomène. Enfin, chez l'homme comme chez l'animal, il existe au moins un relais opioïdérique dans la boucle spino-bulbo-spinale qui caractérise les CIDN.

On peut imaginer que l'activation permanente d'une partie des neurones à convergence sous l'effet de stimuli non nociceptifs produit une sorte de bruit de fond au niveau des centres supérieurs dont les centres cérébraux. Ainsi, un message significativement nociceptif en serait difficilement extrait. Les CIDN pourraient jouer un rôle de filtre. En effet, lorsqu'un foyer nociceptif apparaîtrait dans une région corporelle, les neurones à convergence et spécifiquement nociceptifs segmentaires seraient activés et enverraient un message excitateur vers les centres supérieurs. Ce signal activerait secondairement les CIDN qui iraient inhiber l'ensemble des neurones à convergence spinaux et trigéminaux qui n'étaient pas directement concernés par le stimulus initial augmentant ainsi le contraste entre le signal nociceptif et le « silence » des autres neurones à convergence. L'acupuncture traditionnelle, sans électricité, aurait des effets analgésiques en entretenant un bruit de fond élevé pour masquer la douleur (Le Bars et Willer (2004)).

Figure 2 : Schéma bilan des voies de la douleur de la genèse de l'influx nerveux à l'inhibition par les différents noyaux cérébraux (d'après Le Bars et Willer (2004)) :



II. Physiologie de la douleur

II.1. La genèse du potentiel d'action au niveau des terminaisons libres des nocicepteurs

II.1.1. Les nocicepteurs « peptidergiques » et « non peptidergiques »

Nous avons vu qu'il existe deux types de fibres afférentes primaires qui transmettent les informations nociceptives. Cependant, les fibres sensorielles amyéliniques ne constituent pas un groupe homogène. Ainsi, en fonction de leur profil neurochimique, il est possible de classer les fibres C en deux sous-groupes. La première population, dite peptidergique, synthétise notamment la substance P et son récepteur NK1, la galanine et le peptide lié au gène de la calcitonine (*Calcitonin Gene Related Peptide* = CGRP). Elle exprime le récepteur tyrosine kinase A (trkA) aux neurotrophines et est sensible au facteur de croissance des nerfs (*Nerve Growth Factor* = NGF). Ce sont ces fibres qui sont à l'origine de l'inflammation neurogène. La seconde population n'exprime ni la substance P ni le CGRP, elle est dite non peptidergique. Elle exprime le proto-oncogène tyrosine kinase (Trk) RET, récepteur d'une autre famille de facteurs de croissance, celle du facteur neurotrophique dérivé de la glie (*Glial Derived Neurotrophic Factor* = GDNF) et exhibe sur sa membrane le récepteur purinergique P2X3. Ce groupe de fibres se caractérise aussi par une forte densité de canaux sodiques et, par conséquent, par la faiblesse des courants induits et la durée particulièrement longue des potentiels d'action. Ces propriétés ont des conséquences fonctionnelles. En effet, le seuil d'activation est plus élevé avec une réponse moins fournie mais l'efficacité de la synapse est accrue. Enfin, ces deux sous-populations de fibres nociceptives se projettent différemment dans la corne dorsale de la moelle épinière. Les fibres peptidergiques se jettent dans les couches les plus superficielles, c'est-à-dire les lames I et II externe alors que les fibres non peptidergiques se jettent uniquement dans la lame II interne (Adam et Le Bars (2006)).

II.1.2. Les récepteurs élémentaires

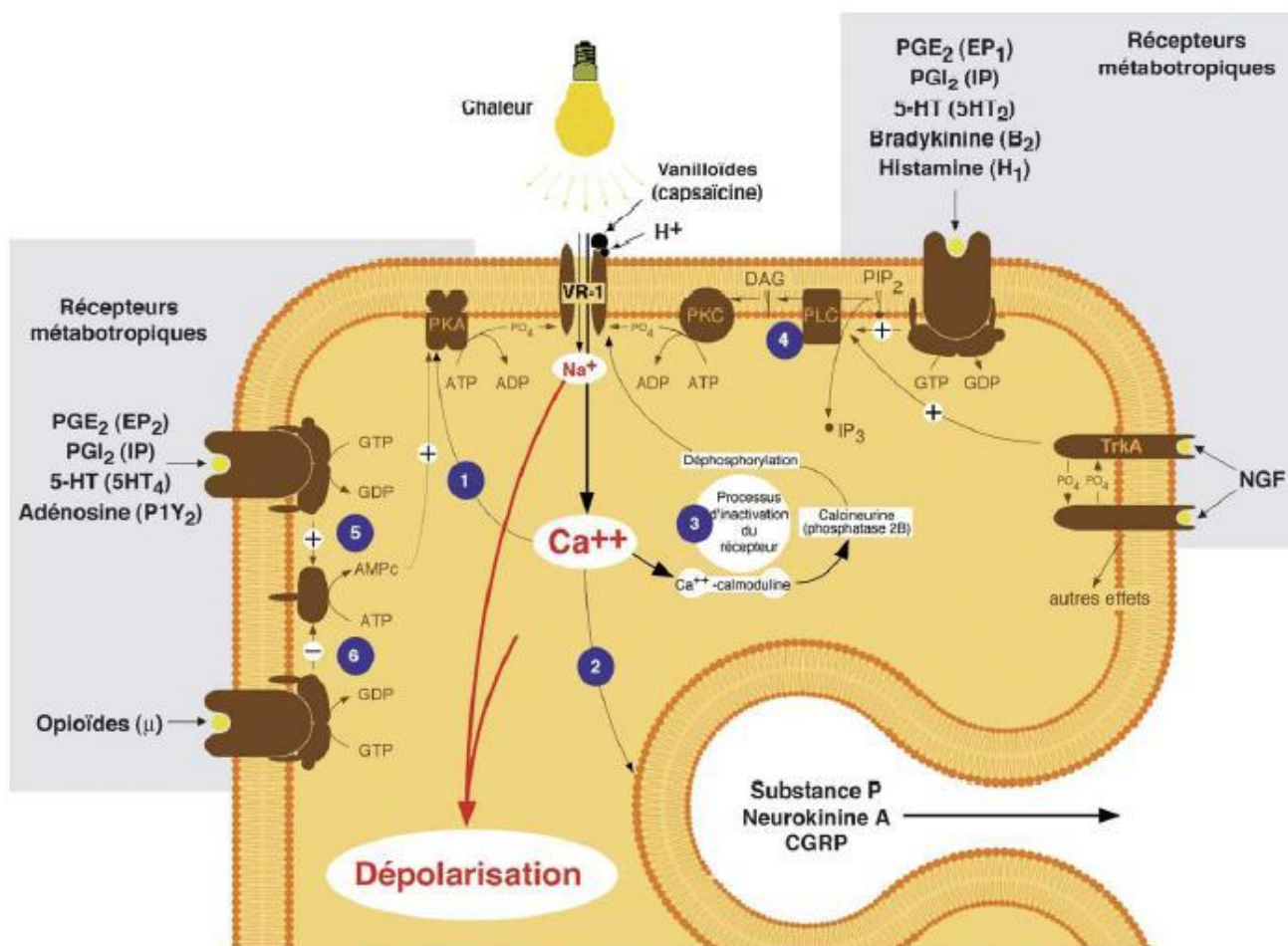
Les récepteurs élémentaires les mieux connus sont ceux qui répondent à la chaleur, à l'acidité et à l'adénosine triphosphate (ATP), respectivement les récepteurs vanilloïdes, les canaux ioniques sensible à l'acidité (Acid-Sensing Ion Channel = ASIC) et les récepteurs purinergiques. Des récepteurs capables de détecter des stimuli nociceptifs mécaniques et au froid sont décrits chez des invertébrés mais il n'y a pas assez d'information pour extrapoler à l'homme.

II.1.2.1. Les canaux à potentiel récepteur transitoire (Transient Receptor Potential = TRP)

Le récepteur ionotropique vanilloïde TRPV-1 s'active lorsque la température atteint ou dépasse 48°C. Les protons et la capsaïcine (extrait du piment) ne l'activent pas directement mais abaissent considérablement son seuil de déclenchement au point que la température ambiante est capable de l'activer. Son seuil est également abaissé lorsque le récepteur est phosphorylé. La phosphorylation est déclenchée par l'intermédiaire d'une protéine kinase A (PKA), elle-même activée par les prostaglandines et la sérotonine, ou par l'intermédiaire d'une protéine kinase C (PKC), elle-même activée par la bradykinine et l'histamine. L'activité du TRPV-1 est donc réglée avec finesse par son environnement biochimique, cette modulation se traduisant par exemple par la baisse du seuil de déclenchement du signal d'alarme en cas d'inflammation. Une fois ouvert, le canal laisse

passer tous les cations avec une préférence pour le calcium (Le Bars et Willer (2004)). Deux autres canaux TRP, le TRPV-4 et le TRPA-1, semblent jouer un rôle dans le déclenchement d'influx nociceptifs (Patapoutian *et al.* (2009)). La Figure 3 illustre le fonctionnement de TRPV-1 en fonction de son environnement.

Figure 3 : Modalités de l'activation du neurone afférent primaire sous l'effet de la chaleur (d'après Le Bars et Willer (2004)) :



Le récepteur TRPV-1 est directement sensibilisé par le pH extracellulaire et par la fixation avec un vanilloïde comme la capsaïcine ou indirectement par diverses substances inflammatoires. Une fois ouvert, l'entrée de calcium provoque une chaîne de réaction qui n'a rien de spécifique au nocicepteur : 1- la phosphorylation du récepteur par une PKA amplifie l'ouverture de canaux, 2- le calcium permet l'exocytose de peptide, notamment de substance P responsable du réflexe d'axone dont nous parlerons plus tard, 3- le calcium amplifie l'inactivation du récepteur, 4- les PKC sont activées par un phospholipase C (PLC), elle-même sous la dépendance d'un récepteur métabotrope (partie supérieure à droite) et de tyrosine kinase, telle TrkA, récepteur à haute affinité du NGF. Quant au PKA, elles sont couplées à des protéines G 5- stimulatrices Gs ou 6- inhibitrices Gi par l'intermédiaire de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (partie gauche de la figure). PG : prostaglandine ; 5-HT : 5-hydroxytryptamine (sérotonine) ; GDP : guanosine diphosphate ; GTP : guanosine triphosphate ; DAG : diacylglycérol ; PIP₂ : phosphatidylinositol biphosphate ; IP₃ : inositol triphosphate.

II.1.2.2. Les canaux ioniques sensibles à l'acidité (Acid Sensing Ion Channel = ASIC)

Les canaux ASIC font partie de la superfamille des canaux sodique bloqués par l'amiloride. Ils s'activent dès que le pH atteint 6,9, une valeur proche de la valeur physiologique et laissent passer le sodium. Le pH des tissus enflammés pouvant baisser jusqu'à 5,5, il en résulte que le moindre phénomène inflammatoire ou lésionnel s'accompagnera d'une activation de ces récepteurs. Cette propriété est intéressante car une baisse du pH extracellulaire se traduit normalement par une baisse de l'excitabilité neuronale. Les nocicepteurs représentent donc à cet égard une exception (Adam et Le Bars (2006)).

Sept sous-unités différentes de canaux ASIC existent (ASIC1a, ASIC1b, ASIC1b2, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 et ASIC4). Les canaux fonctionnels sont composés de trois sous-unités qui peuvent être homologues ou hétérologues, on parlera de canaux homomériques ou hétéromériques, respectivement (Deval *et al* (2008)). Les ASIC1a et les ASIC2 sont largement présents dans le système nerveux central et périphérique alors que les ASIC1b et ASIC3 sont cantonnés sur les nerfs sensitifs périphériques (Deval *et al.* (2010)).

II.1.2.3. Les récepteurs purinergiques

Il existe deux types de récepteurs purinergiques qui sont activés par ATP : les récepteurs P2X qui sont de types canaux ioniques et P2Y qui sont des récepteurs métabotropiques (récepteurs couplés à une protéine G = *G Protein Coupled Receptors* = GPCR). Parmi les récepteurs ionotropiques de l'ATP, le plus intéressant est le récepteur P2X3 qui n'est exprimé que par les neurones non peptidergiques qu'il active. Chez le volontaire sain, l'injection d'ATP provoque une douleur de faible intensité. En revanche, en cas d'inflammation, l'effet algogène de l'ATP est considérablement renforcé. Cet effet est lié, d'une part, à la libération accrue d'ATP par les cellules endothéliales lésées et, d'autre part, à l'augmentation de la synthèse de récepteurs P2X3. L'ATP est hydrolysée en adénosine, elle-même capable d'agir en synergie en se fixant au récepteur P1 qui active les nocicepteurs (Le Bars et Willer (2004)).

II.1.3. Les canaux sodiques voltage-dépendants

Les canaux sodiques voltage-dépendants sont constitués d'une sous-unité α (notée $Na_v1.1$ à 1.9) qui forme le pore et d'une sous-unité β (notée de 1 à 4) qui modifie le déclenchement et la cinétique du canal. La sous-unité α est composée de quatre domaines transmembranaires homologues (I à IV) mais non identiques chacun formé de six hélices α transmembranaires (S1 à S6). Avec ses nombreuses charges positives, S4 est le principal capteur de voltage du canal (Klint *et al.* (2012)).

Les neurones des ganglions des racines dorsales de la moelle épinière expriment deux types de canaux sodiques voltage-dépendants : les canaux résistants à la tétrodotoxine (TTX-R) et ceux dits sensibles à cette toxine (TTX-S). Parmi les sensibles, le $Na_v1.7$ semble posséder un rôle majeur dans la nociception car des populations du nord du Pakistan présentant une mutation au niveau de la séquence codant ce canal ne ressentent pas de douleur. Deux autres canaux, résistants à la TTX-R, semblent impliqués avec une moindre importance dans le mécanisme de nociception, ce sont les isoformes $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$ (Cummins *et al.* (2007)).

Les canaux TTX-S se déclenchent à de faibles voltages et s'inactivent rapidement, ils sont à l'origine des potentiels d'action, alors que les TTX-R s'activent à des seuils élevés et s'inactivent lentement. Les courants TTX-R sont augmentés par plusieurs médiateurs « hyperalgésiques » par

l'intermédiaire de PKA (prostaglandine, sérotonine) ou de PKC (bradykinine, histamine) comme le montre la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** De plus, la synthèse de canaux TTX-R est augmentée en cas d'inflammation (Le Bars et Willer (2004)).

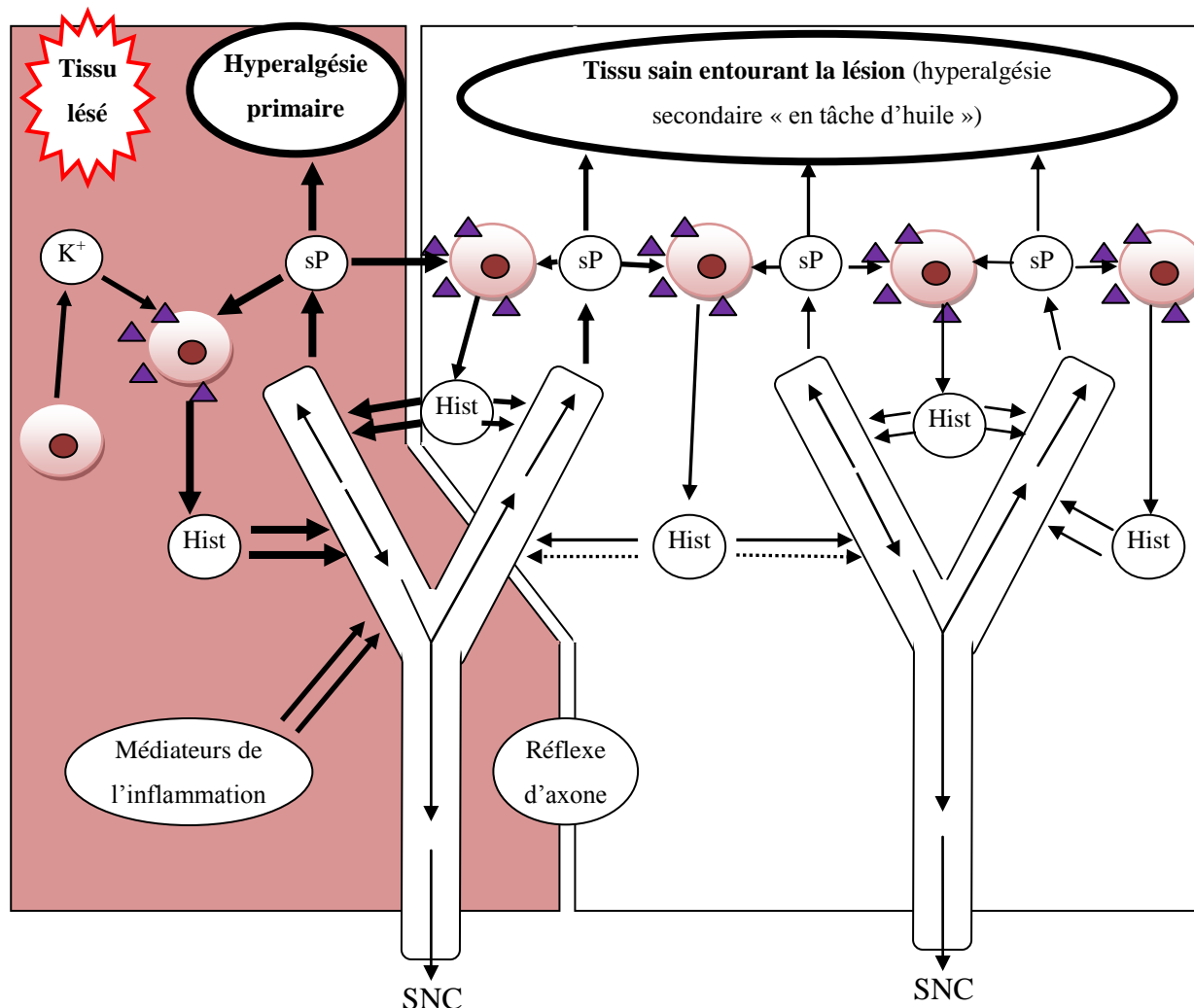
II.2. Rôle de l'inflammation

La majorité des nocicepteurs ont, outre leur capacité à réagir à certaines variations thermiques et mécaniques, un caractère commun, celui d'être également des chémorécepteurs. En réalité, si un stimulus nociceptif est bien capable de déclencher une sensation de douleur, la lésion tissulaire qu'il aura provoquée sera responsable d'une série d'événements étroitement liés au processus inflammatoire engendré par la lésion. Cela va prolonger l'activation des nocicepteurs, induire une sensibilisation et activer des nocicepteurs qui étaient jusqu'alors insensibles à l'application d'un stimulus nociceptif, on parle de nocicepteurs « silencieux » (Gaynor et Muir (2009)). Ces substances algogènes peuvent être formées localement ou être circulantes, leur action étant alors facilitée par la fréquente contiguïté des terminaisons libres des fibres A δ et C avec les artérioles et les veinules.

Ces substances peuvent être classées en trois groupes en fonction de leur principale origine. Elles peuvent être sécrétées par les cellules lésées, les cellules de la lignée inflammatoire ou par les nocicepteurs eux-mêmes. La lésion tissulaire est à l'origine de la libération d'ATP et d'ions H⁺ qui proviennent des cellules endommagées. Avec la bradykinine, ce sont les seules substances excitatrices à proprement parler, les autres étant avant tout sensibilisatrices. Les mastocytes libèrent l'histamine, prurigineuse et douloureuse à concentration plus élevée, ainsi que la sérotonine, issues en outre des agrégats plaquettaires. Les prostaglandines et probablement les leucotriènes sensibilisent également les nocicepteurs aux stimuli physiques et à l'action d'autres substances. La synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique est déclenchée dans les cellules exposées à des agents pro-inflammatoires tels les cytokines, les mitogènes, les endotoxines. Cette synthèse est possible grâce à l'action de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2). Quant aux macrophages, ils libèrent des cytokines (le *tumor necrosis factor* TNF- α , les interleukines (IL) 1- β , IL6, IL8) et des neurotrophines (NGF).

L'amplification du message est assurée, non seulement par les substances libérées au sein du foyer inflammatoire, mais également par le biais d'un recrutement supplémentaire de fibres adjacentes activées ou sensibilisées, notamment par le phénomène de réflexe d'axone décrit dans la Figure 4. La partie gauche de la Figure 4 résume les processus qui se développent au sein du tissu responsable de l'hyperalgésie primaire. L'ensemble de ces facteurs est à l'origine de l'activation directe ou indirecte des nocicepteurs. Ils envoient le message nociceptif non seulement vers le système nerveux central mais aussi, *via* le réflexe d'axone, vers la périphérie. Il résulte de cette activation antidromique une libération de substance P par les terminaisons libres amyéliniques. Ce neuromédiateur est directement responsable en plus d'une vasodilatation et d'une augmentation de la perméabilité vasculaire, d'une dégranulation des mastocytes. Cette dernière est à l'origine de la libération d'histamine (Hist) qui va amplifier les processus vasculaires et activer (flèches pleines) et sensibiliser (flèche en pointillés) les nocicepteurs. Ces mécanismes concernent non seulement les territoires adjacents lésés, ce qui crée un véritable cercle vicieux, mais aussi les territoires non lésés, à l'origine d'une hyperalgésie que certains auteurs nomment secondaire ou en tâche d'huile (partie droite de la Figure 4) (Adam et Le Bars (2006)).

Figure 4 : Schéma du mécanisme d'inflammation neurogène (d'après Adam et le Bars (2006)) :



II.3. Les médiateurs de l'inflammation (Le Bars et Willer (2004))

II.3.1. Les kinines

La bradykinine stimule la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que d'acide arachidonique ce qui a pour conséquence de favoriser la formation de prostaglandine comme l'illustre la Figure 5. Elle déclenche la libération de peptides (substance P, CGRP, neurokinine A) par les terminaisons libres des fibres afférentes primaires ainsi que de monoxyde d'azote. Elle favorise ensuite la dégranulation des mastocytes ce qui engendre la libération d'histamine et de sérotonine. Et enfin, elle intervient dans la phosphorylation de TRPV-1 par l'intermédiaire d'une PKC.

II.3.2. Les cytokines

Les cytokines pro-inflammatoires libérées par les lymphocytes, les monocytes et les macrophages peuvent être classées selon la puissance de leur effet hyperalgésique de la façon suivante : $IL1\beta > TNF\alpha \gg IL8 \gg IL6$.

II.3.3. Les prostanoïdes

Les prostanoïdes sont synthétisés à partir de l'acide arachidonique sous l'action des cyclo-oxygénase-1 et 2 (COX-1 et COX-2). Ils interagissent avec des protéines G au travers de huit récepteurs différents parmi lesquels trois nous intéressent car ils sensibilisent les fibres afférentes. Il s'agit des récepteurs de la prostaglandine E₂ (PGE₂), EP₁ et EP₂, et du récepteur IP de la prostaglandine I₂ (PGI₂) appelée aussi prostacycline. Ces phénomènes de sensibilisation s'exercent par l'intermédiaire de protéine kinase. Le résultat est la phosphorylation de canaux membranaires ce qui conduit soit, à leur ouverture (TRPV-1, canaux TTX-R, canaux calciques), soit, à leur fermeture (canaux potassiques). Le monoxyde d'azote pourrait faciliter ces mécanismes.

II.3.4. Les neurotrophines

Le NGF, le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (*Brain-Derived Neurotrophic Factor* = BDNF) et la neurotrophine-4/5 déclenchent des phénomènes d'hyperalgésie en se liant à leur récepteurs spécifiques, des Trk (TrkA, TrkB et neurotrophine-4/5). Au cours de l'inflammation, on constate une augmentation de la synthèse de NGF qui est secondaire à la libération de cytokines et d'interleukines par les cellules inflammatoires.

Issu de la liaison du NGF avec son récepteur à haute affinité TrkA, le complexe ligand/récepteur est internalisé puis transporté vers le corps cellulaire du neurone situé dans le ganglion rachidien (comme le montre la Figure 5) pour y modifier la transcription des précurseurs de différents peptides (il augmente la synthèse de substance P, de CGRP et diminue la synthèse de peptide intestinal vasoactif (*Vasoactive Intestinal Peptide* = VIP), de cholécystokinine, de neuropeptide Y et de galanine), de facteurs trophiques (GDNF et BDNF) et de canaux sodiques TTX-R.

Sous l'influence du NGF, le BDNF est surexprimé au niveau des fibres C peptidergiques. Sa libération au niveau de la corne dorsale de la moelle et sa liaison à son récepteur TrkB provoque la phosphorylation des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) par l'intermédiaire d'une PKC.

II.3.5. Les peptides

Comme l'illustre la Figure 4, lors d'une stimulation nociceptive, l'influx nerveux se propage à la fois vers la moelle, mais aussi de façon antidromique vers les autres terminaisons libres de la même fibre (réflexe d'axone). Ces dernières vont libérer des peptides (substance P, CGRP, neurokinine A) qui vont entraîner une vasodilatation et une dégranulation des mastocytes, elle-même à l'origine d'une libération localisée d'histamine. Cette chaîne d'évènements, appelée inflammation neurogène, est à l'origine de l'hyperalgésie en tâche d'huile ou secondaire.

II.3.6. Les récepteurs NMDA et AMPA/kainate

Les fibres afférentes primaires expriment sur leur membrane des récepteurs glutamatergiques, essentiellement ionotropiques acide-2-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionique (AMPA)/kainate et NMDA. La densité de ses récepteurs augmente au cours de l'inflammation. Or, si la noradrénaline n'excite pas les nocicepteurs dans les conditions normales, elle en devient capable lorsqu'un processus inflammatoire a été enclenché. Agissant de concert, l'ensemble de ces phénomènes se potentialise pour augmenter l'activité nociceptive. Au même titre que les peptides, la

source des acides aminés est à rechercher dans les fibres afférentes sensorielles elles-mêmes. Il s'agit à nouveau d'un mécanisme local d'auto-entretien de l'activité nociceptive.

II.3.7. Les récepteurs β -adrénergiques

La noradrénaline n'excite pas les nocicepteurs dans les conditions normales, elle en devient capable lorsqu'un processus inflammatoire est déclenché. Il en est de même pour l'adrénaline. Elles peuvent en revanche les sensibiliser et être génératrices d'hyperalgésie. De tels effets s'exercent probablement par l'intermédiaire de protéines-kinases, essentiellement PKA et dans une moindre mesure PKC, qui régulent les canaux sodiques TTX-R.

II.3.8. les opioïdes

Des récepteurs aux opioïdes sont présents sur les terminaisons périphériques des fibres sensorielles : un tiers environ des fibres C est pourvu de récepteurs δ et/ou μ . Ces récepteurs pourraient contribuer à l'action antinociceptive périphérique des opioïdes qui ne s'exprime significativement que lors d'inflammation.

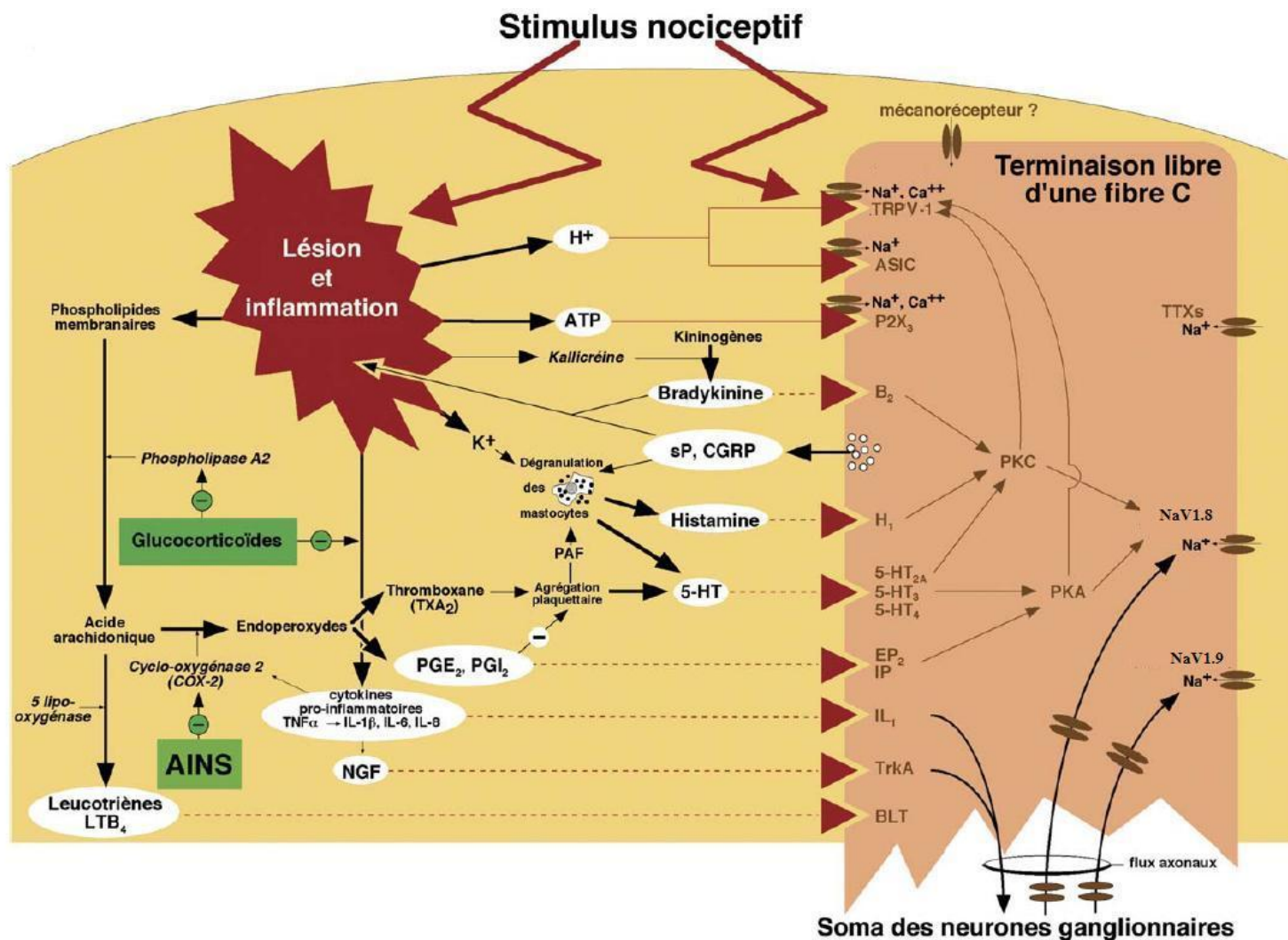
II.4. La libération des neuromédiateurs dans la moelle

Deux groupes principaux de substances sont responsables de la transmission des messages nociceptifs périphériques vers les neurones spinaux. Les acides aminés excitateurs qui sont les neurotransmetteurs à proprement parler et les neuropeptides qui modulent les effets des premiers. Leur libération est déterminée par la concentration de calcium intracellulaire des terminaisons des fibres afférentes primaires. Celle-ci est dépendante des courants calciques mais également de l'activité de récepteurs présynaptiques qui vont favoriser ou inhiber la libération de neuromédiateurs.

II.4.1. Les canaux calciques voltage-dépendants

Comme pour les canaux sodium, les canaux calcium voltage-dépendants sont constitués de plusieurs sous-unités notées α_1 , β , γ et $\alpha_2\delta$. La sous-unité α_1 possède la même structure que la sous-unité α des canaux sodium et les sous-unités auxiliaires en modulent le fonctionnement. Il existe dix sous-unités α_1 identifiées partagées en trois familles notées Ca_v1 , Ca_v2 et Ca_v3 , ainsi que quatre sous-unités β et $\alpha_2\delta$ et neuf sous-unités γ . De nombreuses combinaisons sont donc possibles. Les canaux sont ensuite classés en six types : L, P, Q, N, R et T, selon leur voltage d'activation, leur conductance, le taux d'inactivation ou la sensibilité à des bloqueurs spécifiques. Les deux principaux impliqués dans la nociception sont le canal de type N à haut voltage de déclenchement noté $Ca_v2.2$ et le canal de type T à faible voltage de déclenchement noté $Ca_v3.2$ (Doan (2010)). La corne dorsale de la moelle possède les types L, N et P/Q parmi lesquels les deux derniers sont abondants sur les fibres afférentes primaires (Le Bars et Willer (2004)). Leur ouverture à l'arrivée du potentiel d'action déclenche la libération des neurotransmetteurs comme le montre la Figure 6.

Figure 5 : Schéma des interactions entre les récepteurs de la terminaison libre et les agents inflammatoires. Les facteurs susceptibles d'activer les nocicepteurs sont représentés en trait plein et ceux susceptibles de les sensibiliser sont en pointillés (d'après Le Bars et Willer (2004)) :



II.4.2. Les récepteurs présynaptiques

La concentration du calcium cytosolique présynaptique est régulée par un certain nombre de mécanismes qui vont favoriser ou inhiber la libération de neuromédiateurs et neuromodulateurs. Ces mécanismes, pour la plupart connus de longue date, sont déclenchés par des récepteurs spécifiques. Parmi ceux qui favorisent la nociception, nous citerons l'ATP (et le récepteur P2X₃), la sérotonine (et les récepteurs 5-HT₃) et les prostaglandines (et les récepteurs EP). Parmi ceux qui inhibent la nociception, nous citerons le GABA (et les récepteurs GABA_A et GABA_B), la noradrénaline (et les récepteurs α_2 adrénergiques), la sérotonine (et les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}) et les opioïdes avec dans l'ordre d'importance $\mu \gg \delta > \kappa$.

II.4.3. Les acides aminés excitateurs

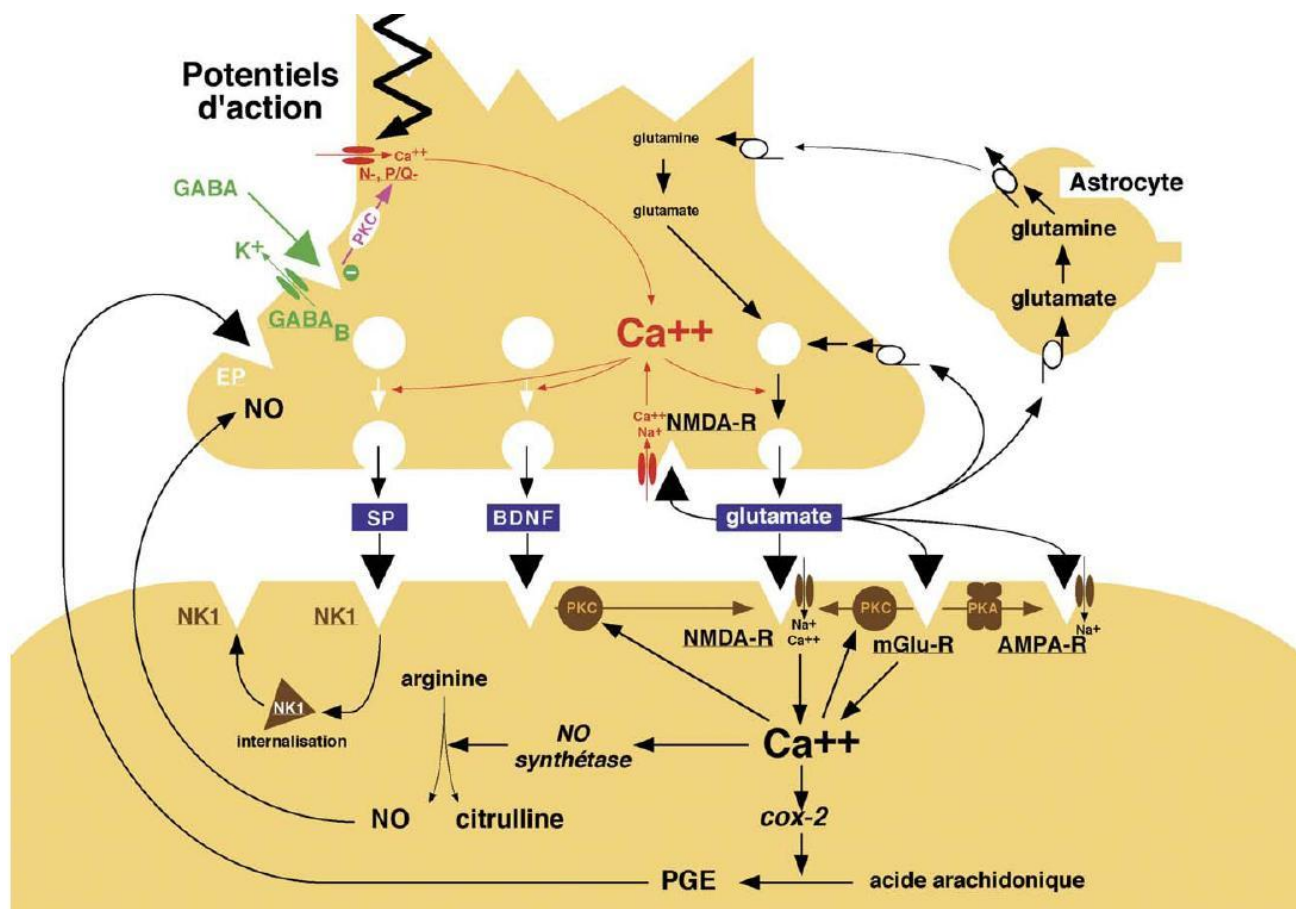
Il s'agit essentiellement du glutamate et de l'aspartate. Leurs récepteurs sont répartis en trois grandes familles que l'on peut observer dans la Figure 6. Les deux premières correspondent aux récepteurs ionotropiques qui règlent l'entrée des cations dans la cellule. On distingue, selon leurs ligands, les récepteurs NMDA et les récepteurs AMPA/kainates. La troisième famille est représentée par les récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G. Le récepteur NMDA a particulièrement retenu l'attention car il est bloqué au repos par un ion magnésium qui n'est évincé du canal que dans deux cas de figure : si la membrane du neurone est suffisamment dépolarisée selon Gilles (2006) ou si deux molécules de glutamate et deux molécules de glycine, son co-agoniste, le stimulent d'après Adam et Le Bars (2006). Cela peut arriver, par exemple, à la suite de l'application d'un stimulus nociceptif particulièrement intense ou prolongé. On attribue au récepteur NMDA un rôle primordial dans l'hyperalgie d'origine centrale et dans l'évolution de la douleur vers la chronicité, d'autant que sa stimulation provoque des modifications à long terme de l'excitabilité des neurones de la corne dorsale de la moelle.

Il existe plusieurs sous-familles de récepteurs couplés à une protéine G. Certains (mGluR1 et mGluR5) sont localisés sur les membranes pré- et postsynaptiques et sont couplés à une chaîne de réactions excitatrices intracellulaires. Cette chaîne consiste soit, en l'activation d'une PLC qui active une PKC pour phosphoryler le récepteur NMDA, soit, en la production d'acide AMP_C qui active ensuite une PKA pour phosphoryler des récepteurs AMPA/kainate. Au total, ces récepteurs métabotropiques sont à l'origine d'une augmentation du calcium cytosolique et d'une amplification des effets des récepteurs ionotropiques du glutamate.

Ces seconds messagers intracellulaires, qui ne sont nullement spécifiques de la nociception, entraînent un ensemble d'évènements cellulaires, notamment la production de monoxyde d'azote (NO) et de COX-2 activant la synthèse des prostaglandines. Après diffusion vers l'élément présynaptique, le NO et les prostaglandines y favorisent l'entrée de calcium.

Le processus d'inactivation du glutamate est simple : une fois libéré dans la fente synaptique, il est capturé par des transporteurs actifs situés sur les membranes des terminaisons de la fibre afférente et des astrocytes qui l'entourent. Ces derniers transforment le glutamate en glutamine qui est libérée puis recapturée de façon active par les fibres afférentes primaires, elles-mêmes la retransformant en glutamate.

Figure 6 : Schéma d'explication de la libération des neuromédiateurs dans la moelle (d'après Le Bars et Willer (2004)) :



II.4.4. Le double effet du NO

Cury *et al.* (2011) décrivent le double effet du NO en ce qui concerne la douleur. Ce messager peut en effet avoir un effet pronociceptif ou antinociceptif. Gilles (2006) explique la synthèse du NO par l'activation des récepteurs NMDA qui augmente la concentration intracellulaire de calcium ce qui favorise la formation de NO à partir de la L-arginine. Le NO va ensuite diffuser à travers les membranes et agir sur les terminaisons nerveuses et les astrocytes à proximité. Plusieurs isoformes de NOS existent : la NOS nerveuse (nNOS), la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS inducible (iNOS). Selon Cury *et al.* (2011), la forte concentration en NO dans la corne dorsale s'explique par les différentes sources de production. En effet, les cellules gliales possèdent une nNOS et la eNOS est présente dans certaines populations de neurones ainsi que dans les cellules des vaisseaux sanguins. En ce qui concerne l'iNOS, son rôle n'est pas bien élucidé. Soit, elle participe aussi à la transmission centrale de la douleur, soit, elle n'est exprimée qu'à la périphérie lors de douleur d'origine inflammatoire ou neuropathique. Au niveau intracellulaire, le NO agit en activant une guanylate cyclase soluble qui permet la synthèse d'un second messager, la Guanosine Mono Phosphate cyclique (GMPc), qui va moduler l'activité de protéines kinases GMPc-dépendantes (cPKG), de canaux ioniques et de phosphodiésterases. Le NO potentialiserait l'effet de la morphine lorsqu'elle est injectée par voie systémique. Il modulerait aussi au niveau supraspinal la transmission des signaux inhibiteurs de la douleur liés aux opioïdes.

II.4.5. Les neuropeptides et les opioïdes

De nombreux peptides sont colocalisés dans les fibres afférentes primaires et sont libérés lors de stimulations nociceptives. Parmi eux, nous pouvons citer la substance P, le CGRP, la cholécystokinine, le neuropeptide FF, la neurokinine A, le peptide VIP, l'arginine-vasopressine, l'ocytocine, le peptide libérant de la gastrine, la galanine, l'angiotensine II, l'hormone corticotrope (ACTH), la dynorphine et les enképhalines. Tous ces peptides peuvent potentiellement moduler les effets des neuromédiateurs à la première synapse des voies nociceptives.

Attardons nous sur les opioïdes endogènes présents dans notre organisme et sur leur mode d'action. Selon McDonald et Lambert (2010) il existe quatre types de récepteurs aux opioïdes. Trois sont dits classiques, il s'agit des récepteurs μ , κ et δ . Un quatrième type a été récemment découvert, il s'agit du récepteur au peptide nociceptine/orphanine FQ (N/OFQ). Ces quatre récepteurs fonctionnent de la même façon. Ils sont couplés à une protéine G sensible à la toxine pertussis. Pleuvry (2005) explique que les récepteurs μ inhibent la synthèse d'AMP_C par l'inhibition de l'enzyme adénylate cyclase et que cette inhibition empêche la sensibilisation des nocicepteurs par les PGE₂. De leur côté, les récepteurs κ et δ préviennent la libération de médiateurs algogènes induits par la bradykinine. Selon ce même auteur, au niveau de la corne dorsale de la moelle, les récepteurs μ et les δ favorisent la fermeture des canaux calciques voltage dépendants et l'ouverture des canaux potassiques ce qui aboutit à une hyperpolarisation des neurones et à une diminution de la libération de glutamate et de substance P. Ces deux types de récepteurs fonctionnent en synergie comme le souligne Gray *et al.* (2006) alors que les μ et κ sont plutôt antagonistes. En effet, les neurones primaires sont inhibés par les molécules qui ciblent les κ mais les cellules qui expriment les μ vont, en présence de leur ligand et par l'intermédiaire de collatérales libérant du GABA, inhiber les interneurons inhibiteurs des cellules primaires ce qui aboutit à une désinhibition de ces cellules. Les opioïdes sont responsables en partie de l'inhibition segmentaire de la douleur.

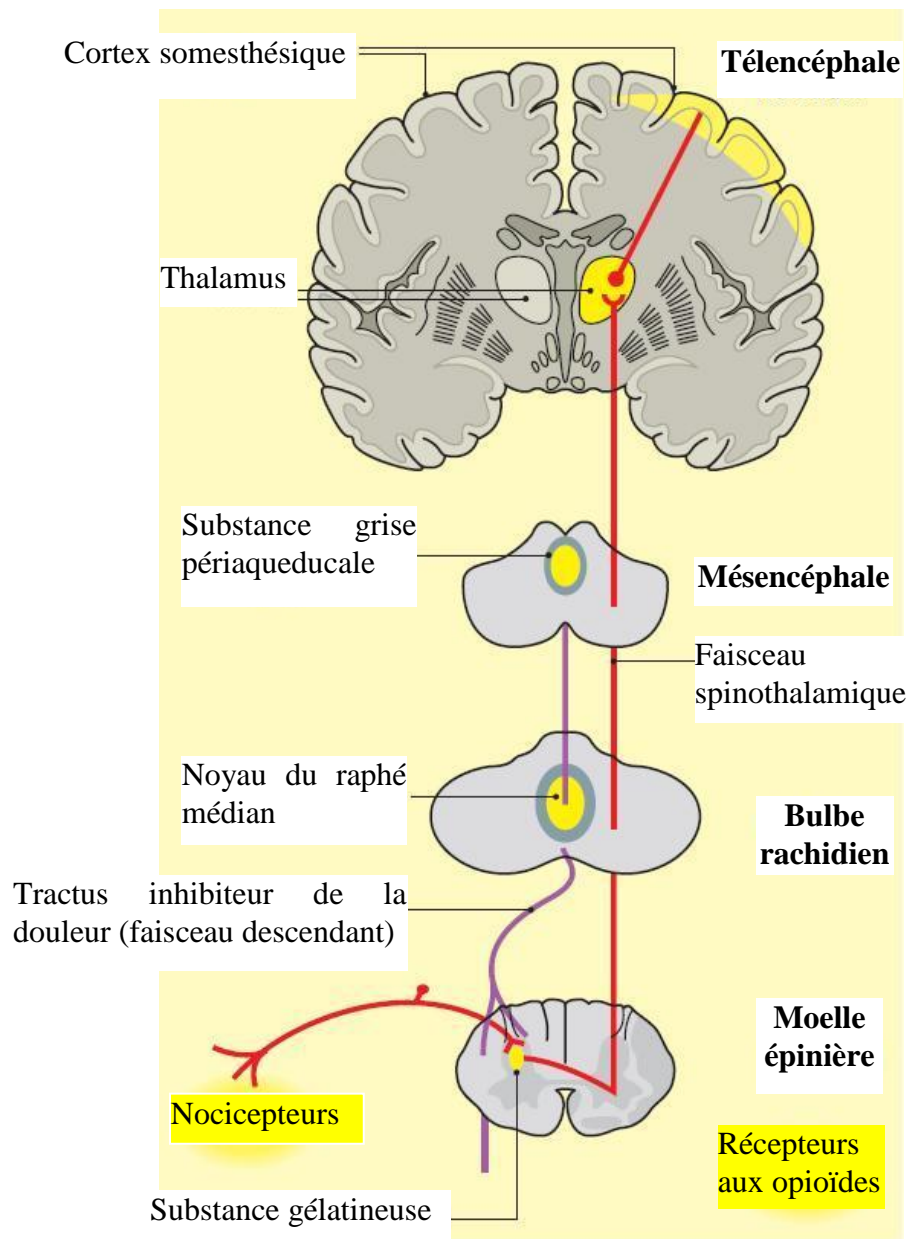
Selon Pleuvry (2005), les peptides opioïdes endogènes incluent la dynorphine A et B qui se fixent préférentiellement sur les récepteurs κ , la Met-enképhaline et la Leu-enképhaline qui ciblent les récepteurs δ , l'endomorphine-1 et 2 qui se fixent sur les récepteurs μ et la β -endorphine qui possède une activité sur les trois récepteurs classiques mais montre une préférence pour les récepteurs μ . Ces indications ainsi que la séquence de ces peptides sont résumées dans le Tableau 2.

La substance gélatineuse n'est pas la seule structure riche en récepteurs aux opioïdes. L'encéphale possède lui aussi des régions qui fixent la fluorescence lors d'études immunohistochimiques. Ainsi, Gray *et al.* (2006) ont montré la présence des trois récepteurs classiques dans la SGPA, d'une majorité de μ dans le *locus coeruleus*, et de μ et κ dans les noyaux du raphé médian et gigantocellulaires. Pleuvry (2005) rajoute à cette liste le système limbique qui est le siège de la douleur émotionnelle, le thalamus et le cortex qui permettent de contrôler la douleur et enfin la partie ventro-latérale du bulbe rachidien où siège le centre de la respiration.

Tableau 2 : Séquence et cibles des opioïdes endogènes (d'après Pleuvry (2005) et Mizoguchi *et al.* (2011)):

Peptides	Récepteur préférentiellement activé	Séquence en acides aminés
Met-enképhaline	δ	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH
Leu-enképhaline	δ	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH
Dynorphine A	κ	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH
Dynorphine B	κ	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr-OH
α -Néo-endorphine	κ	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys-OH
β -Néo-endorphine	κ	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-OH
β -endorphine	μ	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Gln-OH
Endomorphine-1	μ	Tyr-Pro-Trp-Phe-NH ₂
Endomorphine-2	μ	Tyr-Pro-Phe-Phe-NH ₂
Nociceptine / Orphanine FQ	ORL-1	Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Ala-Asn-Gln

Figure 7 : Schéma de la position des récepteurs aux opioïdes endogènes dans le système nerveux (d'après Pleuvry (2005)) :



III. Classification des syndromes douloureux

Il est utile de distinguer trois types principaux de douleurs sur la base des mécanismes pathophysiologiques :

- La douleur physiologique,
- La douleur inflammatoire,
- La douleur neuropathique.

Ce sont des états différents de fonctionnement du système nociceptif qui sont à l'origine de ces types de douleurs et ils peuvent coexister (Le Bars et Willer (2004)).

III.1. La douleur physiologique

Elle est perçue en réponse à des stimulations brèves mais susceptibles de provoquer une lésion tissulaire. Le fonctionnement du système sensoriel qui encode et organise les réponses à ces stimuli se trouve dans un mode que l'on peut qualifier de normal. Ce mode est caractérisé par une relation simple et positive entre l'intensité du stimulus et l'ampleur des réponses (réactions tissulaires locales, réflexes automatiques de retrait, comportements d'évitements plus ou moins élaborés, émotions désagréables, etc...). Selon l'expérience passée et le contexte immédiat, ces réponses peuvent être modulées, soit dans le sens d'une facilitation, soit dans le sens d'une inhibition. Le système est donc bien assujéti à des mécanismes régulateurs, mais sa finalité biologique reste toujours de préserver notre intégrité corporelle (Le Bars et Willer (2004)). Pour tester ce type de douleur, plusieurs modèles existent. Le test de la plaque chauffante et de retrait de la queue servent à évaluer la douleur thermique, les tests de retrait du membre sous l'effet d'une pression mécanique (Randall et Sellito) ou de léchage de la patte avec l'application d'un filament de von Frey mettent en évidence une douleur d'origine mécanique et enfin, la première phase du test des crampes abdominales provoquées par l'injection de formol en intra-péritonéal (ip) teste la douleur chimique.

III.2. La douleur inflammatoire

Lorsque le stimulus nocif provoque une lésion, il déclenche des transformations tissulaires prolongées de type inflammatoire. Le système de la douleur entre en mode de fonctionnement différent et la relation entre une stimulation et les réponses évoquées changent profondément :

- La douleur peut devenir spontanée (présente en l'absence de stimulation),
- Dans la région lésée, le seuil de la douleur est abaissé et un stimulus douloureux est perçu de manière plus intense (hyperalgésie),
- La douleur peut se prolonger bien au-delà de l'application du stimulus,
- Un stimulus léger (effleurement) peut devenir intensément douloureux (allodynie),
- Cette hypersensibilité s'étend habituellement au-delà de la région lésée (hyperalgésie secondaire). Cependant, lorsque cette lésion guérit, le système de la douleur retourne vers son

état de fonctionnement physiologique initial. La finalité biologique de ces transformations est évidente : favoriser la guérison en ajustant les réactions et les comportements – par exemple mettre la région lésée au repos et la protéger (position antalgique) (Le Bars et Willer (2004)).

Pour évaluer ce type de douleur, il est possible d'injecter de la carragénine, de la capsaïcine, de l'adjuvant de Freund en intra-plantaire (ipl) ou d'observer la seconde phase du test au formol. Outre les comportements observés lors de ces tests, il est possible de faire subir aux animaux les tests évoqués pour la douleur physiologique afin de déterminer la présence d'hyperalgésie thermique (flexion de la queue) ou mécanique (Randall et Sellito) ainsi que de l'allodynie tactile (filament de von Frey).

III.3. La douleur neuropathique

La douleur neuropathique est celle qui résulte d'une lésion ou transformation pathologique du système somesthésique, y compris celui de la douleur elle-même, qui entre dans un mode de fonctionnement pathologique et inadapté. Au tableau des symptômes de la douleur inflammatoire, il convient d'ajouter des douleurs spontanées continues (sensations continues de brûlure, de torsion, de dilacération) ou paroxystique (sensation de décharges électriques en salve), de douleurs dans une région par ailleurs insensible (la paradoxale « anesthésie douloureuse ») ou encore de douleur dans un membre fantôme après désafférentation (arrachement du plexus brachial ou amputation d'un membre par exemple), des paresthésies (fourmillements, picotements, engourdissements...) et des dyesthésies (sensations très désagréables quoique non douloureuses)... il n'y a pas de finalité biologique à ce type de douleurs persistantes et le plus souvent rebelles aux thérapeutiques conventionnelles. Les douleurs neuropathiques résultent de lésions des nerfs périphériques ou du système nerveux central et sont souvent attribuées à un dysfonctionnement des mécanismes de contrôle de la transmission des messages nociceptifs (Le Bars et Willer (2004)).

Les tests de ligature partielle ou complète, de constriction chronique, de section partielle ou complète du nerf sciatique ainsi que la ligature des racines rachidiennes permettent de mimer une douleur d'origine neuropathique chez le rat. Comme dans le cas de la douleur inflammatoire, l'application des tests de la douleur physiologique sur les animaux opérés permet d'évaluer l'hyperalgésie et l'allodynie.

DEUXIEME PARTIE : Les toxines aux propriétés analgésiques découvertes chez les vertébrés

I. Les toxines extraites du venin des serpents

I.1. Généralités sur les venins de serpents

D'après Chippaux (2002) les venins de serpents sont principalement composés d'enzymes et de toxines. Parmi les enzymes, il est possible de décrire des phospholipases parmi lesquelles la phospholipase A2 forme la majorité, des acétylcholinestérases, des phosphoestérases, des L-amino-acide-oxydases, des hyaluronidases, des protéases et d'autres enzymes comme des amylases, des transaminases, etc. En ce qui concerne les toxines, on rencontre des neurotoxines postsynaptiques classées en trois groupes. Le premier regroupe les neurotoxines alpha à chaîne courte (60-62 acides aminés, 4 ponts disulfures), le second, les neurotoxines alpha à chaîne longue (66-74 acides aminés, 5 ponts disulfures) et le troisième, les neurotoxines kappa (66-70 acides aminés, 5 ponts disulfures). Ces protéines ont comme particularité la formation d'une structure tertiaire en trois doigts. On rencontre aussi des neurotoxines présynaptiques possédant une activité phospholipase A2 appelées neurotoxines beta, elles aussi scindées en trois groupes, les neurotoxines beta monocaténaires, la beta-bungarotoxine et les neurotoxines beta composées de plusieurs sous-unités comme la crotoxine du *Crotalus durissus terrificus* que nous étudierons plus en détail par la suite. Les venins peuvent contenir aussi des cardiotoxines cytotoxiques, des dendrotoxines qui favorisent la libération d'acétylcholine, des fasciculines qui inhibent l'acétylcholinestérase, des myotoxines, des sarafotoxines qui sont de puissants vasodilatateurs et des désintégrines qui inhibent les intégrines. Les venins de serpents possèdent encore d'autres types de composés comme du NGF, des protéines actives sur les thrombocytes, des inhibiteurs et activateurs enzymatiques sans effet toxique, des facteurs capables d'activer le complément...

I.2. Les études sur les venins de serpents asiatiques

Les études sur les venins de serpents asiatiques se concentrent sur trois espèces principales : le cobra royal, *Ophiophagus hannah* (Pu *et al.* (1995)) photographié dans la Figure 8, le cobra de Thaïlande ou cobra à monocle, *Naja kaouthia* (Bourne *et al.* (2005) ; Chen *et al.* (2006) ; Zhang *et al.* (2006b et 2012) représenté dans la Figure 9, Cheng *et al.* (2009)), et le cobra de Taïwan, *Naja naja atra* (Li *et al.* (2005 et 2007) ; Jiang *et al.* (2008) ; Liang *et al.* (2009)) vu dans la Figure 10.

Figure 8 : Photographie d'un *Ophiophagus hannah* (d'après The Reptile Database):



Figure 9 : Photographie d'un *Naja kaouthia* (d'après The Reptile Database):



Figure 10 : Photographie d'un *Naja naja atra* (d'après The Reptile Database):



I.2.1. L'hannalgésine

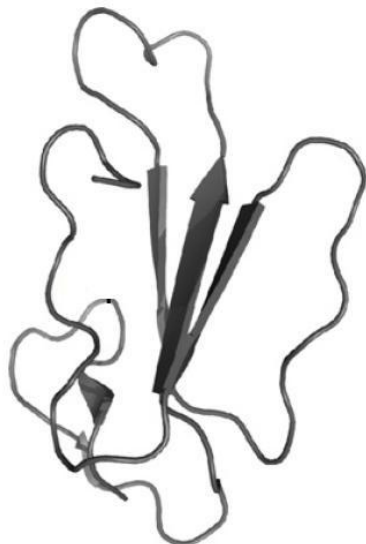
L'hannalgésine est une toxine extraite du venin du cobra royal *Ophiophagus hannah* (photographié dans la Figure 8). Les résultats de l'étude de PU *et al.* (1995) montrent dans un premier temps l'action antalgique de l'hannalgésine par l'utilisation du test de la plaque chauffante chez la souris. Trois voies d'administration ont été testées : la voie ip à la dose de 24ng/g, la voie *per os* (po) à la dose de 64ng/g et la voie intra-cérébro-ventriculaire (icv) à la dose de 15ng/g. Le témoin positif recevait de la morphine à la dose de 7mg/kg ip. Les résultats ont montré une augmentation de la latence significative par rapport au témoin négatif et comparable à la latence avec de la morphine. Afin de mettre en évidence le mécanisme d'action de la toxine, Pu *et al.* (1995) ont testé la L-N^G-Nitro Arginine Méthyl Ester (L-NAME) qui inhibe la NOS, et la naloxone qui inhibe de manière non sélective les récepteurs aux opioïdes. Les résultats ont montré que la naloxone diminuait significativement l'augmentation du temps de latence alors que la L-NAME abolissait totalement l'effet analgésique de l'hannalgésine. Ils en ont déduit l'implication du système NO dans l'effet antalgique de la toxine mais il n'y a pas eu d'autres études par la suite.

I.2.2. La cobratoxine

Bourne *et al.* (2005) expliquent que l' α -cobratoxine est une α -neurotoxine extraite du venin du *Naja kaouthia* à action curarisante qui se fixe sur le récepteur à l'acétylcholine des muscles squelettiques $\alpha_1\beta_2\gamma\delta$ et sur les récepteurs à l'acétylcholine neuronaux α_7 grâce à sa structure à trois doigts comme l'illustre la Figure 11. Pour démontrer cela, ils ont utilisé la protéine qui se lie à l'acétylcholine (*AcetylCholine Binding Protein* = AChBP) de *Lymnaea stagnalis* et qui permet d'avoir une illustration de la toxine fixée sur sa cible (Figure 12). La toxine se fixe sur les récepteurs nicotiniques musculaires au repos, inhibant leur activation (Kostantakaki *et al.* (2007)). Cette toxine possède une haute affinité pour les récepteurs encéphaliques mais pas pour ceux de la moelle épinière or le passage de la barrière hémato-encéphalique n'est pas démontré selon Chen *et al.* (2006). Cette équipe a étudié l'action de la toxine administrée par la voie ip, icv et injectée dans la SGPA avec le test de la plaque chauffante et le test des crampes abdominales. Ils ont ainsi montré une action dose dépendante par les voies ip et icv mais pas lorsque la toxine est injectée dans la SGPA. De plus, l'effet antalgique est bloqué par une forte dose d'atropine (10mg/kg ip) alors que ni la naloxone, ni une faible dose d'atropine (0,5mg/kg ip) n'ont un effet sur l'action de la cobratoxine. Par conséquent la toxine agirait sur le système cholinergique central et serait indépendante du système opioïdérique. Cheng *et al.* (2009) sont allés plus loin en étudiant la décharge de potentiels d'action dans les neurones du noyau parafasciculaire du thalamus. L'administration icv de cobratoxine provoque, toujours de façon dose dépendante, une diminution de la fréquence et de la durée des trains de potentiels d'action suite à une stimulation électrique du nerf sciatique. Ils ont aussi recherché la possible implication du système sérotoninergique dans l'effet analgésique en prétraitant pendant trois jours un lot de rats avec de la para-ChloroPhénylAlanine (pCPA) qui est un inhibiteur spécifique de la tryptophane hydroxylase ce qui permet de diminuer d'au moins 90% la quantité de sérotonine dans le cerveau. Ils ont montré que l'injection de 4,50 μ g/kg de toxine inhibait tout de même l'activité électrique des neurones du thalamus mais de manière moins importante, et significativement différente, des neurones non traités par la pCPA. Ils en ont déduit l'implication partielle du système sérotoninergique. L'action sur le système cholinergique se fait en partie *via* l'activation de récepteurs à l'acétylcholine de type M4 car Zhang *et al.* (2012) ont montré que le traitement de neurones isolés de ganglion rachidien de rat par 1 μ mol/L de tropicamide bloquait l'effet analgésique de la cobratoxine. De plus, l'activation de ce type de récepteur conduit à une inhibition des canaux calcium de type T. Cette inhibition est produite par l'activation d'une PKA par la sous-unité $\beta\gamma$ d'une protéine G_0 .

La réceptine est une forme de cobratoxine modifiée chimiquement par l'action du peroxyde d'hydrogène catalysée par du cuivre. Ce composé possède toujours une action analgésique mais sans intervention ni du système cholinergique ni opioïdérique selon Zhang *et al.* (2006b). L'intérêt provient de la forte augmentation de la dose létale 50% (DL_{50}) qui passe de 80 μ g/kg ip pour la cobratoxine à plus de 100mg/kg ip pour la réceptine.

Figure 11 : Illustration de la cobrotoxine avec ses trois boucles (d'après Kostantakaki *et al.* (2007)) :

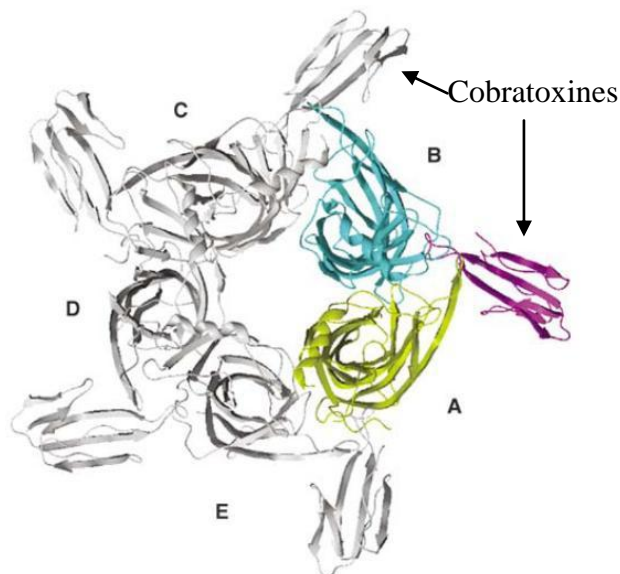


I.2.3. La cobrotoxine

La cobrotoxine est une α -neurotoxine à chaîne courte de 60-70 acides aminés, possédant quatre ponts disulfures, extraite du venin du *Naja naja atra* d'après Li *et al.* (2005). Elle est d'ores et déjà disponible dans le commerce en Chine pour ses propriétés analgésiques (Chen *et al.* (2006)). Elle agirait sur les récepteurs nicotiques post-synaptiques neuromusculaires car elle se lie avec une haute affinité au peptide dérivé de la sous-unité α_7 du récepteur à l'acétylcholine de torpille (*Torpedo*) (Hsieh *et al.* (2004)) mais son action centrale n'est pas décrite.

Li *et al.* (2005 et 2007) ont cherché à démontrer l'utilité de la voie intra nasale (in) pour administrer la toxine car cette voie permet de faire diffuser les composés dans le cerveau en contournant la barrière hématoencéphalique. Outre cette caractéristique, la voie in permet d'éviter le passage par le foie contrairement à la voie po et facilite l'observance grâce à sa facilité de réalisation. En revanche, Li *et al.* (2005) expliquent que les principaux inconvénients sont la dégradation enzymatique locale, l'élimination par l'appareil mucociliaire et la faible perméabilité des muqueuses pour les peptides hydrophiles dont fait partie la cobrotoxine. Ce dernier point nécessite la mise au point de composés qui vont faciliter le passage de la muqueuse. Li *et al.* (2005) ont étudié l'utilisation de microsphères composées d'un mélange de Poly-(Lactide-co-Glycolide) (PLGA) et de Poly[1,3-bis(p-Carboxy-Phenoxy)Propan-co-p-CarboxyEthylFormamido)BenzoïcAnhydride] (P(CPP : CEFB) A). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des microsphères composées de 60% de PLGA et 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de toxine. Ils ont mis en évidence une augmentation de la latence sur les rats au cours du test de retrait de la queue. En 2007, Li *et al.* ont comparé l'absorption de cobrotoxine marquée avec de l'iode 125 en iv ou additionnée à un mélange de bornéol et de menthol à la dose de 105 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans le bulbe olfactif et dans le cervelet. Ils ont observé, une augmentation de la concentration durable dans les deux régions lors d'administration in, par voie iv, la concentration augmentait rapidement mais plus furtivement. Ils ont supposé que l'absorption se faisait de manière paracellulaire.

Figure 12 : Illustration de cinq cobrotoxines fixées au récepteur pentamérique (A, B, C, D et E) (d'après Bourne *et al.* (2005)) :



I.2.4. La najanalgésine

La najanalgésine est une toxine naturelle à trois doigts de 6714 Da dont la séquence N-terminale est caractéristique des α -neurotoxines. Elle représente environ 19% de la masse des protéines totales du venin du *Naja naja atra* et possède 66% d'homologie avec la cobratoxine. Sa DL_{50} est de 2,69 mg/kg ip chez la souris contre 0,89 mg/kg ip pour le venin brut, toujours chez la souris, selon Jiang *et al.* (2008). Dans cette étude, il a été montré que la toxine possédait une propriété analgésique. Elle agirait de façon dose dépendante *via* les systèmes cholinergique et opioïdérique mais décalés dans le temps car si l'atropine bloquait l'effet de la najanalgésine dès le début de l'expérimentation, la naloxone n'inhibait qu'au bout d'une heure. Liang *et al.* (2009) ont montré l'effet analgésique de la toxine sur les douleurs neuropathiques en utilisant le test de ligature serrée couplé à la section du nerf rachidien L5. Ils ont obtenu une diminution de l'allodynie mécanique ainsi qu'une diminution de l'hyperalgésie thermique pendant une semaine avec une unique injection it avec une dose de 0,2, 0,4 et 0,8 mg/kg. L'observation d'un effet analgésique suite à une administration it et ip corroborait l'hypothèse d'une action au niveau central et périphérique. De plus, le blocage par l'atropine implique une action sur les récepteurs muscariniques ce qui inhiberait la transmission de l'influx nerveux dans la moelle. En ce qui concerne l'effet sur le système opioïdérique, il reste à montrer si l'effet sur les récepteurs aux opioïdes est direct ou indirect. L'injection répétée de cobratoxine dont la séquence est proche favoriserait la sécrétion dans le cerveau du rat de met-enképhaline et de leu-enképhaline ce qui serait en accord avec un effet indirect de la najanalgésine sur les récepteurs aux opioïdes.

I.3. Les toxines de *Crotalus durissus terrificus* (Figure 13)

Figure 13 : Photographie d'un *Crotalus durissus terrificus* (d'après The Reptile Database) :



I.3.1. Le venin brut

Piccolo *et al.* (1998) ont montré que le venin brut injecté par les voies ip, sous-cutanée (sc) et po possédait une activité analgésique sur le test de la plaque chauffante et le test des crampes abdominales mais n'avait pas d'effet lors du test de retrait de la queue. De plus, l'action inhibitrice de la naloxone démontrait l'implication des récepteurs aux opioïdes dans l'analgésie provoquée par le venin brut. Deux ans plus tard, Piccolo *et al.* (2000) ont montré que l'effet analgésique du venin, à la dose de 200 μ g/kg po, sur la douleur induite par l'inflammation par la carragénine était provoqué par

l'activation des récepteurs δ aux opioïdes agissant sur la voie NO-GMPc. De plus, l'administration quotidienne de venin po pendant quatorze jours ne provoquait pas de tolérance ce qui est en désaccord avec les résultats de l'étude de Brigatte *et al.* (2001) qui montrait que dans ces conditions cette tolérance apparaissait au bout de neuf jours. En revanche, une administration tous les cinq jours pendant soixante-cinq jours ne provoquait pas de tolérance. Cette étude met en évidence la participation des récepteurs κ aux opioïdes dans l'effet analgésique lors du test de la plaque chauffante. Le venin agirait en activant des canaux au potassium sensibles à l'ATP, selon Picolo *et al.* (2003), par l'intermédiaire de la voie NO-GMPc. Le NO est produit par l'activation d'une nNOS lors d'un test d'hyperalgésie inflammatoire induite par l'injection intra plantaire de PGE2 d'après Picolo et Cury (2004). Ces deux dernières études mettent en évidence l'implication à la fois des récepteurs δ et κ dans l'effet antihyperalgésique du venin lors de test de douleur inflammatoire induite par la carragénine ou la PGE2. Il est intéressant de noter que le sérum antivenimeux dirigé contre le venin de *Crotalus durissus terrificus* n'inhibe pas l'effet analgésique du venin administré po selon Konno *et al.* (2008).

I.3.2. La crotoxine

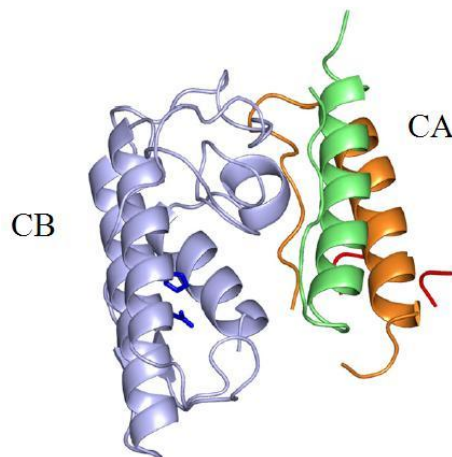
Selon Sampaio *et al.* (2010), la crotoxine est une β -neurotoxine aux propriétés neurotoxique, myotoxique, néphrotoxique et cardiotoxique mais possédant conjointement des propriétés immunomodulatrice, anti inflammatoire, antitumorale, antimicrobienne et analgésique. Cette toxine a d'ailleurs fait l'objet d'un essai clinique en Phase I comme antitumoral par Cura *et al.* (2002) dans lequel l'effet analgésique a été montré par la diminution de l'utilisation de la morphine par dix-huit malades sur les vingt-trois traités sans corrélation directe avec la diminution de la taille des tumeurs. Zhang *et al.* (2006a) s'associent à Sampaio *et al.* (2010) lorsqu'ils expliquent que la crotoxine est un dimère composé d'une protéine basique possédant une propriété phospholipase A2 de faible toxicité nommée CB (Crotoxine B) et d'une sous-unité acide non enzymatique appelée crotapotine ou encore CA (Crotoxine A) qui potentialise l'effet toxique en ciblant le site d'action de CB. La Figure 14 présente la conformation spatiale de la toxine.

Dans leur étude, Zhang *et al.* (2006a) ont montré que la toxine possédait un effet analgésique sur la souris lors du test de la plaque chauffante et du test des crampes abdominales pour des injections de 29,5 à 66,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ip. De même, la crotoxine augmentait le seuil de réaction au test de retrait de la queue chez le rat à la dose de 44,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ip. Un puissant effet analgésique est observé lors d'injection icv ou dans la SGPA à des concentrations bien plus faibles de l'ordre de 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Cet effet agirait par un mécanisme indépendant des systèmes opioïdiques, comme le soulignent Nogueira-Neto *et al.* (2008), et cholinergiques car ni la naloxone ni l'atropine à dose faible et élevée ne bloquaient l'effet analgésique de la crotoxine. Le passage de la barrière hémato-encéphalique n'est pas démontré mais l'action serait potentiellement centrale. Des études ont été aussi réalisées afin de comprendre l'effet de la toxine sur les douleurs d'origine neuropathique. Ainsi, Nogueira-Neto *et al.* (2008) ont montré que, lors de section du nerf sciatique, le trempage des abouts nerveux dans la toxine provoquait non seulement une abolition de l'hyperalgésie observée dans le groupe non traité mais aussi une analgésie car les seuils de réactions étaient supérieurs à ceux du groupe non opéré. Contrairement à Zhang *et al.* (2006a), cette étude a mis en évidence, en utilisant plusieurs inhibiteurs ou antagonistes de récepteurs, l'implication de récepteurs muscariniques centraux (inhibition par 10 mg/kg ip d'atropine mais pas par 30 mg/kg de N-méthylatropine ip) dans le mécanisme d'action de la toxine mais pas seulement, des récepteurs noradrénergiques (inhibition partielle par 2 mg/kg ip de yohimbine) et sérotoninergiques (inhibition partielle par 5 mg/kg ip de méthysergide) centraux seraient responsables de l'effet analgésique et antihyperalgésique.

La crotoxine injectée par la voie icv aux doses de 0,25, 0,45 et 0,65 µg/kg a la capacité, à l'instar de la morphine, de bloquer la formation de potentiels d'action dans le noyau parafasciculaire du thalamus à la suite d'une stimulation électrique de courte durée du nerf sciatique. A la dose la plus élevée, l'effet de la toxine n'est pas altéré par le prétraitement avec 5 µg icv d'atropine ni avec 4 µg de naloxone. En revanche, l'utilisation de pCPA pendant 3 jours avant l'injection de 0,65 µg/kg icv de crotoxine diminue significativement l'effet inhibiteur sur les neurones thalamiques. Zhu *et al.* (2008) en ont déduit que la toxine agirait de manière indépendante des récepteurs aux opioïdes et des récepteurs muscariniques tout en agissant sur les récepteurs de la sérotonine.

En conclusion, la crotoxine inhiberait les douleurs aiguës et la décharge des neurones thalamiques en activant les récepteurs à la sérotonine centraux (Zhang *et al.* (2006a), Zhu *et al.* (2008)) et inhiberait les douleurs chroniques d'origine nerveuse par l'activation des récepteurs muscariniques et de la sérotonine centraux (Nogueira-Neto *et al.* (2008)).

Figure 14 : Illustration de la crotoxine avec la sous-unité CB et la sous-unité CA (d'après Faure *et al.* (2011)) :



I.3.3. La crotamine

La crotamine est une toxine de quarante-deux acides aminés de poids moléculaire de 4800 Da. Mancin *et al.* (1998) ont montré que la dose de 133,4 µg/kg ip avait un effet analgésique équivalent à une dose de 4 mg/kg de morphine. Sa DL₅₀ est de 3,4 mg/kg iv ce qui est très supérieur à celle de la crotoxine qui est de 110 µg/kg iv. Les effets ont été jugés grâce au test de la plaque chauffante et le test des crampes abdominales ce qui a permis de mettre en évidence un effet au niveau central et au niveau périphérique. Ensuite, le fait que la naloxone inhibe l'effet de la toxine prouve qu'elle agit *via* les récepteurs aux opioïdes mais l'effet direct ou indirect reste à démontrer et l'absence de la séquence Tyr-Gly-Gly-Phe commune aux principaux opioïdes endogènes laisse penser qu'elle agirait indirectement.

I.3.4. La crotalphine

En séparant les différents constituants du venin de *Crotalus durissus terrificus* par chromatographie liquide à haute performance, Konno *et al.* (2008) ont montré l'existence d'un composé de quatorze acides aminés possédant un effet analgésique nommé la crotalphine. Il s'est

avéré que cette molécule possédait la même séquence que la chaîne γ qui compose, avec les chaînes α et β , la crotapotine ou sous unité CA de la crotoxine. Il est intéressant de noter que la crotapotine ne possède pas d'effet analgésique.

La crotalphine agit au niveau périphérique car Konno *et al.* (2008) ont montré son action inhibitrice, à la dose de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ po, sur l'installation d'une hyperalgésie par l'induction d'une inflammation lors d'injection de PGE2 ou de carragénine. De même, elle agit sur les douleurs chroniques d'origine nerveuse car Gutierrez *et al.* (2008) ont démontré son effet analgésique mais pour des doses de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ po en utilisant le test des ligatures lâches sur le nerf sciatique. De plus, ils ont montré l'implication du système opioïdérique en inhibant l'effet de la crotalphine par l'utilisation de la naloxone. Ils ont aussi noté l'absence de tolérance au bout de soixante-quinze jours de traitement quotidien.

Son action peut aussi être centrale car son injection par voie it augmente la latence du test de retrait de la queue alors qu'aucun effet sur ce dernier test n'est observée lors d'administration orale ce qui serait un argument pour dire qu'il n'y a pas de passage de la barrière hémato-encéphalique.

I.4. Bilan sur les toxines de serpents

Les venins de serpents sont des sources incontestables de nouveaux principes actifs pour le développement d'antidouleurs mais pas seulement. En effet, les propriétés de leurs toxines sont nombreuses et certaines sont à l'origine de médicaments actuellement en usage en médecine humaine. Ainsi, le captopril®, dérivé d'une protéine du venin de *Bothrops jaracusa*, fût le premier inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine par voie orale (Koh *et al.* (2006)). Un autre exemple de l'utilisation des toxines des ophidiens est apportée par l'étude des disintégrines qui sont des inhibiteurs potentiels des différentes intégrines responsables de nombreuses maladies. Lors de désordres thromboemboliques, le principal objectif est d'inhiber l'intégrine $\alpha\text{II}\beta\text{3}$ réceptrice du fibrinogène sur les plaquettes sanguines. C'est dans cette optique que la structure des disintégrines a été utilisée comme modèle pour concevoir des composés capables de se fixer avec une plus forte affinité au fibrinogène. Cette démarche a abouti à l'obtention de deux molécules, l'eptifibatide et le tirofiban, développées à partir de composés des venins de *Sistrurus miliarus barbouri* et *Echis carinatus*, respectivement. Ces deux médicaments ont été approuvés dans le traitement des syndromes coronariens aigus et dans la prévention des complications thrombotiques chez les patients subissant une chirurgie coronarienne percutanée telle qu'une pose de stent ou de ballonnet.

II. Les toxines extraites de la peau des amphibiens

II.1. Les opioïdes cutanés des amphibiens

II.1.1. Généralités sur les opioïdes cutanés des amphibiens

La peau des amphibiens contient une large variété de peptides souvent homologues ou même identiques aux hormones gastro-intestinales et aux neurotransmetteurs des mammifères. En 1981, la première famille d'opioïdes amphibiens a été découverte et nommée les dermorphines. Neuf ans plus tard, les deltorphines ont été extraites de la peau des batraciens. Ces opioïdes ont été trouvés seulement dans la peau des grenouilles d'Amérique du Sud appartenant à la sous-famille Phyllomedusinae (*Phyllomedusa*, *Agalychnis* et *Pachymedusa* species). Certaines tribus d'Amazonie utilisent les sécrétions de la peau de *Phyllomedusa bicolor* (Figure 15) en application cutané avant de se scarifier durant des rituels de chasses chamaniques. L'abondance de deltorphine et de dermorphine dans ces sécrétions est probablement responsable de l'effet analgésique observé par les chasseurs selon Negri *et al.* (2000).

Les premiers opiacés amphibiens synthétisés en laboratoire ne possédaient pas les propriétés des formes naturelles alors que leur séquence en acides aminés étaient identiques. Des études supplémentaires ont montré la présence et le rôle essentiel d'un acide aminé de configuration dextrogyre (D) en deuxième position, entre deux acides aminés aromatiques (Mizoguchi *et al.* (2011)).

II.1.2. La dermorphine et ses analogues naturels

Figure 15 : Photographie d'une *Phyllomedusa bicolor* (d'après AmphibiaWeb)



Figure 16 : Photographie de *Phyllomedusa sauvagii* (d'après AmphibiaWeb)



Les deux premières dermorphines identifiées, la dermorphine et la [Hyp⁶]dermorphine dont les séquences sont présentées dans le Tableau 3, provenaient de la peau des grenouilles appartenant au genre *Phyllomedusa* (*Ph*), *Ph. Sauvagei* (Figure 16), *Ph. Rohdei* et *Ph. Burmeisteri*. Le séquençage de l'ADN préparé à partir de la peau de *Ph. Sauvagei* a permis d'établir la séquence en acides aminés de plusieurs précurseurs des dermorphines selon Negri *et al.* (2000). Parmi ces précurseurs, un possède une méthionine en deuxième position et possède une forte affinité pour les

récepteurs aux opioïdes δ . Il porte le nom de deltorphine que nous verrons plus tard. Trois autres composés proches de la dermorphine ont été extraits de la peau de *Ph. bicolor*. Il s'agit de la [Lys⁷]dermorphine, de la [Trp⁴,Asn⁷]dermorphine et de la [Trp⁴,Asn⁵]dermorphine(1-5)-OH dont les séquences sont listées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Tableau des séquences primaires en acides aminés de la dermorphine et de ses analogues naturels (d'après Mizoguchi *et al.* (2011)) :

Composé	Séquence primaire
Dermorphine	Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH ₂
[Hyp ⁶]Dermorphine	Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Hyp-Ser-NH ₂
[Lys ⁷]Dermorphine	Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Lys-NH ₂
[Lys ⁷]Dermorphine-OH	Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Lys-OH
[Trp ⁴ , Ans ⁷]Dermorphine	Tyr-D-Ala-Phe-Trp-Tyr-Pro-Ans-NH ₂
[Trp ⁴ , Ans ⁷]Dermorphine-OH	Tyr-D-Ala-Phe-Trp-Tyr-Pro-Ans-OH
[Trp ⁴ , Ans ⁷]Dermorphine(1-5)-OH	Tyr-D-Ala-Phe-Trp-Ans-OH

Les dermorphines sont des agonistes de forte affinité des récepteurs aux opioïdes μ grâce, selon Broccardo *et al.* (2003), à la présence des acides aminés tyrosines en première et cinquième position et à la glycine en quatrième place en ce qui concerne la dermorphine. Mizoguchi *et al.* (2011) font remarquer que les peptides traversent mal la barrière hémato-encéphalique ; pourtant, les dermorphines agissent lorsqu'elles sont administrées par les voies iv ou sc ce qui montre une certaine perméabilité de la barrière pour ces composés. Cette perméabilité reste tout de même inférieure à celle de la morphine. La [Lys⁷]dermorphine se lie préférentiellement aux récepteurs de forte affinité, appelés μ_1 , et la [Trp⁴,Asn⁷]dermorphine se fixe de préférence sur les récepteurs de faible affinité, notés μ_2 et provoque de la catalepsie et une analgésie moins importante que la [Lys⁷]dermorphine (Mizoguchi *et al.* (2011)). L'utilisation de l'un ou l'autre de ces deux composés permet de distinguer les deux types de récepteurs μ dans le cerveau du rat. L'affinité du premier composé est cent fois plus élevée que celle de la morphine pour les récepteurs μ . La dermorphine, injectée par voie icv chez le rat, est 500 à 1000 fois plus puissante que la morphine. En revanche, son efficacité équivaut à celle de la morphine lorsqu'elle est injectée par voie intraveineuse car elle traverse peu la barrière hémato-encéphalique (moins de 0,0005%) selon Negri *et al.* (2000). Mais la [Lys⁷]dermorphine semble être relativement capable de traverser avec efficacité. La dermorphine possède une demi-vie courte dans le sang, de l'ordre de 1,3 minute après injection iv chez le rat, car la molécule sort vite de la circulation et s'accumule dans le foie et le rein où sa dégradation est entre 20 et 40 fois plus élevée que dans le cerveau (Negri *et al.* (2000)). Ce composé est plus résistant que la Leu-enképhaline aux enzymes protéolytiques du plasma du rat et de l'Homme. En effet, la demi-vie de la dermorphine, confrontée à ces enzymes, est de 180 minutes alors que celle de la Leu-enképhaline est comprise entre 2,1 et 4,5 minutes. De plus, la dermorphine disparaît du cerveau au bout de 29 minutes alors que la Leu-enképhaline a disparu au bout d'une minute seulement.

Le potentiel analgésique de la dermorphine semble limité par la perméabilité du système nerveux central à la molécule. Comme tous les agonistes μ , elle provoque en plus d'une analgésie,

cataplexie, rigidité et sédation. La [Lys⁷]dermorphine possède le plus fort potentiel analgésique, avec une action 290 fois, 30 fois et 20 fois plus importante que la morphine lors d'injection par voie icv, iv et sc respectivement. De plus, sa sélectivité plus importante pour les récepteurs μ_1 fait qu'elle stimule la respiration plutôt que d'être un dépresseur respiratoire comme les agonistes μ_2 . Ensuite, la dermorphine agit au niveau spinal mais aussi supra-spinal. Chez l'Homme, selon Negri *et al.* (2000), elle peut être injectée par voie it et possède ainsi une efficacité cent fois supérieure à celle de la morphine ou par perfusion au rythme de 5,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ pendant 30 minutes ce qui permet d'obtenir une augmentation des seuils des réflexes nociceptifs à la fois chez les sujets sains et chez les patients atteints de lésions de la moelle épinière. Cette observation montre que l'inhibition de la transmission de l'influx nociceptif est principalement réalisée au niveau spinal.

Broccardo *et al.* (2003) ont testé l'efficacité de la dermorphine injectée par voie in. Ils ont montré qu'une dose de 0,005 mg/kg induisait une analgésie faible et de courte durée qui débutait au bout de 30 à 50 minutes après l'administration. Des doses plus élevées de 0,01 et 0,02 mg/kg provoquaient une analgésie plus marquées et plus durable. Enfin, à la dose de 0,05 mg/kg, l'augmentation de la latence du retrait de la queue débutait 10 minutes après l'administration. De plus, ils ont expliqué dans leur étude que l'efficacité obtenue par la voie in était proche de celle obtenue par voie icv, mais avec une plus grande facilité d'administration. De nombreux chercheurs tentent de modifier la dermorphine afin de trouver des composés analogues ayant moins d'effets secondaires.

Une étude réalisée par Cao *et al.* (2009) utilisait la dermorphine non pas comme analgésique mais comme ligand pour cibler les récepteurs μ . La toxine était couplée à une protéine, la saponine, qui inhibe la synthèse protéique par blocage des ribosomes. Le composé, injecté directement dans la RBVM, se fixait à la protéine G des récepteurs μ puis une fois internalisée, la saponine était libérée ce qui conduisait à une perte de fonction des neurones en quatre jours et à leur mort en sept jours. Ainsi, Cao *et al.* (2009) obtenaient la mort des neurones responsables de la douleur pathologique.

II.1.3. Les analogues synthétiques de la dermorphine

Plus de cent analogues ont été synthétisés depuis la découverte de la dermorphine dans le but d'amplifier l'effet analgésique ainsi que la durée d'action tout en limitant les effets secondaires.

Le tétrapeptide du côté N-terminal [1-4] est le dérivé de plus petite taille possédant encore une affinité pour les récepteurs μ aux opioïdes, de l'ordre de 5% selon Mizoguchi *et al.* (2011). Les composés [1-6] et [1-5] possèdent une affinité de 50% environ. Il a été remarqué que le remplacement de la D-Alanine par de la D-Arginine en seconde position augmentait la sélectivité des composés pour les récepteurs μ centraux par rapport aux périphériques. En effet, Mizoguchi *et al.* (2011) expliquent que l'effet analgésique de la [D-Arg²]dermorphine est quatre fois plus faible que la dermorphine seule par la voie intra-cérébro-ventriculaire mais qu'en contrepartie, son action sur la contraction de l'iléum de cobaye est vingt-six fois plus faible. Ils font remarquer aussi que ce composé synthétique possède un effet équivalent à la dermorphine lors d'une administration sous-cutané ce qui s'expliquerait par une plus grande perméabilité de la barrière hémato-encéphalique pour cet analogue. Le tétrapeptide [D-Arg²]dermorphine[1-4] montre un effet antinociceptif au niveau supraspinal plus de deux fois plus important que celui de la [D-Arg²]dermorphine et sa forme désaminée [D-Arg²]dermorphine[1-4]-OH est le composé le plus puissant avec la plus longue durée d'action grâce à sa résistance à la dégradation enzymatique.

L'un des analogues les plus remarquables est le TAPA (Tyr-D-Arg-Phe- β -Ala-OH) qui a une longue durée d'action ainsi qu'un pouvoir analgésique 200, 1100 et 9,1 fois plus fort que la morphine lors d'administration icv, it et sc. Bien que sa biodisponibilité soit faible par voie orale, son effet analgésique est comparable à la morphine par cette voie. Le TAPA-NH₂ possède une affinité pour les récepteurs μ équivalente à celle du TAPA mais une plus grande sélectivité selon Mizoguchi *et al.* (2011). Mizoguchi *et al.* (2004) stipulent que le TAPA agirait sur les récepteurs μ_1 et le TAPA-NH₂ agirait sur les récepteurs μ_2 . La N^a-amidination renforce l'activité analgésique des analogues ce qui a conduit à la synthèse de l'amidino-TAPA. Ce composé possède une haute affinité et une sélectivité pour les récepteurs μ plus forte que le TAPA lors d'administration sous-cutanée ou orale (Mizoguchi *et al.* (2007)). Un autre analogue synthétique, l'ADAMB (Amidino-D-Arg-MetBêta, la séquence complète est visible dans le Tableau 4) possède un pouvoir antinociceptif 37 fois plus fort que la morphine lors d'administration sous-cutanée et un pouvoir 3,8 fois plus fort par voie orale. Le DALDA ([D-Arg², Lys⁴]Dermorphine Aminée) possède deux acides aminés chargés positivement ainsi qu'une haute sélectivité pour les récepteurs μ aux opioïdes mais son effet n'est que 14 fois plus important que celui de la morphine dans la moelle épinière ce qui est beaucoup plus faible que l'effet du TAPA et de ses dérivés. Étonnamment, ce composé se distribue fortement dans le placenta ce qui en fait un opioïde prometteur en obstétrique. Le dérivé Diméthyle DALDA ([Dmt¹]DALDA) du DALDA est 218 fois, 119 fois et 5148 fois plus puissant que la morphine lors d'administration respectivement sc, icv et it. Le dernier dérivé traité dans cette partie est le TAPS (Tyr Arg Phe Sar), par voie icv, it, sc et orale, il possède un pouvoir analgésique plus fort que la morphine de l'ordre de 600, 393, 21 et 1,5 fois respectivement.

L'antagoniste des récepteurs κ aux opioïdes, la nor-binaltorphimine, diminue l'effet analgésique des différents analogues injectés par voie it ([Dmt¹]DALDA, TAPS, TAPA, TAPA-NH₂ et amidino-TAPA) alors qu'ils ciblent les récepteurs μ . L'explication est qu'ils stimulent la sécrétion des dynorphines dans la moelle qui ciblent les récepteurs κ selon Mizoguchi *et al.* (2011). TAPS et TAPA-NH₂ favoriseraient la sécrétion de dynorphine B, le TAPA la sécrétion de α -néo-endorphine, le [Dmt¹]DALDA favoriserait la sécrétion de dynorphine A et l'amidino-TAPA stimulerait la sécrétion des trois agonistes κ . Ces deux derniers analogues ont aussi un effet inhibé par les antagonistes des récepteurs δ aux opioïdes naltrindol et naltriben. Ils stimulent respectivement la sécrétion de Met et Leu-enképhaline. La morphine et les autres agonistes traditionnels des récepteurs μ n'ont pas un tel effet ce qui, selon Mizoguchi *et al.* (2011), pourrait être expliqué par une action sur des récepteurs μ différents, insensibles aux agonistes traditionnels mais cela reste à prouver.

Tableau 4 : Les analogues synthétiques contenant de la D-Arg² et leur séquence primaire (d'après Mizoguchi *et al.* (2011)) :

Analogues synthétiques	Séquence primaire
[D-Arg ²]Dermorphine	Tyr-D-Arg-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH ₂
[D-Arg ²]Dermorphine[1-4]	Tyr-D-Arg-Phe-Gly-NH ₂
[D-Arg ²]Dermorphine[1-4]-OH	Tyr-D-Arg-Phe-Gly-OH
[D-Arg ² , β-Ala ⁴]Dermorphine[1-4] (TAPA-NH ₂)	Tyr-D-Arg-Phe-β-Ala-NH ₂
[D-Arg ² , β-Ala ⁴]Dermorphine[1-4]-OH (TAPA)	Tyr-D-Arg-Phe-β-Ala-OH
N ^α -Amidino-[D-Arg ² , β-Ala ⁴]Dermorphine[1-4]-OH (Amidino-TAPA)	H ₂ NC(=NH)-Tyr-D-Arg-Phe-β-Ala-OH
N ^α -Amidino-[D-Arg ² , Méthylβ-Ala ⁴]Dermorphine[1-4]-OH (ADAMB)	H ₂ NC(=NH)-Tyr-D-Arg-Phe-Meβ-Ala-OH
[D-Arg ² , Sar ⁴]Dermorphine[1-4]-OH (TAPS)	Tyr-D-Arg-Phe-Sar-OH
[D-Arg ² , Lys ⁴]Dermorphine (DALDA)	Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH ₂
[Diméthyl ¹ , D-Arg ² , Lys ⁴]Dermorphine ([Dmt ¹]DALDA)	(CH ₃) ₂ Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH ₂

Mizoguchi *et al.* (2011) ont résumé les effets secondaires provoqués par les analogues de la dermorphine. En ce qui concerne la dépression respiratoire, le TAPS semble être assez sûr car cet effet apparaît pour une dose supérieure à 30 fois celle nécessaire pour obtenir 80% d'effet analgésique (AD₈₀) par voie icv. Ce composé stimule la respiration avec d'autant plus d'efficacité que la dose icv est faible, l'effet maximal est atteint avec 3 pmol icv (Paakkari *et al.* (1993)).

L'utilisation du DALDA est plus délicate car la dépression respiratoire apparaît dès trois fois l'AD₅₀ lors d'administration it (0,7 nmol). En revanche, le [Dmt¹]DALDA n'a pas montré d'effet significatif sur la respiration à 10 et 30 fois son AD₅₀ it (3,2 et 32 pmol, respectivement) (Shimoyama *et al.* (2001)). La tolérance a aussi été étudiée pour certains analogues. La plupart provoquent une tolérance mais il est intéressant de rechercher s'il y a une tolérance croisée avec la morphine. Les rats tolérants à la morphine le sont aussi au TAPS par voie sc. Par conséquent, le TAPS possède une tolérance croisée avec la morphine mais cette dernière n'a pas de tolérance croisée avec le TAPS. La morphine injectée par les voies sc et icv possède une tolérance croisée chez la souris avec le TAPA mais pas lorsqu'elle est injecté par la voie it. De plus, le TAPA n'a pas de tolérance croisée avec la morphine quelle que soit la voie d'administration. De même, les souris tolérantes à la morphine ne montrent pas de tolérance au [Dmt¹]DALDA. Par conséquent, ces deux derniers analogues sont intéressants comme analgésiques car ils permettraient de mettre en place un traitement analgésique une fois la morphine devenue inopérante. En ce qui concerne la mise en place de la dépendance physique comme psychologique aux opioïdes, quasiment aucune étude sur les analogues de la dermorphine n'a été faite. Selon Mizoguchi *et al.* (2011), l'injection chronique de TAPA et de TAPS provoque une dépendance physique avec des symptômes de servage lors d'arrêt brutal mais ces symptômes sont plus doux que dans le cas de la morphine. Tous les analogues qui stimulent la libération d'agonistes des récepteurs κ pourraient éviter la mise en place d'une dépendance psychologique.

II.1.4. Les deltorphines

Après la découverte de la deltorphine dans les sécrétions cutanées des *Phyllomedusinae*, Negri *et al.* (2000) expliquent que deux autres composés ont été mis en évidence, les Ala-

deltorphines I et II. Ces molécules, extraites de la peau de *Ph. bicolor*, possèdent une affinité encore plus forte pour les récepteurs aux opioïdes δ et possèdent une D-Alanine en seconde position dans leur séquence. La séquence de la deltorphine est Tyr-D-Met-Phe-His-Leu-Met-Asp-NH₂, celle de l'Ala-deltorphine I est Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH₂ et enfin, la séquence de l'Ala-deltorphine II est Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂. Une autre deltorphine a été trouvée dans la peau de *Ph. burmeisteri*. En raison de la présence d'une D-leucine en deuxième position et de sa séquence de dix-sept acides aminés, elle a été nommée D-Leu-deltorphine17.

Les deltorphines sont des agonistes des récepteurs δ aux opioïdes et parmi elles, l'Ala-deltorphine I possède la plus forte affinité. Des chercheurs, comme Labuz *et al.* (2003), ont synthétisé des analogues des deltorphines parmi lesquels, l'ile-deltorphine II a montré une activité 8 fois plus importante et une sélectivité 5 fois plus grande pour les récepteurs δ que le peptide d'origine *in vitro* alors que l'étude *in vivo* n'a pas montré de différence entre les deux agonistes dans le test d'injection de formol par voie ipl. Wang *et al.* (2011) ont synthétisé deux composés chimères en combinant l'Ala-deltorphine I et II avec de la méthoxytryptamine afin de cibler de manière concomitante les récepteurs à la mélatonine. En effet, cette hormone sécrétée par la glande épiphyse possède des propriétés analgésiques dans différents modèles de douleur (Ambriz-Tututi *et al.* (2009) et Srinivasan *et al.* (2010)) avec un effet marqué sur les récepteurs δ aux opioïdes (Li *et al.* (2005)). Co-administrée avec l'Ala-deltorphine I, Dai *et al.* (2007) ont montré que la mélatonine évitait la mise en place du phénomène de tolérance. L'analgésie obtenue avec les composés chimères était plus longue et plus forte qu'avec le mélange Ala-deltorphine I ou II additionné de mélatonine. Gendron *et al.* (2007) ont remarqué que le test d'inflammation chronique par injection d'adjuvant de Freund ainsi que le traitement chronique à la morphine induisent une augmentation de la densité des récepteurs δ par un recrutement des récepteurs intracellulaires. Ainsi, le traitement à la morphine dans le cadre du test à l'adjuvant de Freund accentue l'effet analgésique de la deltorphine.

La deltorphine et les Ala-deltorphines présentent, en comparaison avec les dermorphines, une longue demi-vie dans le plasma et dans le cerveau avec des temps respectifs de 57 et 130 minutes pour la deltorphine et de 4 et 6 heures pour les Ala-deltorphines.

Par voie icv chez le rat, l'Ala-deltorphine II augmente le seuil de réaction au test du retrait de la queue. De plus, cette molécule inhibe la transmission des potentiels d'action dans les fibres A δ et C dans la corne dorsale superficielle et profonde de la moelle épinière. Lorsqu'elle est injectée par voie icv, cette deltorphine agit avec des doses plus élevées (30 nmol) que précédemment car elle est un agoniste partiel faible contrairement à l'Ala-deltorphine I qui se comporte comme un agoniste total à des doses comprises entre 6,5 et 52 nmol. La deltorphine provoque une analgésie à des doses comparables mais lorsque cette dose dépasse 20,8 nmol/rat, elle provoque des dysfonctionnements moteurs bloqués seulement par un antagoniste des récepteurs NMDA. Des injections répétées d'Ala-deltorphine II provoquent la mise en place d'une tolérance qui peut être atténuée par un pré-traitement avec un inhibiteur de ces récepteurs (Negri *et al.* (2000)).

II.2. Une toxine agissant sur les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique : l'épibatidine

L'épibatidine (présentée dans la Figure 17), dont le nom chimique est l'*exo*-2-(6-chloro-3-pyridyl)-7-azabicyclo[2.2.1]heptane d'après Watt *et al.* (2000), est une toxine isolée de la grenouille *Epipedobates tricolor* (Figure 18). La (\pm)-épibatidine est un agoniste des récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique. Elle ne peut pas être utilisée en traitement médical car son index thérapeutique est très faible (Kesingland *et al.* (2000), Decker *et al.* (1998) et Donnelly-Roberts *et al.* (1998)). Les

effets secondaires sur le système cardiovasculaire et musculaire proviennent de l'action de la toxine sur la sous-unité α_3 des récepteurs nicotiques ganglionnaires orthosympathiques et sur les récepteurs nicotiques de la plaque motrice (α_1) $_2\beta_1\gamma\delta$. De plus, l'injection répétée augmente le risque de mort selon Decker *et al.* (1998) et Nishiyama *et al.* (2003).

La toxicité porte sur le système cardiovasculaire ainsi que sur le système nerveux central. Les études montrent que l'injection d'épipatidine (0,01, 0,06, 0,12 et 0,3 μg) dans les noyaux cérébraux comme le noyau du raphé dorsal et le *locus coeruleus* (Cucchiario *et al.* (2005) et (2006)) provoque un blocage musculaire chez la souris et le rat caractérisé par une immobilité, un tonus musculaire augmenté et un regard fixe en plus de l'effet analgésique observé dans le test au formol (sauf à la dose de 0,01 μg dans le *locus coeruleus* (Cucchiario *et al.* (2006))). Cette paralysie tonique était annulée par l'injection icv de mécamylamine, un antagoniste des récepteurs nicotiques. Ganesh *et al.* (2008) ont mesuré l'activation des neurones du *locus coeruleus* en fonction de la quantité d'épipatidine administrée sc et dans le noyau. Ils n'ont pas réussi à mettre en évidence une augmentation de l'activité électrique des neurones du noyau cérébral avec des doses inférieures à 5 μg sc alors que Cucchiario *et al.* (2006) avaient noté un effet analgésique avec des doses de 2,5 et 5 μg ip. De plus, Ganesh *et al.* (2008) ont mesuré une réponse positive des neurones sous l'action de 0,01 μg de toxine injectée dans le *locus coeruleus* alors que Cucchiario *et al.* (2006) n'avait pas observé d'effet sur le comportement des rats. On peut noter que Ganesh *et al.* (2008) comparaient leurs résultats à ceux de l'équipe de Cucchiario bien que les doses que ces derniers utilisaient étaient dix fois plus fortes. Il faut donc comparer uniquement les valeurs de posologie identiques.

L'ABT-594, qui est illustré par la Figure 20, est un dérivé de l'épipatidine. Cet analogue a pour nom chimique le (R)-5-(2-Azétidinylméthoxy)-2-chloropyridine. Selon Kesingland *et al.* (2000), l'affinité de l'ABT-594 pour le récepteur nicotinique $\alpha_4\beta_2$, qui est le plus répandu dans le cerveau, est équivalente à celle de la (\pm)-épipatidine. En revanche, le dérivé a une affinité 4000 fois moins importante pour le récepteur musculaire. Une tolérance à ce composé est observée au bout de cinq jours dans l'étude de Bannon *et al.* (1998). Un des effets obtenus avec l'ABT-594 est une inhibition de la sécrétion de CGRP par les fibres C de la corne dorsale selon Donnelly-Roberts *et al.* (1998). Ce composé a, de plus, l'avantage d'être actif par voie orale. Nishiyama *et al.* (2003) ont étudié deux autres composés dérivés de la toxine d'origine, le (1R, 2R, 5S)-2 α -(2-chloropyridinyl) azabicyclo [3.2.1] octane et le (1R, 2R, 5S)-2 β -(2-chloropyridinyl) azabicyclo [3.2.1] octane, avec beaucoup moins d'effets secondaires grâce à des affinités pour les récepteurs ganglionnaires et musculaires moins élevées que celles de l'épipatidine. Ainsi, il n'y a pas d'effet sur la motricité au double de l'AD₅₀ lors d'administration sc des deux analogues alors qu'un tiers de l'AD₅₀ de l'épipatidine provoque des modifications motrices.

Figure 17 : Figure de l'épipatidine (d'après Watt *et al.* (2000)) :

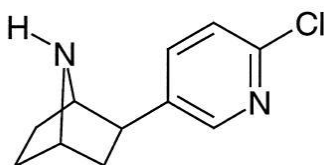
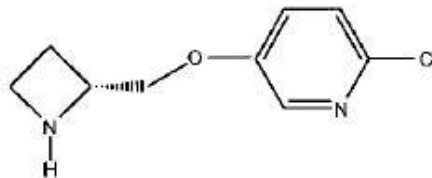


Figure 18 : Photographie d'*Epipedobates tricolor* (d'après AmphibiaWeb) :



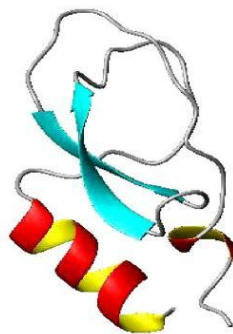
Figure 19 : Figure de l'ABT-594 (d'après Donnelly-Roberts *et al.* (1998)) :



II.3. Une toxine agissant sur les canaux sodium voltage dépendants : l'anntoxine

L'anntoxine est la première protéine neurotoxique découverte chez les amphibiens selon You *et al.* (2009). Elle est extraite de la peau de la grenouille *Hyla annectans*. Elle est composée d'une séquence de 60 acides aminés et cible les canaux sodiques voltage-dépendants sensibles TTX-R d'après Wei *et al.* (2011). You *et al.* (2009) expliquent que c'est une toxine de type Kunitz qui possède un feuillet β torsadé caractéristique ainsi qu'une hélice α et une hélice 3_{10} courte au niveau du N terminal comme le montre la Figure 20.

Figure 20 : Représentation de l'anntoxine (d'après You *et al.* (2009)) :



Wei *et al.* (2011) ont montré que la toxine possédait à la fois un effet analgésique mais aussi anti-inflammatoire. En effet, lors d'injection ipl de toxine aux doses de 0,625, 1,25 et 2,5 mg/kg chez

la souris, la seconde phase du test au formol était inhibée avec plus d'efficacité que la première. De plus, ils ont observé une amélioration des résultats aux tests de douleur aiguë du retrait de la queue et de la plaque chauffante, aux mêmes doses, ainsi qu'une diminution des crampes abdominales. L'étude des signes d'inflammation a montré une diminution de l'œdème, de la concentration de TNF α et de COX-2 mettant en avant l'effet anti inflammatoire de l'anntoxine. Cette étude ne fait pas la différence avec clarté entre la part analgésique et la part anti-inflammatoire dans les résultats obtenus. De plus, l'effet sur l'activité motrice n'a pas été étudié alors que You *et al.* (2009) rapportent des effets secondaires tels que de la détresse respiratoire, des rotations et des convulsions lors d'administration de 0,05, 0,45, 2,5 et 3 mg/kg ip de toxine chez les souris probablement par une action sur les canaux sodiques TTX-S.

TROISIEME PARTIE : Les toxines aux propriétés analgésiques découvertes chez les invertébrés

I. Les toxines extraites du venin des cônes marins du genre *Conus*:

I.1. Généralités sur les venins des cônes marins

Les conopeptides se rencontrent dans le venin des cônes marins du genre *Conus* et sont utilisés par ces escargots pour capturer leurs proies. Ils comprennent des peptides qui ne contiennent pas de ponts disulfures et d'autres qui en sont riches. Ces derniers sont qualifiés de conotoxines (Clark *et al.* (2012)). Pour Lewis (2011) le terme de conotoxine doit être réservé aux composés létaux lors d'injection chez la souris. Tant que la létalité n'est pas prouvée, le composé est un conopeptide. Chaque espèce de cônes possède un régime alimentaire restreint aux poissons, aux vers ou aux mollusques. Les espèces piscivores présentent les venins les plus puissants qui peuvent paralyser les proies en quelques dixièmes de secondes et être mortel pour l'Homme (Hawgood (2006)). Le venin est injecté par un harpon, dont certains exemplaires sont illustrés dans la Figure 21, relié à une glande à venin par un long conduit comme le montre la Figure 22.

Le biologiste marin Bob Endean a été un des précurseurs dans l'étude des venins des cônes de la Grande Barrière de Corail dans les années soixante (Hawgood (2006)). Depuis on estime qu'il existerait entre 25 000 (Livett *et al.* (2006)) et 100 000 (Clark *et al.* (2012)) conopeptides différents répartis dans environ 700 espèces de cônes marins (Schmidtko *et al.* (2010)). Pour l'instant une estimation donne à environ 0,1% le nombre de conopeptides caractérisés au niveau pharmacologique (Lewis *et al.* (2012)). Pour faciliter l'échange des connaissances entre groupes de recherche, la majorité des données connues sur les conopeptides sont disponibles sur un site de l'université du Queensland (Australie) appelé ConoServer (<http://www.conoserver.org>). Ce site regroupe toutes les protéines avec leur séquence et leur structure en trois dimensions avec une partie de la littérature qui s'y rapporte. L'accès est libre au public et des mises à jour sont faites régulièrement (Kaas *et al.* (2012)).

La nomenclature officielle des conopeptides est expliquée par Kaas *et al.* (2010). Elle correspond à la nomenclature officielle des toxines et permet de caractériser la famille pharmacologique à l'aide d'une lettre Grecque comme le résume le Tableau 5, puis une ou deux lettres donne l'espèce, ensuite, un chiffre romain permet de définir le motif formé par les cystéines et les ponts disulfures comme le montre le Tableau 6, et enfin une lettre donne l'ordre de découverte. Certains auteurs nomment leur toxine différemment.

Les peptides extraits des venins de ces mollusques possèdent une grande sélectivité pour un large panel de récepteurs dont de nombreux canaux ioniques ce qui leur confère un grand intérêt. En effet, ils peuvent être utilisés pour « disséquer pharmacologiquement » les cellules ou bien servir à la mise au point de nouvelles familles de molécules thérapeutiques comme par exemple de nouveaux traitements de la douleur.

Figure 21 : Photographie au microscope électronique des harpons des cônes piscivores *Conus catus*, *Conus purpurascens* et *Conus geographus*. La barre d'échelle correspond à 100 μm (d'après Bingham *et al.* (2010)) :

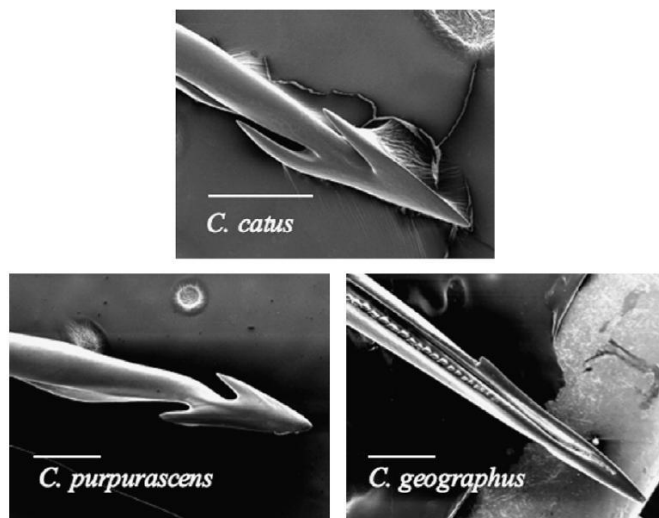


Figure 22 : Schéma illustrant l'anatomie d'un cône piscivore en chasse (d'après Schmidtko *et al.* (2010)) :

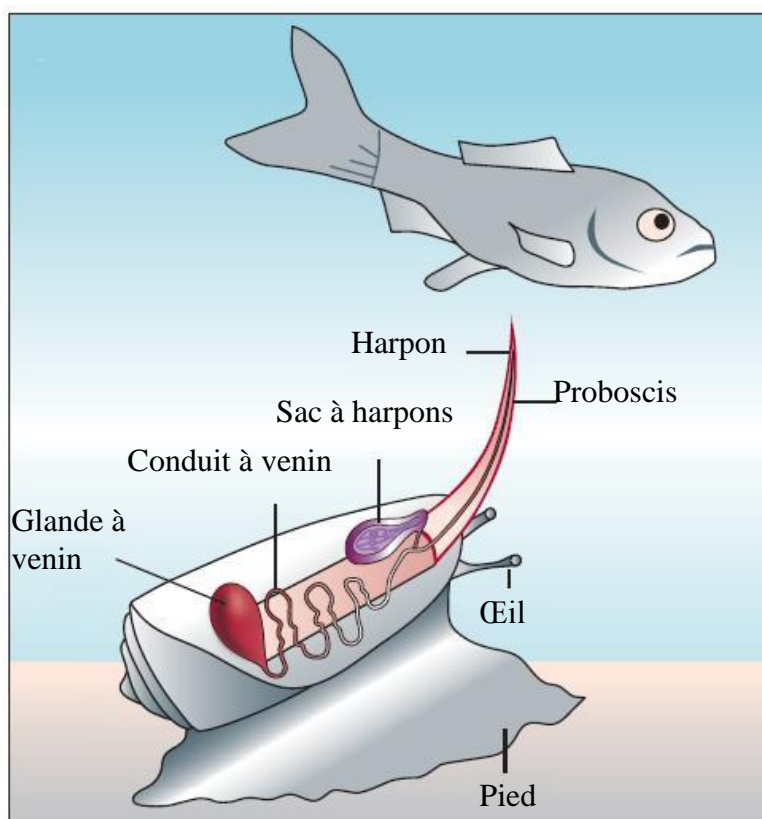


Tableau 5 : Nomenclature des toxines selon leur cible pharmacologique (d'après King *et al.* (2008) et Kaas *et al.* (2010)) :

Famille pharmacologique	Famille de récepteurs et mode d'action
α (alpha)	Inhibiteur des récepteurs à l'acétylcholine nicotiques
χ (chi)	Inhibiteur du transporteur de noradrénaline neuronal
δ (delta)	Retarde l'inactivation des canaux sodium voltage-dépendants
ε (epsilon)	Inhibiteur des canaux calcium présynaptiques ou des récepteurs présynaptiques couplés à une protéine G
γ (gamma)	Inhibe les courants entrants de cations responsables de pacemakers neuronaux
ι (iota)	Agoniste des canaux sodium voltage-dépendants mais ne retarde pas l'inactivation
κ (kappa)	Bloqueur des canaux potassium voltage-dépendants
μ (mu)	Bloqueur des canaux sodium voltage-dépendants
μO (mu O)	Inhibiteur du canal $Na_v1.8$
ω (oméga)	Bloqueur de canaux calcium voltage-dépendants
ρ (rho)	Inhibiteur des récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques
σ (sigma)	Inhibiteur des canaux à ions dépendants à la sérotonine
Γ (gamma)	Antagoniste des récepteurs NMDA
υ (upsilon)	Agoniste des récepteurs à la vasopressine
ν (nu)	Agoniste des récepteurs à la neurotensine
π (pi)	Cible les canaux ASIC

Tableau 6 : Classification des différents motifs de cystéines des conopeptides (d'après Kaas *et al.* (2010)) :

Nom	Nombre de cystéines	Structure du peptide	Connexions entre les cystéines
I	4	CC-C-C	(I-III, II-IV)
II	6	CCC-C-C-C	
III	6	CC-C-C-CC	(I-VI, II-IV, III-V), (I-IV, II-V, III-VI), (I-V, II-IV, III-VI)
IV	6	CC-C-C-C-C	(I-V, II-III, IV-VI)
V	4	CC-CC	(I-III, II-IV)
VI/VII	6	C-C-CC-C-C	(I-IV, II-V, III-VI)
VIII	10	C-C-C-C-C-C-C-C-C-C	
IX	6	C-C-C-C-C-C	(I-IV, II-V, III-VI)
X	4	CC-C-C	(I-IV, II-III)
XI	8	C-C-CC-CC-C-C	(I-IV, II-VI, III-VII, V-VIII)
XII	8	C-C-C-C-CC-C-C	
XIII	8	C-C-C-CC-C-C-C	
XIV	4	C-C-C-C	(I-III, II-IV)
XV	8	C-C-CC-C-C-C-C	
XVI	4	C-C-CC	
XVII	8	C-C-CC-C-CC-C	
XVIII	6	C-C-CC-CC	
XIX	10	C-C-C-CCC-C-C-C-C	
XX	10	C-CC-C-CC-C-C-C-C	

I.2. Les conotoxines agissant sur les canaux calcium voltage-dépendants

I.2.1. La ω -conotoxine MVIIA (SNX111, ziconotide, Prialt®)

Parmi les ω -conotoxines connues, certaines agissent sur des canaux calcium de type N ou T qui permettent la transmission du message nerveux de la douleur. MVIIA extraite du venin de *Conus magus*, illustré par la Figure 23, possède une forme synthétique nommée SNX111 ou encore ziconotide, dont la structure est présentée par la Figure 24. Cette molécule est un antagoniste puissant et sélectif des canaux calciques voltage-dépendants de type N ($Ca_v2.2$). Elle interrompt la transmission nerveuse entre la terminaison de la fibre afférente primaire et la corne dorsale. En effet, les $Ca_v2.2$ qui se concentrent dans les couches superficielles de la corne dorsale restent fermés lors de l'arrivée de potentiels d'action, par conséquent il n'y a pas de flux entrant de calcium et pas de

libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique, comme l'illustre la Figure 25, en particulier de SP et de CGRP (Wang *et al.* (2000b)). L'effet analgésique par administration it de la toxine a été montré lors de test au formol dans lequel les deux phases sont inhibées même lorsque le ziconotide est injecté pendant le déroulement de la deuxième phase ce qui montre sa capacité à renverser la sensibilisation de la moelle avec une AD₅₀ de 3 pmol/L (Mathur (2000)). Wang *et al.* (2000b) ont montré dans un modèle de douleur postopératoire chez le rat que le ziconotide diminuait l'hyperalgésie thermique et l'allodynie mécanique au niveau du membre opéré sans modifier les résultats des tests sur le membre sain avec une AD₅₀ de 2,7 µg (3,6 nmol) et 1,6 µg (2,1 nmol) respectivement. La morphine, quant à elle, agissait en augmentant les temps de latence au niveau des deux membres.

Figure 23 : Photographie de la coquille d'un *Conus magus* (d'après www.coneshell.net):

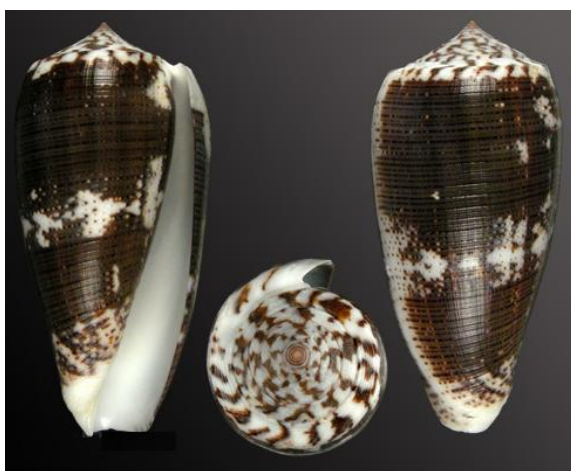
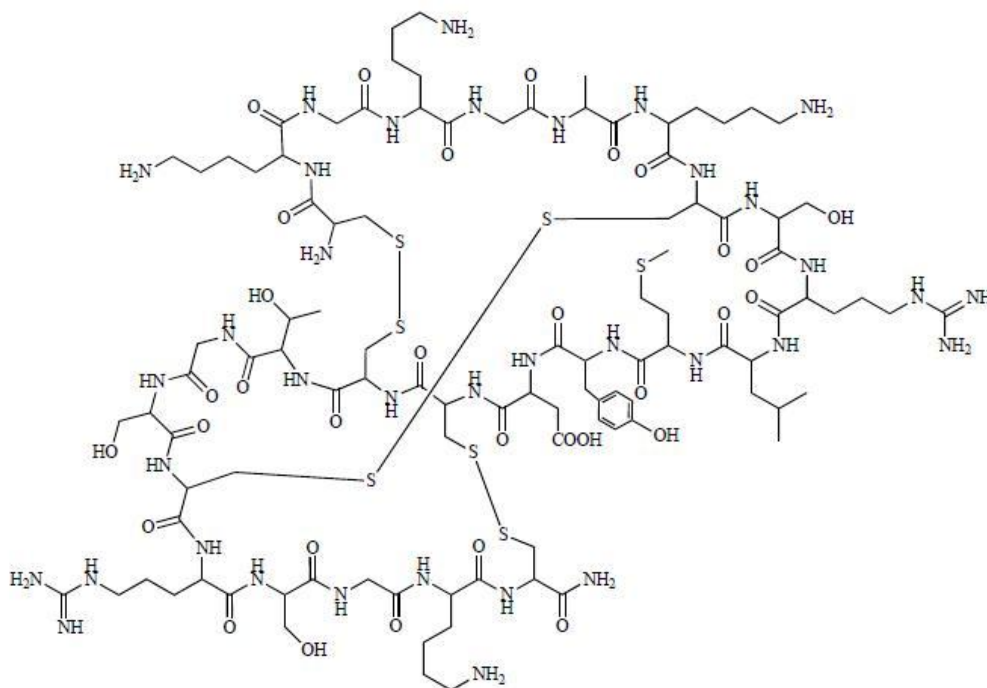


Figure 24 : Structure du ziconotide (d'après Han *et al.* (2008)) :



Le fait que les canaux $Ca_v2.2$ soient surexprimés lors de processus inflammatoires périphériques ou lors de lésions nerveuses (Schmidtko *et al.* (2010)) en font des cibles de choix dans la lutte contre les douleurs. Mais la large répartition de ces canaux dans le système nerveux central, dont l'hippocampe responsable de la mémoire et de l'apprentissage, provoque un large panel d'effets indésirables parmi lesquels nystagmus, confusion mentale, difficultés d'élocution, nausées, vertiges, céphalées, ataxie (Mathur (2000)) ainsi que des hallucinations ((Schmidtko *et al.* (2010)), de la somnolence, de l'amblyopie (Lewis *et al.* (2012)) et une augmentation des créatines kinases sériques, dont l'origine reste inexplicée, chez de rares patients (Webster *et al.* (2009)). Ces effets sont dus à la diffusion rostrale de la toxine dans le LCS à partir du lieu d'injection lombaire. Cette diffusion est d'autant plus rapide que la concentration et le débit de la perfusion sont élevés (Rauck *et al.* (2006)).

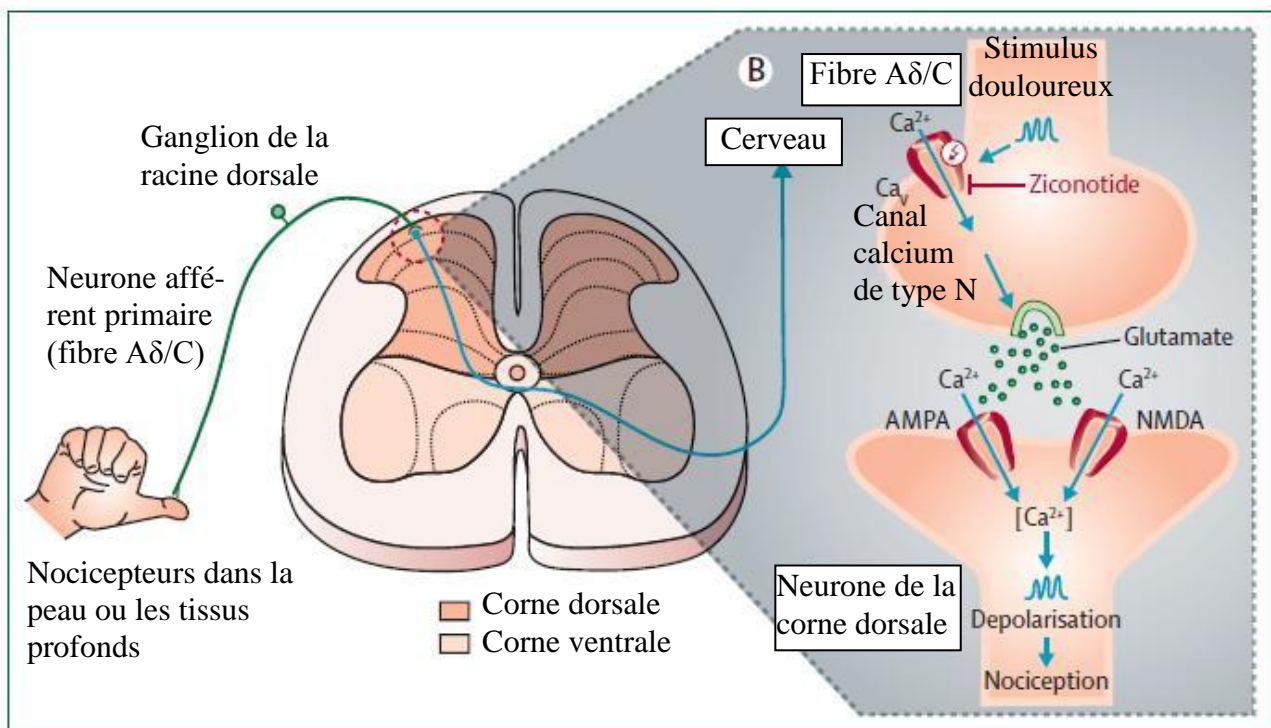
Malgré le grand nombre d'effets indésirables, le faible index thérapeutique et la voie d'administration peu usuelle, la nécessité d'avoir des alternatives à la morphine dans les cas les plus graves de douleur chronique a permis au ziconotide d'obtenir une autorisation de mise sur le marché par la *Food and Drug Administration* des Etats-Unis d'Amérique en 2004 et par l'Agence Européenne du Médicament en 2005 sous le nom commercial de Prialt® Eisai Ltd (Schmidtko *et al.* (2010)). Ce médicament n'est indiqué que pour les douleurs chroniques sévères chez des patients pour lesquels un traitement intrathécal est justifié et qui sont intolérants et/ou dont la douleur est réfractaire aux autres traitements tels que les analgésiques systémiques, les thérapies d'appoint ou la morphine en intrathécal (Webster *et al.* (2009)). Il est conseillé d'utiliser les plus petites doses possibles de l'ordre de 0,1 $\mu\text{g/h}$ et d'augmenter la dose pas plus d'une fois par semaine. Cela permet de contrôler une partie des effets indésirables mais l'analgésie est moins spectaculaire qu'avec des doses plus importantes (Rauck *et al.* (2006)).

Le poids moléculaire de 2500 Da et la nature hydrophile de la molécule impliquent son injection directe dans l'espace sous-arachnoïdien car elle ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique ni les jonctions serrées de la dure-mère si l'injection est péridurale. De plus, ces propriétés lui donnent une mauvaise diffusion dans le parenchyme nerveux qui est de l'ordre d'un millimètre en deux heures dans le cerveau de rat. Sa demi-vie est de 4,6 heures, par conséquent à l'arrêt du traitement, la molécule a disparu du LCS en 24 heures mais il faudra plus de deux semaines pour que les effets secondaires s'estompent (Rauck *et al.* (2006)). Il faut donc que le clinicien soit attentif à la latence qui existe avec l'utilisation de cette molécule. En cas d'effets indésirables sévères, l'absence de syndrome de sevrage permet d'interrompre le traitement à tout moment. L'injection de ziconotide par voie intraveineuse produit un effet sympatholytique conduisant à des hypotensions, de la bradycardie ainsi que des rhinites et des nausées (Lewis *et al.* (2012)). Les problèmes cognitifs et psychiatriques engendrés par les effets indésirables du ziconotide font qu'il est contre-indiqué chez les patients présentant déjà un problème d'ordre psychiatrique car trois suicides ont été directement reliés à la prise de ce médicament (Schmidtko *et al.* (2010)).

De nombreuses études combinant le ziconotide à d'autres molécules analgésiques par voie intrathécale ont été réalisées afin de mettre au point des protocoles utilisant des doses minimales de chaque composés dans le but d'en limiter les effets secondaires. Wang *et al.* (2000a) ont montré que la morphine et le ziconotide avaient un effet synergique dans le test au formol chez le rat avec des doses de morphine/ziconotide de 0,1 μg / 0,01 μg , 1 μg /0,1 μg et 3 μg /0,3 μg it. De plus, le ziconotide ne provoque pas de tolérance alors que c'est le cas avec la morphine et il n'y a pas de tolérance croisée entre la morphine et l'analogue de MVIIA. Alicino *et al.* (2012) ont étudié cette combinaison chez des patients atteints de douleurs chroniques cancéreuses. Ils recevaient 2,4 $\mu\text{g/j}$ de ziconotide avec une augmentation de 1,2 $\mu\text{g/j}$ avec des intervalles d'au moins sept jours sous forme de perfusion it et une dose de morphine journalière en it calculée à partir de leur dose de morphine orale avant

l'étude. Un suivi avec une Echelle Visuelle Analogique (EVA : bande graduée de 100 mm avec un curseur qui indique une absence de douleur à 0 mm et la pire douleur imaginable à 100 mm) était réalisé. Au départ l'EVA s'élevait à 90 ± 7 mm puis cette valeur a diminué de $39 \pm 13\%$ le deuxième jour, puis de $51 \pm 12\%$ le septième et a diminué de $62 \pm 13\%$ le vingt-huitième jour de l'étude. L'effet a donc été rapide (moins de deux jours) et de longue durée (plus de vingt-huit jours) avec peu d'effets secondaires. D'autres études ont été réalisées en combinant la toxine avec de l'hydromorphone ou du baclofen.

Figure 25 : Schéma du mode d'action du ziconotide au niveau de la synapse entre le neurone afférent primaire et les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (d'après Schmidtke *et al.* (2010)) :



I.2.2. Les autres ω -conotoxines possédant des propriétés analgésiques

Plusieurs études ont été réalisées sur les toxines du venin de *Conus catus* et *Conus geographus*. Ainsi Scott *et al.* (2002) ont montré que CVID (AM-336, CNSB004, Leconotide) et GVIA (SNX-124) avaient la capacité de diminuer la douleur d'origine neuropathique induite par la ligature serrée des racines L5 et L6 chez le rat. De plus, l' AD_{50} de GVIA était 3 fois plus faible ($0,12 \mu\text{g/kg it}$) que celle de MVIIA et CVID ($0,32$ et $0,36 \mu\text{g/kg it}$, respectivement) et 40 fois plus faible que celle de la morphine ($4,36 \mu\text{g/kg it}$). GVIA possède donc une plus grande puissance que CVID mais c'est cette dernière qui montre le meilleur ratio entre efficacité et toxicité (Scott *et al.* (2002) et Livett *et al.* (2006)). Ils ont montré l'absence d'effet sur la douleur aiguë. Les toxines CVIE et CVIF agissent sur la forme inactivée des canaux calciques de type N avec une forte sélectivité et une réversibilité qui dépend de la sous-unité β (Berecki *et al.* (2010)). Ces deux toxines ont la capacité de diminuer l'allodynie mécanique suite à la ligature du nerf sciatique chez le rat. Selon Lewis *et al.* (2012), CVID permet de diminuer les signes de douleurs neuropathiques dans les modèles animaux de manière comparable à MVIIA mais avec un meilleur index thérapeutique. L'activité de CVID, CVIE et CVIF est diminuée par les sous-unités $\alpha_2\delta_1$, β_2a et β_3 des canaux sodiques à des degrés différents et comme l'expression de la sous-unité $\alpha_2\delta_1$ est augmentée lors de douleur neuropathique

au niveau des terminaisons centrales des neurones afférents primaires, l'effet analgésique des toxines ne serait pas au maximum de leurs capacités.

Les effets secondaires provoqués par MVIIA, injecté par voie systémique, laissaient penser que cette voie d'administration était impossible pour les ω -conotoxines mais des études récentes ont montré que CVID par voie iv produisait un effet antihyperalgésique sans action cardio-vasculaire. En effet, à la dose de 2 mg/kg, le léconotide diminue de plus de 50% l'hyperalgésie thermique provoquée par une neuropathie d'origine diabétique chez le rat, sans effet secondaire (Kolosov *et al.* (2010)). Ils ont testé ensuite la combinaison léconotide/flupirtine (un modulateur des canaux potassium) à la dose de 0,02 mg/kg iv pour le léconotide et 5 mg/kg pour la flupirtine et ont obtenu une diminution de $84,1 \pm 7,2\%$ de l'hyperalgésie dans le même test. Kolosov *et al.* (2011) ont testé la combinaison léconotide/morphine sur l'hyperalgésie thermique chez des rats atteints de métastases osseuses induites par injection de cellules cancéreuses dans le tibia. Ils ont montré que l'AD₅₀ de la morphine seule passait de $2,40 \pm 1,24$ mg/kg ip à $0,16 \pm 1,30$ mg/kg ip lors d'injection combinée avec 20 μ g/kg ip de léconotide. En utilisant un modèle de douleur neuropathique par ligature des racines L5 et L6 chez le rat, Blake *et al.* (2005) ont testé la combinaison CVID et dexmédétomidine (agoniste α 2-adrénérique) en it. Ils ont obtenu une diminution significative de l'allodynie mécanique mais de courte durée (moins de trois heures) avec peu d'effets secondaires (tremblements et ataxie).

I.3. Les conotoxines qui ciblent les canaux sodium voltage-dépendants

Plusieurs toxines de la famille μ et μ O ont montré des propriétés analgésiques. Par exemple, Zhang *et al.* (2007) expliquent que KIIIA de *Conus kinoshitai* possède un effet analgésique, lors d'administration ip, dans le test au formol chez la souris avec une AD₅₀ de 1,6 nmol (0,1 mg). L'effet est visible dans les deux phases sans atteinte motrice dans la gamme des doses possédant un effet analgésique. Elle bloque préférentiellement les canaux TTX-S avec différents niveaux de réversibilité mais n'agit pas sur le canal Na_v1.7. On ne sait pas clairement par quel mécanisme elle agit pour diminuer la douleur. L'AD₅₀ de KIIIA est neuf fois plus faible que celle de SIIIA de *Conus striatus*. Cette dernière comme les autres μ -conotoxines agit en se fixant à l'extérieur du pore ce qui empêche le passage des ions (Leipold *et al.* (2011)). SIIIA agit sur les canaux sodium neuronaux avec une sensibilité intermédiaire pour le Na_v1.7 de l'homme. Sa sensibilité est plus forte pour les Na_v1.2 et 1.4 du rat, Na_v1.4 de l'Homme et Na_v1.6 de la souris. Alors que Leipold *et al.* (2011) ont montré que SIIIA agissait sur des canaux TTX-S, Wang *et al.* (2006) affirment que cette toxine agit sur les canaux TTX-R. Mais cette dernière équipe a utilisé des neurones de ganglion rachidien pour leur étude or ils contiennent les deux types de récepteurs alors que la première équipe a utilisé des cellules embryonnaires de rein humain transfectées pour exprimer un seul type de récepteur.

Dans le cas de la famille μ O, les toxines agissent sur la zone du domaine II du canal qui capte le voltage (Leipold *et al.* (2011)). La toxine MrVIB, dont la Figure 26 illustre la structure, est extraite du venin de *Conus marmoreus* (Figure 27). Elle inhibe sélectivement le canal TTX-R Na_v1.8 du rat et de l'homme à une concentration 10 fois plus faible que celle nécessaire à l'inhibition des canaux TTX-S comme le Na_v1.4 musculaire (Ekberg *et al.* (2006)). Cette toxine produit une diminution de l'allodynie mécanique et de l'hyperalgésie dans les modèles d'inflammation chronique et de neuropathie par administration it à des doses 30 fois plus faibles que celle à partir de laquelle une incoordination motrice apparaît. L'efficacité de ces toxines pour traiter une douleur dépendrait aussi des lésions nerveuses associées, car des sous-unités des canaux sont surexprimées dans le cas de douleurs neuropathiques, ce qui conduirait à des modifications dans le fonctionnement des canaux sodium comme le canal Na_v1.3 selon Lewis *et al.* (2012).

Figure 26 : Structure de la toxine μ O-MrVIB (d'après Han *et al.* (2008)) :

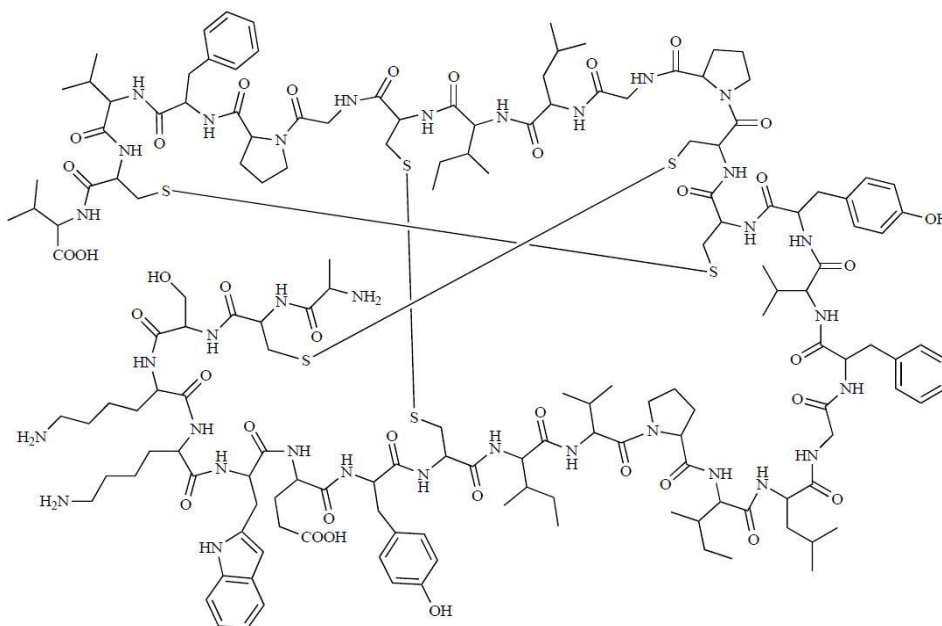


Figure 27 : Photographie de la coquille de *Conus marmoreus* (d'après www.coneshell.net):



I.4. Les conotoxines qui ciblent les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine

Les α -conotoxines les plus étudiées sont RgIA de *Conus regius* et Vc1.1 de *Conus victoriae* (Figure 28) bien que It14a de *Conus litteratus* ait montré un effet analgésique en cas de douleur aiguë thermique (Sun *et al.* (2011)). Cette dernière est composée de deux feuilletts β reliés par un coude β . Sun *et al.* (2011) ont montré que le remplacement de la lysine en septième position par une alanine augmentait la part hydrophobe de la protéine et améliorait la fixation aux récepteurs nicotiniques. De plus, l'apport d'une charge positive supplémentaire au niveau du C-terminal augmentait la stabilité et l'affinité de la toxine ce qui favoriserait un meilleur effet thérapeutique contre la douleur.

Vc1.1 (ACV1 pour le développement commercial) et RgIA sont des antagonistes spécifiques des récepteurs neuronaux à l'acétylcholine $\alpha_9\alpha_{10}$ selon Callaghan et Adams (2010). Vc1.1 possède une action antihyperalgésique de longue durée (plus d'une semaine après arrêt du traitement) dans

des modèles de douleur neuropathique chez le rat (ligature partielle et constriction chronique du nerf sciatique). Cette action, dose-dépendante, a été obtenue après administration intramusculaire (im) de 0,036, 0,36 et 3,6 $\mu\text{g}/\text{j}$ pendant 7 jours de Vc1.1. Un effet cumulatif, jour après jour, a été observé avec un retour à la valeur de base du seuil de retrait de la patte dès la première injection avec 3,6 μg de la toxine. Une meilleure récupération des nerfs lésés a été mise en évidence dans ce protocole (Satkunanathan *et al.* (2005)). Livett *et al.* (2006) expliquent que Vc1.1 a un effet analgésique dans des modèles de douleur aiguë et empêche l'augmentation de l'excitabilité des fibres C lors de lésions nerveuses.

Des études plus récentes ont montré que l'effet de cette toxine et celui de RgIA sur la douleur ne provenait pas de leur action antagoniste sur les récepteurs à l'acétylcholine mais serait la conséquence d'une inhibition de canaux calcium de type N par un mécanisme qui ferait intervenir une activation des récepteurs GABA_B (Klimis *et al.* (2011)) car le prétraitement avec l'antagoniste de ces récepteurs, SCH50911, prévient l'amélioration de l'allodynie mécanique. Vc1.1 possède en plus une faible activité sur $\alpha_3\beta_2$ et sur $\alpha_3\beta_4$. Plusieurs arguments contredisent l'importance des récepteurs nicotiques $\alpha_9\alpha_{10}$ dans l'effet analgésique de ces toxines. Tout d'abord, AuIB de *Conus aulicus* n'a pas d'action sur $\alpha_9\alpha_{10}$ mais agit sur les canaux calcium en produisant un soulagement de l'allodynie. Ensuite, deux analogues de Vc1.1, vc1a et [P60]Vc1.1, sont toujours actifs sur $\alpha_9\alpha_{10}$ mais en perdant la capacité d'inhiber les canaux calcium, ils sont devenus incapables de diminuer l'allodynie. Il en résulte que l'action sur $\alpha_9\alpha_{10}$ n'est ni suffisante ni nécessaire pour améliorer l'allodynie lors d'administration des toxines par voie systémique (Napier *et al.* (2012)). Le dernier argument est la très faible répartition dans l'organisme de ces récepteurs (Lewis *et al.* (2012)).

Une autre toxine, MII, produit une forte diminution de l'allodynie en agissant comme un puissant inhibiteur de $\alpha_3\beta_2$ lors d'administration intrathécale. Par conséquent, ce type de récepteur pourrait être une cible de choix pour lutter contre l'allodynie. Mais comme les effets par cette voie d'AuIB et de Vc1.1 sont proches et que leur action se porte aussi sur $\alpha_3\beta_4$, il se pourrait que ce soit l'inhibition de la sous-unité α_3 qui compte au niveau de la moelle épinière (Napier *et al.* (2012)). Rien n'est certain et des études supplémentaires sont nécessaires. Des manipulations biochimiques pour augmenter la résistance de Vc1.1, afin de l'administrer par voie orale, ont abouti à la synthèse d'un composé cyclique (Clark *et al.* (2012)). A l'aide d'un peptide lien pour ne pas dénaturer la forme tridimensionnelle de la toxine, cette équipe a montré que par voie orale Vc1.1 gardait une activité sur l'allodynie. Mais en fin de compte, le développement d'ACV1 dans un but thérapeutique a été abandonné faute de preuve de son efficacité chez l'homme (Lewis *et al.* (2012)).

Figure 28 : Photographie de la coquille de *Conus victoriae* (d'après www.coneshell.net):

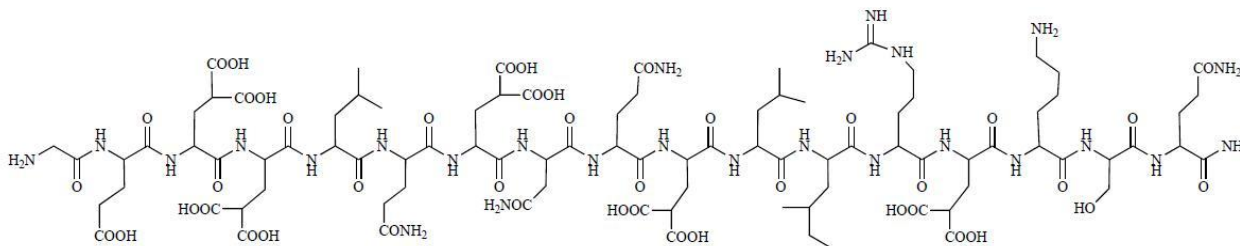


I.5. Les conopeptides qui ciblent les récepteurs NMDA

La conantokine G de *Conus geographus* dont la Figure 29 montre la structure, possède un potentiel thérapeutique comme analgésique et anticonvulsivant en se fixant à la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA (Lewis *et al.* (2012)). Sa structure est dépourvue de cystéine mais est riche en acide γ -carboxyglutamique. La conantokine T de *Conus tulipa* présenterait aussi des propriétés analgésiques (Livett *et al.* (2006)) en ciblant les sous-unités NR2A et NR2B (Malmberg *et al.* (2003)). Les conantokines n'agissent pas par voie systémique, uniquement en intrathécal, et elles renversent l'allodynie thermique avec plus d'efficacité que l'allodynie mécanique.

Une étude a cherché à mettre en évidence l'effet de la conantokine G administrée conjointement avec MVIIA (ziconotide) en it (Hama et Sagen (2009)). Ils ont déduit de leurs résultats que lors de douleurs persistantes chez le rat, les deux toxines avaient un effet additif et dans le cas de lésions de la moelle épinière, cet effet était synergique. De plus, la combinaison des deux permettait de diminuer les doses et donc de limiter les effets secondaires. Les auteurs proposaient d'étudier le potentiel effet analgésique postopératoire du mélange conantokine G et ziconotide.

Figure 29 : Structure de la conantokine G (d'après Han *et al.* (2008)) :



I.6. La conotoxine qui inhibe la capture de la noradrénaline dans la fente synaptique

Conus marmoreus possède une autre toxine ayant un intérêt dans la lutte contre la douleur. La χ -conotoxine MrIA est étudiée pour sa capacité à inhiber sélectivement le transporteur de noradrénaline neuronal qui capture ce neurotransmetteur dans la fente synaptique. Cette toxine, injectée en it, a la capacité de diminuer l'allodynie mécanique dans des modèles de douleur neuropathique (constriction chronique et ligature de L5 et L6) chez le rat de manière dose dépendante avec une AD₅₀ de 15,7±3,9 nmol. De plus, elle produit de l'antinociception dans le test de la plaque chauffante chez la souris (Nielsen *et al.* (2005)). MrIA interagit de manière non compétitive ou allostérique avec le transporteur ce qui augmente l'action de la noradrénaline au niveau de la voie inhibitrice descendante ce qui a pour conséquence d'inhiber la voie ascendante de la douleur au niveau présynaptique.

Afin d'augmenter la résistance de MrIA face aux protéases dans le but de prolonger sa durée d'action, l'asparagine terminale a été remplacée par du pyroglutamate ce qui a donné du Pyroglutamate1-MrIA appelé aussi Xen2174. Ce composé a peu d'effet secondaires et une stabilité augmentée (Lewis (2011)). Le Xen2174 est efficace contre l'allodynie mécanique et contre la douleur post-chirurgicale dans des modèles de douleur postopératoire chez le rat et ce composé est en cours de développement par le laboratoire Xenome Ltd. Cette molécule est en phase IIb d'essais cliniques dans une étude en double aveugle afin de déterminer son pouvoir analgésique

postopératoire lors de bunionectomie (ajustement du métatarse I lors d'hallux valgus). La phase IIa a été réalisée lors d'un essai clinique chez des patients atteints de douleurs d'origine cancéreuse. Le Xen2174 a amélioré de manière rapide l'état des patients pendant une période prolongée avec un large éventail de doses administrées en bolus en it allant de 0,1 à 30 mg sans apparition d'effets secondaires majeurs (Lewis *et al.* (2012)).

I.7. Bilan sur les toxines des cônes marins

Le venin des cônes marins est riche en ligands sélectifs de nombreux récepteurs et canaux ioniques. Livett *et al.* (2006) pensent que ce serait la banque naturelle la plus riche en principes actifs pharmacologiques. Nous nous sommes attardés sur les toxines qui agissent sur la douleur mais il existe de nombreux autres domaines dans lesquels d'autres toxines de cônes possèdent des propriétés thérapeutiques. De plus, ces composés peuvent être utilisés pour caractériser des types de récepteurs ou servent à mieux comprendre le fonctionnement des récepteurs de l'organisme.

Les toxines des arachnides, araignées et scorpions, possèdent de nombreux points communs avec celles des cônes en ce qui concerne la structure et les cibles.

II. Les toxines extraites du venin des araignées

II.1. Généralités sur le venin des araignées

Plus de 42 700 espèces d'araignées sont décrites (Klint *et al.* (2012)) ce qui correspond à un nombre de peptides biologiquement actifs estimé à douze millions (Escoubas et King (2009)) dont seulement 799 sont rapportés dans la littérature à l'heure actuelle. Ainsi, moins de 0.01% des toxines des araignées ont été étudié. Comme les cônes, les araignées possèdent une banque de données sur Internet intitulée ArachnoServer (Herzig *et al.* (2011)) qui rassemble les connaissances sur les toxines.

Le venin des araignées est constitué de composés organiques tels des acides aminés libres, des neurotransmetteurs (glutamate, aspartate, GABA, histamine, dopamine, sérotonine, adrénaline), des amines biogènes (spermine, spermidine, cadavérine, putrescine), des nucléotides (AMP, ADP, ATP, inosine), des acides organiques (citrique, lactique, dihydroxyphénylacétique), du glucose et des composés non organiques comme des ions. Certains composés sont retrouvés à l'état de traces et sont donc suspectés d'être des artefacts dus à la méthode de prélèvement par électrostimulation des chélicères. De plus, comme le venin des araignées n'est pas identique selon le sexe et comme la taille des femelles est plus grande que celle des mâles, les toxines étudiées proviennent du venin des femelles.

Le venin contient aussi des acylpolyamines qui sont des assemblages de parties hydrophiles avec une chaîne carbonée hydrophobe, des peptides courts qui forment la majorité des toxines et des protéines divisées en toxines de haut poids moléculaire et en enzymes. Les toxines de faible poids moléculaire oscillent entre 3 et 8 kDa. Elles sont compactes car plusieurs ponts disulfures consolident leur structure (Escoubas et Diochot (1999)). En général, deux ponts dessinent un cercle avec les séquences peptidiques qui les séparent et un troisième pont se crée à travers ce cercle formant une sorte de nœud. D'ailleurs, cette configuration s'appelle un nœud de cystéine inhibiteur (*Inhibitor Cystine Knot* ou *knottin* = ICK). Cette structure confère aux toxines une forte stabilité chimique, thermique et biologique. Elles peuvent être isolées dans le sérum des animaux plusieurs jours après leur administration et leur demi-vie dans le suc gastrique est supérieure à 12 heures (Saez *et al.* (2010)).

Les toxines d'araignées peuvent être nommées selon la nomenclature déjà exposée pour les cônes (King *et al.* (2008)) mais seul ArachnoServer utilise cette méthode. En général, dans la littérature, les chercheurs donnent eux-mêmes un nom aux toxines.

II.2. Les toxines inhibitrices des canaux ASIC

La Psalmotoxine-1 (PcTx1) (Figure 30) est entrée sous le nom de π -theraphotoxin-Pc1a dans ArachnoServer. Elle est extraite du venin de *Psalmopoeus cambridgei* (Figure 31). C'est un peptide de 40 acides aminés lié par trois ponts disulfures qui possède des propriétés basiques et un poids moléculaire de 4689,40 Da. La rareté de cette toxine dans le venin a forcé les chercheurs à recourir à une forme recombinante qui possède heureusement les mêmes propriétés que la forme native (Diochot *et al.* (2007)). PcTx1 (native et recombinante) inhibe sélectivement les canaux ASIC1a composés de monomères homologues avec une affinité élevée de l'ordre de la nanomole dans plusieurs systèmes d'expression cellulaire (oocytes de *Xenopus laevis*, cellules COS et neurones de

ganglion rachidien isolés). Elle n'agit pas sur les autres formes de canaux ASIC (ASIC 1b, 2a, 2b, 3 et 4) ni sur les trimères composés de monomères hétérologues. Le blocage est réversible et ne touche pas les canaux voltage-dépendants sodiques, calciques et potassiques (Escoubas *et al.* (2000)). PcTx1 agit comme un modificateur de déclenchement des canaux. Elle augmente l'affinité des ASIC1a pour les protons suffisamment pour qu'ils soient presque tous dans un état insensible à un pH de 7,4 empêchant ainsi leur activation. La toxine ne se fixe pas directement à l'entrée du pore mais sur une boucle extracellulaire des canaux à l'état ouvert ou inactivé (Diochot *et al.* (2007)).

Mazzuca *et al.* (2007) ont comparé l'effet de la morphine et de PcTx1 sur différents modèles de douleur chez la souris et le rat. Dans les modèles de douleur aiguë thermique (plaque chauffante et retrait de la queue), l'injection de 0,1 nmol de toxine it ou icv a montré un effet équivalent à l'injection it ou icv de morphine (15 nmol dans le test d'immersion et 31 nmol dans le test de la plaque chauffante). La toxine, administrée à 0,1 nmol it, possède une action analgésique comparable à celle de la morphine, administrée à 31 nmol it, dans la première phase du test au formol. Dans la deuxième phase, la phase inflammatoire, PcTx1 a un effet plus puissant que la morphine. Elle possède aussi la capacité de renverser l'état d'hyperalgésie et d'allodynie dans le modèle de constriction chronique du nerf sciatique chez le rat 14 jours après l'intervention chirurgicale. En effet, l'injection it de la même dose de PcTx1 diminue l'hyperalgésie thermique et l'allodynie tactile avec, néanmoins, une efficacité inférieure à celle de la morphine (31 nmol it). La toxine possède le même effet lors de douleur neuropathique provoquée par l'injection de vincristine chez la souris. Les effets analgésiques de la toxine ne sont pas accompagnés d'effets secondaires visibles.

L'absence d'effet additif entre la morphine et PcTx1 ainsi que la mise en place d'une tolérance à la toxine sur le même modèle que la morphine ont entraîné Mazzuca *et al.* (2007) à rechercher l'implication du système opioïdérique dans le mode d'action de la Psalmothoxine-1. L'effet analgésique de la toxine était inhibé par la naloxone, la naloxonazine et le naltrindole indiquant l'intervention des récepteurs μ et δ aux opioïdes. Ils ont aussi montré l'augmentation du niveau de Met-enképhaline sous l'action de la toxine et de l'ARN antisens d'ASIC1a injectée en icv. De plus, l'effet de la toxine disparaît chez les souris déficientes en gène de la préproenképhaline. Il en résulte que PcTx1 inhiberait les canaux ASIC1a ce qui activerait la synthèse de Met-enképhaline et ainsi agirait sur les récepteurs aux opioïdes μ et δ .

Figure 30 : Séquence de la Psalmothoxine-1 avec les ponts disulfures déterminés expérimentalement (d'après ArachnoServer) :

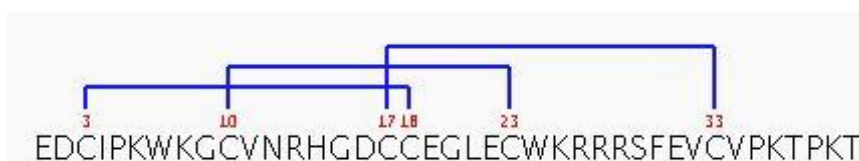


Figure 31 : Photographie de *Psalmopoeus cambridgei* femelle (d'après ArachnoServer) :



II.3. Les toxines inhibitrices des canaux sodiques voltage-dépendants

II.3.1. La toxine GsAFI de *Grammostola rosea*

GsAFI (Figure 32) porte le nom de β -theraphotoxin-Gr1b dans ArachnoServer. C'est une toxine extraite du venin de *Grammostola rosea* (anciennement *Grammostola spatulata*) (Figure 33) qui agit sur les canaux sodiques voltage-dépendants et produit de l'analgésie et de l'anti-hyperalgésie (Saez *et al.* (2010)). GsAFI est un peptide de 3713,5 Da, contenant 29 acides aminés (Lampe (1998)).

Lampe (1998) a testé cette toxine sur différents modèles de douleur chez le rat. Il a montré qu'elle avait un effet analgésique dans les tests de douleur aiguë thermique (flexion de la queue et plaque chauffante), dans la douleur aiguë mécanique (test au filament de von Frey) et dans les deux phases du test au formol. GsAFI était injectée en it aux doses de 180 pmol, 18 pmol et 1,8 pmol et a montré une action dose-dépendante. L'effet de ce composé n'est pas inhibé par les antagonistes des récepteurs aux opioïdes, il n'y a pas de tolérance croisée avec la morphine et la toxine ne semble pas provoquer d'effets secondaires aux doses utilisées.

Figure 32 : Séquence de GsAFI avec les ponts disulfures déduits par homologie avec β -TRTX-Gr1a et la ProTxII (d'après ArachnoServer) :

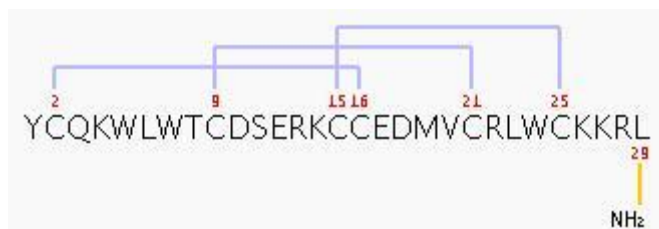


Figure 33 : Photographie d'une *Grammostola rosea* femelle (d'après ArachnoServer) :



II.3.2. Les toxines de *Thrixopelma pruriens*

Les toxines ProTxI (Figure 34) et ProTxII (Figure 35) de *Thrixopelma pruriens* (Figure 36), appelées β/ω -theraphotoxin-1a et 2a, respectivement, modifient toutes les deux les propriétés de déclenchement des canaux sodiques voltage-dépendants avec des sélectivités pour certains types de canaux différentes. ProTxI bloque le canal TTX-R $Na_v1.8$ mais aussi les canaux TTX-S $Na_v1.2$, $Na_v1.5$ et $Na_v1.7$ alors que ProTxII montre une sélectivité pour le canal $Na_v1.7$ humain cent fois supérieure aux autres canaux ainsi qu'une faible affinité pour les canaux calciques $Ca_v3.2$ et $Ca_v3.1$ (Priest *et al.* (2007) et Klint *et al.* (2012)) ce qui peut lui conférer des propriétés analgésiques. Elles possèdent, respectivement, 35 et 30 acides aminés pour un poids moléculaire de 3987,51 Da et 3826,59 Da (ArachnoServer).

ProTxII est un peptide de trente acides aminés appartenant à la famille des ICK. Elle agit en diminuant la conductance du canal et en augmentant le voltage nécessaire à l'ouverture de celui-ci grâce à une action au niveau du capteur de voltage en position de repos et plus particulièrement sur le segment S3 du domaine II. Lors du test par injection d'adjuvant complet de Freund, Schmalhofer *et al.* (2008) ont montré que si une dose iv de 0,01 et 0,1 mg/kg était bien tolérée chez le rat, de la mortalité apparaissait à 1 mg/kg sans effet significatif sur l'hyperalgésie mécanique. Lors d'administration it, la mortalité survient dès la dose de 0,1 mg/kg sans effet sur l'hyperalgésie avec des doses de 0,001 mg/kg et 0,01 mg/kg. Par contre, ils ont montré que la toxine avait la capacité de bloquer les fibres C dans des nerfs isolés dont l'épineurium avait été retiré. Les propriétés de cette toxine en fait un outil d'étude pour développer de nouvelles thérapeutiques visant le canal $Na_v1.7$ (Xiao *et al.* (2010)).

Figure 34 : Séquence de la ProTxI avec les ponts disulfures déduits par homologie (d'après ArachnoServer) :



Figure 35 : Séquence de la ProTxII avec les ponts disulfures déduits expérimentalement (d'après ArachnoServer) :

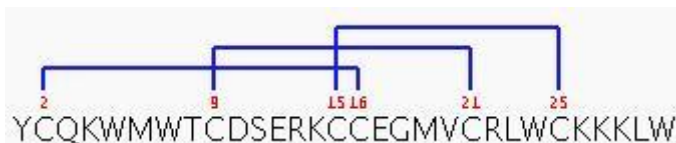


Figure 36 : Photographie d'une *Thrixopelma pruriens* femelle (d'après ArachnoServer) :



II.4. Les toxines inhibitrices des canaux calciques voltage-dépendants

ArachnoServer contient plus de 65 bloqueurs des canaux calciques de mammifères dont 17 inhibent $Ca_v2.2$ dont nous connaissons l'implication dans la transmission du message nociceptif. Il s'agit des Huwentoxine-1, 1a3, 1a6, 1a10 et 10 d'*Haplopelma huwenum* (anciennement *Ornithoctonus huwena* et *Selenocosmia huwena*), des ω -agatoxine IIA, IIIA, IIIA (58T), IIIB, IIIB (35R), IIIB (29S) et IIID d'*Agalenopsis aperta*, des Neurotoxine Tx3-3, 3-4 et 3-6 de *Phoneutria nigriventer*, de la Neurotoxin PRTx3-7 de *Phoneutria reidyi* et enfin de SNX-325 de *Segestria florentina*. Certaines ont été testées sur des modèles de douleur, je vais les exposer.

II.4.1. L'Huwentoxine-1 (Figure 37)

Aussi appelée μ/ω -theraphotoxin-Hh1a, cette toxine de 33 acides aminés à motif ICK, extraite du venin d'*Haplopelma huwenum* (Figure 38), agit principalement sur les canaux calciques voltage-dépendants de type N et sur les canaux sodiques voltage-dépendants (Peng *et al.* (2001) et Wang *et al.* (2007)). Elle agit au niveau présynaptique où elle inhibe la libération de neurotransmetteurs (Liang *et al.* (2000)). Son poids moléculaire est de 3750,37 Da (ArachnoServer).

Chen *et al.* (2005) ont testé l'Huwentoxine-1 sur le modèle de douleur par injection de formol chez le rat et ils ont comparé l'action de la toxine d'araignée avec la toxine MVIIA de *Conus magus* ainsi qu'avec la morphine. Il en a résulté que l'injection it de la toxine d'araignée aux doses de 0,1, 0,5, 1 et 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, avant l'injection de formol, produit un effet analgésique sur les deux phases du test de manière dose-dépendante, et significative par rapport au test négatif qu'à partir de 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

L'AD₅₀ est de 0,28 µg/kg. La diminution du score de douleur basé sur les comportements des rats était équivalente entre l'Huwentoxine-1 et MVIIA pour des doses de 0,1 et 0,5 µg/kg mais à 1 µg/kg, le score est meilleur pour MVIIA. Cette amélioration apparaît simultanément avec les effets secondaires musculaires ce qui peut interférer avec le comportement des animaux et donc fausser la mesure. Par contre, les rats ayant reçu la toxine d'araignée n'ont pas montré de tels effets. En ce qui concerne la morphine à 1 µg/kg it, ils ont montré que le score de douleur était équivalent à celui des toxines mais avec une durée d'action plus courte, 2-3 heures contre 4-5 heures pour les deux autres.

Figure 37 : Séquence de l'Huwentoxine-1 avec les ponts disulfures déduits expérimentalement (d'après ArachnoServer) :

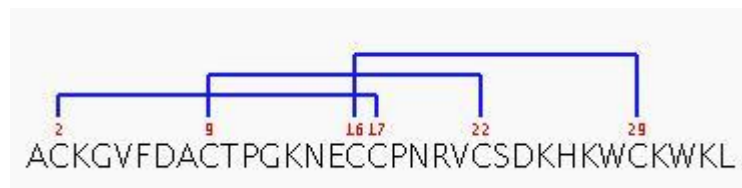


Figure 38 : Photographie d'une femelle *Haplopelma huvenum* (d'après ArachnoServer) :



II.4.2. Les Neurotoxines Tx3-3 et 3-6

La fraction purifiée numéro 3 du venin de *Phoneutria nigriventer* (Figure 41) porte le nom de PnTx3 et contient six peptides neurotoxiques : PnTx3-1 à PnTx3-6. Les deux qui nous intéressent sont PnTx3-3 (Tx3-3) et PnTx3-6 (Phα1β) qui sont appelées respectivement ω-ctenitoxin-Pn2a et Pn4a dans ArachnoServer. Elles possèdent respectivement une séquence de 33 et 55 acides aminés. Le poids moléculaire de Phα1β est de 6032,91 Da (ArachnoServer).

II.4.2.1. Tx3-3 (Figure 39)

L'administration it de Tx3-3 à des doses comprises entre 1 et 100 pmol (1, 3, 10, 30, 48 et 100 pmol) et icv à des doses comprises entre 1 et 30 pmol (1, 3, 10 et 30 pmol) augmente de manière significative le temps de latence du test de retrait de la queue chez la souris pendant un court laps de temps, autour de 15 minutes, pour des doses supérieures à 30 pmol it ou 10 pmol icv.

L'administration massive de toxine (300 pmol) ne suffit pas à provoquer les effets secondaires habituellement imputables aux bloqueurs des canaux calciques. En effet, aucune répercussion n'est observée sur l'activité motrice alors que la morphine à la dose de 70 nmol it, utilisée comme témoin positif, désorganise les mouvements des souris (Dalmolin *et al.* (2011)). Mais selon Dalmolin *et al.* (2011), l'administration it de 30 pmol de Tx3-3 permet de diminuer l'allodynie mécanique, 7 jours après la ligature partielle du nerf sciatique, chez le rat entre 30 et 120 minutes post injection. Et de même, la toxine inhibe l'allodynie mécanique qui apparaît chez des souris et des rats atteints de neuropathies d'origine diabétique. Contrairement aux autres modèles, la toxine n'a aucun effet ni pour prévenir ni pour renverser l'allodynie mécanique qui survient lors de l'inflammation après injection d'adjuvant de Freund.

Tx3.3 agit en bloquant les canaux calciques de type P/Q et R ce qui inhibe le flux entrant de calcium ainsi que la libération des neurotransmetteurs tel le glutamate. Cette inhibition pourrait expliquer l'effet analgésique rapide produit par l'injection au niveau spinal mais aussi supra-spinal de la toxine sur le test de retrait de la queue. Ce réflexe n'est pas seulement une boucle à l'étage spinal, il est aussi sous le contrôle de structures supra-spinales comme nous l'avons déjà vu. Dalmolin *et al.* (2011) émettent la théorie que Tx3-3, administrée en icv, inhibe les canaux calciques responsables de l'activation de la voie descendante qui facilite la douleur.

Figure 39 : Séquence de la Tx3-3 avec les ponts disulfures hypothétiques (d'après ArachnoServer) :



II.4.2.2. Ph α 1 β (Figure 40)

Avec le test de la plaque chauffante, Souza *et al.* (2008) ont montré que la toxine administrée à 200 pmol en it produisait une augmentation retardée (à partir de 3h après injection) mais de longue durée (24h après injection) de la latence avec une AD₅₀ de 120 pmol. En comparaison, la toxine MVIIA, à 10 pmol it, induit un effet équivalent, de plus courte durée (entre 2 et 5h après injection) mais avec une AD₅₀ beaucoup plus faible de 0,17 pmol. Dans le cas du test au formol, le prétraitement avec 200 pmol de toxine ou 100 pmol de MVIIA inhibaient les deux phases du test de la même façon. Par contre, lors de post-traitement, Ph α 1 β réduisait le score de douleur de manière plus importante que la toxine de cônes ce qui en a fait un composé plus efficace pour renverser un processus douloureux déjà établi. Ils ont aussi testé la toxine sur un modèle de douleur neuropathique, le test de ligature partielle du nerf sciatique, lors duquel ils ont mis en évidence un effet anti-allodynique de Ph α 1 β à la dose de 30 pmol it sans atteinte de la sensibilité mécanique normale. Dans une autre étude, Souza *et al.* (2011) ont testé la toxine sur un modèle de douleur postopératoire qui consistait à mesurer l'allodynie mécanique après une incision plantaire chez le rat. Il en a résulté que l'utilisation préventive de la toxine à la dose de 100 pmol inhibait l'allodynie mécanique à partir de 2h jusqu'à 6h après injection avec un maximum à 2h, et avec une dose de 200 pmol, l'action durait plus de 24h avec un maximum au bout de 3h. Ph α 1 β n'agit pas sur le système cardio-vasculaire, ni sur le système locomoteur ni sur la libération de cytokines pro-inflammatoires sur des cultures de monocytes CD14 aux doses utilisées selon Souza *et al.* (2011) alors que la même

équipe, en 2008, expliquait que la toxine provoquait une hypotension modérée, lors d'injection it de 200 pmol, qui revenait à la normale au bout de 3h. Ph α 1 β possède tout de même une fenêtre thérapeutique 4 fois supérieure à celle de la conotoxine MVIIA (Souza *et al.* (2008)).

Cette toxine agirait comme Tx3-3 en inhibant les canaux calciques et en bloquant la libération de glutamate car Souza *et al.* (2008) ont montré qu'elle avait la capacité d'empêcher l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et la concentration extracellulaire de glutamate lors de stimulation des neurones par la capsaïcine. De plus, Ph α 1 β agit sur tous les types de canaux calciques voltage-dépendants mais avec plus ou moins d'efficacité (N>R>P/Q>L).

Figure 40 : Séquence de la Ph α 1 β avec les ponts disulfures hypothétiques (d'après ArachnoServer) :



Figure 41 : Photographie d'une femelle *Phoneutria nigriventer* (d'après ArachnoServer) :



II.5. Les toxines inhibitrices du récepteur P2X3

Les purtoxine-1 et 2 sont extraites du venin des araignées d'Asie Centrale du genre *Geolycosa sp.* La première est constituée d'une séquence de 35 acides aminés reliée par quatre ponts disulfures et la deuxième est composée de 64 acides aminés avec quatre ponts disulfures. Les deux toxines bloquent le récepteur P2X3 dans son état inactivé. La recherche de nouveaux analogues de la purtoxine-1 à partir de la banque de gènes des araignées a permis la synthèse de six composés dont trois montrent une action inhibitrice sur P2X3 ainsi qu'une activité antinociceptive marquée (Grishin (2012)).

II.6. Les toxines inhibitrices des récepteurs mécano-sensibles

II.6.1. La GsAFII (Figure 42)

GsAFII est un peptide de 3985,9 Da pour 31 acides aminés extrait du venin de *Grammostola rosea* qui, en plus d'agir sur les canaux potassium comme son nom, κ -theraphotoxin-Gr2c, le suggère, inhibe les canaux mécano-sensibles induisant une diminution de l'influx de calcium (Lampe et Sachs (1999)).

Lampe (1998) a montré qu'elle avait un effet analgésique dans les tests de douleur aiguë thermique (flexion de la queue et plaque chauffante), dans la douleur aiguë mécanique (test au filament de von Frey) et dans les deux phases du test au formol lors d'injections par la voie it aux doses de 2,33 nmol et 583 pmol. GsAFII a montré un effet dose dépendant plus rapide et plus important que GsAFI. Cette toxine agissait sur les canaux mécano-sensibles de la périphérie

Figure 42 : Séquence de GsAFII avec les ponts disulfures déduits par homologie avec la κ -theraphotoxin-Gr2a (d'après ArachnoServer) :



II.6.2. la GsMTx4 (Figure 43)

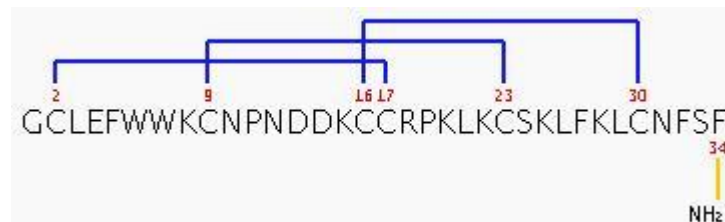
La méchanotoxine-4 (GsMTx4) est un peptide de 34 acides aminés, et de 4094 Da de poids moléculaire (Bowman *et al.* (2007)), possédant un motif ICK, extrait du venin de *Grammostola rosea* qui est classé sous le nom de M-theraphotoxin-Gr1a dans ArachnoServer. Park *et al.* (2008) ont testé la toxine sur plusieurs modèles de douleur. Ils ont montré que l'injection ip de 270 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de GsMTx4 augmentait de manière significative le seuil de retrait de la patte sous l'effet d'un stimulus mécanique de forte intensité (Randall et Sellito) sans inflammation préalable chez le rat alors qu'un stimulus mécanique de plus faible intensité (filament de von Frey) n'avait pas d'effet. Toujours à la même posologie, la toxine contrait l'hyperalgésie mécanique provoquée par l'inflammation à la carragénine pendant plus de 6h. La toxine réussissait aussi à diminuer de manière significative l'allodynie mécanique lors d'inflammation, mais près de 1000 fois moins que la morphine. Lors de neuropathie induite par la ligature partielle du nerf sciatique l'allodynie mécanique était aussi diminuée mais l'effet de la morphine n'a pas été testé. Ils ont mesuré ensuite la répartition des masses corporelles entre le membre postérieur enflammé et le membre postérieur sain. Il en a résulté que la toxine rééquilibrait la répartition de manière équivalente à la morphine sans revenir à la valeur des animaux sains ce qui montrerait une diminution de l'hyperalgésie mécanique induite par l'inflammation. Contrairement aux tests mécaniques, la toxine n'a pas eu d'action sur les modèles de douleur aiguë thermique de la plaque chauffante et du retrait de la queue. Enfin, ils ont montré que la toxine, à la posologie utilisée, n'affectait pas l'activité motrice des animaux.

Bowman *et al.* (2007) ont étudié le mode d'action de GsMTx4. Ils ont montré que la toxine possédait une partie hydrophobe qui lui permettait de s'incorporer et se rependre dans la membrane lipidique. Ainsi, elle pouvait agir comme un modulateur de déclenchement sur des canaux activés par l'étirement comme les canaux mécano-sensibles. De plus elle ne fonctionnait pas comme le modèle traditionnel de la clé et de la serrure car la forme chirale de la toxine possédait exactement le même

effet que la forme naturelle. En étudiant la gramicidine, qui est un peptide cylindrique dimérique dont chaque monomère est enchâssé dans une moitié de membrane et dont la mise bout-à-bout forme un canal, ils ont émis l'hypothèse que la toxine plierait les phospholipides membranaires ce qui modifierait les propriétés de la membrane plasmique comme par exemple, son épaisseur. Mais encore, la toxine agirait sur les canaux TRP dits « classiques » TRPC1 présents dans les muscles lisses.

Nous retiendrons que GsMTx4 agit uniquement sur les mécanorécepteurs et possède un effet analgésique dans les modèles de douleur mécanique de forte intensité et dans tous les modèles de douleur mécanique lors d'inflammation ou de lésion nerveuse. Il en résulte qu'en milieu sain, la toxine agirait plutôt sur les nocicepteurs à haut-seuil de déclenchement des fibres C, et lors d'inflammation ou de neuropathie, la sensibilisation des nocicepteurs permettrait une action anti-hyperalgésique même avec des stimuli faibles (Park *et al.* (2008)).

Figure 43 : Séquence de la GsMTx4 avec les ponts disulfures déduits expérimentalement (d'après ArachnoServer) :



III. Les toxines extraites du venin des scorpions

III.1. Généralités sur les venins de scorpions

Deux groupes de peptides et/ou toxines peuvent être différenciés dans le venin des scorpions dangereux pour les mammifères : celles à chaîne courte, environ 29 à 41 acides aminés, et celles à chaîne longue, entre 60 et 76 acides aminés (Xiong *et al.* (1999)). Ce sont ces dernières qui sont responsables des effets neurotoxiques, lors de piqûre de scorpions, notamment par une action sur les canaux sodiques. Jusqu'à présent, toutes les toxines dont la structure tridimensionnelle a été déterminée possèdent un noyau commun composé d'une topologie $\beta\alpha\beta\beta$ (feuillet β , hélice α , feuillet β , feuillet β) avec des boucles à séquence hautement variable pour les connecter. Trois ponts disulfures stabilisent ce repliement. Elles possèdent un poids moléculaire entre 6500 et 8000 Da (Rodriguez de la Vega et Possani (2005)).

Les toxines à longues chaînes sont ensuite classées dans un groupe dit α quand elles se fixent sur le site 3 du canal ou un groupe β quand elles ciblent le site 4. Parmi les α , on considère celles dites « classiques » qui sont très actives sur les mammifères, celles dites « anti-insectes » qui agissent sur les hexapodes et celles dites de « types α » qui ciblent les deux.

III.2. Les toxines possédant des propriétés analgésiques dans le venin de *Mesobuthus martensii* (Figure 44)

Approximativement 36 toxines à longues chaînes ont été extraites du venin de *Mesobuthus martensii* (nommé *Buthus martensi* Karsch dans la littérature) (Rodriguez de la Vega et Possani (2005)).

III.2.1. Les toxines BmK AS, BmK AS-1 et BmK IT2

La toxine BmK AS est une toxine β de 66 acides aminés (Liu *et al.* (2008)) et de 7693,7 Da de poids moléculaire. Elle porte aussi le nom de BmK PL. BmK AS-1 partage 84,8% d'homologie avec BmK AS, elle possède aussi 66 acides aminés pour un poids moléculaire de 7721 Da. BmK IT2, quant à elle, partage 31,7% d'homologie avec BmK AS, possède 61 acides aminés et un poids moléculaire de 6650 Da (UniProt (2012)).

Chen et Ji (2002) ont mis en évidence un effet analgésique de BmK AS au test de retrait de la patte suite à un stimulus thermique chez le rat ainsi qu'un effet anti-hyperalgésique thermique chez cette espèce lors d'injection sc de 0,01, 0,1 et 1 μg de toxine. Chen *et al.* (2006) ont montré que le prétraitement, à la dose de 0,2 ou 1 μg ipl de BmK AS, diminuait les comportements douloureux des rats pendant les deux phases du test au formol. Lorsque l'injection, à la même posologie, avait lieu après la phase précoce du test, ils obtenaient une diminution des tressaillements dans la deuxième phase. Bai *et al.* (2007) ont réalisé la même expérience et obtenu les mêmes résultats avec BmK IT2 aux doses de 0,01, 0,1 et 1 μg en it cette fois. Liu *et al.* (2008) ont mis en évidence l'activité de BmK AS au niveau central. Le prétraitement par voie it avec 0,02, 0,1 et 0,5 μg de toxine inhibait les deux phases du test au formol de manière dose dépendante.

La capacité de BmK AS-1 (Tan *et al.* (2001b)) et BmK IT2 (Tan *et al.* (2001a)) à inhiber la décharge des fibres C a été estimée chez le rat. Ils ont mesuré la réponse, sur l'électromyogramme (EMG), à la suite d'un stimulus électrique dans le muscle semitendineux. Ils ont montré que les deux

toxines avaient la capacité de diminuer de manière dose dépendante la composante électrique tardive imputée aux fibres C, aux doses de 5, 10 et 20 µg ipl pour BmK AS-1 et 0,2 et 10 µg pour BmK IT2.

En ce qui concerne le mode d'action de BmK AS, Chen *et al.* (2006) ont réalisé des mesures sur des neurones de ganglions rachidiens isolés en présence de la toxine et ils ont démontré qu'elle avait la capacité d'inhiber la formation des potentiels d'action en bloquant les canaux sodiques TTX-R et TTX-S de façon partiellement réversible. La même observation a été faite pour BmK AS-1 (Tan *et al.* (2001a)) ainsi que pour BmK IT2 (Tan *et al.* (2001b)). Ce mécanisme abaisse le voltage nécessaire à l'activation des canaux vers une valeur encore plus négative. Comme les deux toxines BmK AS et BmK AS-1 sont connues pour favoriser la liaison de la ryanodine à son récepteur sur la membrane du réticulum endoplasmique dans les triades des muscles squelettiques (Kuniyasu *et al.* (1999)), Chen *et al.* (2006) ont vérifié si BmK AS avait la capacité de modifier la concentration calcique cytosolique des neurones. Il n'en est rien. De plus, Tan *et al.* (2001a) ont montré que l'effet analgésique était indépendant des récepteurs aux opioïdes car la naloxone n'avait aucun effet. Enfin, l'étude de l'expression de la protéine c-Fos (un marqueur de l'activité cellulaire) dans les neurones des lames superficielles de la corne dorsale de la moelle, lors du test au formol, a montré que la toxine BmK IT2 diminuait la transcription dans ces cellules comparativement aux neurones des animaux non traités

III.2.2. La toxine BmK AGAP

BmK AGAP est une toxine de 66 acides aminés aussi appelée BmKT (UniProt (2012)). Liu *et al.* (2003) ont mis en évidence son efficacité dans le test de la plaque chauffante chez la souris à la dose de 1 mg/kg injectée en iv. Ils ont aussi montré une activité anti-tumeur contre les cellules d'*Erlich ascites* et contre les cellules de fibrosarcome S-180. Ma *et al.* (2010) ont testé la toxine, injectée à la dose de 0,14 µmol/kg ip, sur le test des crampes abdominales et ont mis en évidence une diminution de l'expression comportementale de la douleur chez la souris. Le mode d'action doit faire intervenir des canaux sodium mais la pharmacologie de cette toxine n'est pas connue.

III.2.3. La toxine BmK IT-AP (*Insect Toxin – Analgesic Peptid*)

BmK IT-AP est une toxine β de 72 acides aminés et de poids moléculaire égal à 8149,39 Da (UniProt (2012)). Xiong *et al.* (1999) ont montré l'efficacité de la toxine pour diminuer les crampes abdominales à des doses comprises entre 10⁻⁷ et 10 mg/kg en ip. Ils n'ont pas montré de toxicité à 10 mg/kg en iv cette fois. Elle agit probablement sur les canaux sodiques.

III.2.4. La toxine BmK 9

Wang *et al.* (2011) ont montré que la toxine BmK 9, possédant 65 acides aminés, diminuait le nombre de crampes abdominales, lors d'injection ip d'acide acétique, à la dose de 0,5 mg/kg iv sans préciser le mode de fonctionnement, probablement en agissant sur les canaux sodiques.

III.2.5. La Drosotoxine et la DrTx(1-42)

Zhu *et al.* (2010) ont fabriqué un composé chimère dans lequel le noyau de la toxine BmK ITc avait été remplacé par la drosomycine, une défensine antifongique de *Drosophila*, appelée Drosotoxine. Ce composé, de 63 acides aminés, inhibait les courants des canaux sodiques TTX-R sans agir sur les TTX-S ni les canaux calciques et potassiques. Zhu *et al.* (2011) ont tronqué la partie

C-terminale pour ne garder que les 42 premiers acides aminés. Ce nouveau composé analogue de la Drosotoxine, la DrTx(1-42), inhibait le léchage et les tressaillements de la deuxième phase du test au formol sans agir sur la première à la dose de 0,1 et 1 mg/kg iv avec une meilleure action de la dose forte. Aucune toxicité n'a été observée ni sur culture cellulaire ni sur les souris *in vivo*.

III.2.6. Autres toxines

Selon Maertens *et al.* (2006), les toxines BmK AngM1, BmK AngP1, BmK I1, BmK I4 et BmK I6 possèderaient des propriétés analgésiques.

Figure 44 : Photographie de *Mesobuthus martensii* (d'après UniProt (2012)) :



III.3. Les toxines extraites du venin d'autres espèces de scorpions

Martin-Eauclaire *et al.* (2010) ont recherché l'activité de la toxine α AmmVIII d'*Androctonus mauritanicus mauritanicus*, et de la toxine β Lqq IT2 de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* sur les tests de la plaque chauffante et du retrait de la queue. AmmVIII possède 65 acides aminés pour un poids moléculaire de 7382 Da et Lqq IT2 possède 61 acides aminés (UniProt (2012)).

Les doses de 20, 40 et 80 μ g ip d'AmmVIII ainsi que 50, 80 et 160 μ g ip de Lqq IT2 augmentaient les latences des deux tests de manière dose dépendante avec une meilleure efficacité pour la toxine d'*Androctonus*. En voulant tester l'action des toxines au niveau central, Martin-Eauclaire *et al.* (2010) ont injecté 125 ng d'AmmVIII et 3500 ng de Lqq IT2 icv sans réussir à montrer d'amélioration des tests. Ils ont mis en évidence l'implication des récepteurs aux opioïdes dans l'effet périphérique des toxines car la naloxone inhibe en partie leur action. Les chercheurs ont émis l'hypothèse qu'une partie de l'effet analgésique devait résulter de l'activation des CIDN et que l'autre partie de l'effet, non inhibée par l'antagoniste des récepteurs aux opioïdes, devait résulter de l'action des toxines sur des canaux sodiques. Des études plus approfondies sont nécessaires.

IV. Les toxines extraites du venin d'anémones de mer

IV.1. La toxine APETx2

L'anémone de mer *Anthopleura elegantissima* possède majoritairement dans son venin une toxine appelée APETx2 qui cible les canaux ASIC3. Elle est composée de 42 acides aminés pour un poids moléculaire de 4561,10 Da. Cette toxine bloque les ASIC3 homomériques, rapidement et de manière totalement réversible en quelques minutes. Les canaux ASIC3 hétéromériques sont inhibés avec moins d'efficacité. Elle appartient à la famille des β -defensines avec 4 feuillets β et 3 ponts disulfures (Diochot *et al.* (2007)).

Deval *et al.* (2008) ont testé l'effet d'APETx2 sur des fibres C de rats isolées à partir de préparations de nerfs cutanés. Ils ont montré que 51% des fibres s'activaient à un pH de 6,9 et que 41% de ces fibres avaient une activation spontanée au pH de 6,6. Dans toutes les fibres C étudiées, l'application de 10 $\mu\text{mol/L}$ de toxine dans le milieu a suffi à supprimer la formation de potentiels d'action induite par le pH de 6,9 confirmant l'importance d'ASIC3 comme détecteur majeur de faibles variations de pH par les nocicepteurs. Ils ont aussi mis en évidence des comportements de douleur chez des rats chez lesquels une solution à pH 6,9 avait été injectée en sc dans le membre postérieur. La co-injection de toxine a évité le développement de tels comportements. Dans la même étude, il a été montré qu'APETx2 à la dose de 300 pmol, mais pas PcTx1 à la dose de 18 pmol, réussissait à inhiber la mise en place d'une hyperalgésie thermique chez le rat lors d'une inflammation induite par l'adjuvant de Freund montrant ainsi l'importance d'ASIC3 mais pas d'ASIC1a homomérique dans l'hyperalgésie thermique induite par l'inflammation au niveau périphérique chez cet animal. Dans le même modèle d'inflammation, Karczewski *et al.* (2010) ont testé l'action d'APETx2 par injection ipl et it. Ils ont montré une augmentation du seuil de retrait du membre pour des doses de 22 pmol et 220 pmol ipl avec un retour à un seuil proche de celui obtenu avant injection d'adjuvant pour la forte posologie. Ils n'ont pas obtenu d'amélioration de la douleur mécanique sur le membre controlatéral à l'inflammation, ni lors d'injection it. Par conséquent, les canaux ASIC3 périphériques contribueraient à la maintenance de l'hyperalgésie mécanique lors d'inflammation par l'adjuvant de Freund.

La capacité de la toxine à empêcher le développement d'une hyperalgésie tactile (filament de von Frey) dans un modèle de douleur musculaire induite par l'injection d'une solution acide à pH 4 chez le rat a été évaluée par Karczewski *et al.* (2010). Ils ont induit une inflammation musculaire en injectant, dans le même site, à 5 jours d'intervalle, 100 μL d'une solution saline acide dans le muscle gastrocnémien. Ils ont obtenu une augmentation du seuil de retrait du membre ipsilatéral et controlatéral, de manière dose-dépendante, lors d'injections im, à un moment intermédiaire entre les deux injections d'acide et dans le même site d'injection, de 22 et 220 pmol d'APETx2 (pas d'effet de 7 pmol). Si l'administration de toxine avait lieu après la deuxième injection d'acide, alors que l'hyperalgésie était déjà installée, APETx2 ne montrait aucun effet. Pour montrer l'intervention des canaux ASIC3 spinaux dans le développement et le maintien de la douleur musculaire induite par l'acide, ils ont testé APETx2 par administration it. A nouveau, la toxine, injectée entre les deux administrations d'acide, augmentait le seuil de retrait des deux membres de manière dose-dépendante à des posologies de 4,4 pmol et 440 pmol. Lors de l'administration après la deuxième injection d'acide, la toxine, aux deux posologies, augmentait ce seuil mais de manière insuffisante pour que ce fût significatif. Enfin, la forme dénaturée de la toxine (ponts disulfures ouverts) n'agit pas au niveau spinal. L'action de la toxine sur les deux membres à la fois ainsi que dans la moelle épinière

découlerait d'une sensibilisation du système nerveux central dans ce modèle spécifique d'inflammation car de telles observations n'ont pas été réalisées avec le test à l'adjuvant de Freund.

La toxine APETx2 a aussi fait l'objet d'une étude dans un modèle de douleur postopératoire chez le rat dans laquelle l'hyperalgésie thermique, la répartition des masses corporelles et les tressaillements ont été évalués (Deval *et al.* (2011)). L'injection de 400 pmol de toxine dans la zone opérée a réduit le nombre de tressaillements de près de 50%, a diminué légèrement l'hyperalgésie thermique et n'a pas montré de modification significative dans la répartition des masses corporelles entre les animaux traités et les témoins négatifs. En revanche, les animaux prétraités avec de l'ARN de ASIC3 antisens injecté *in vivo* ont montré une diminution de l'ordre de 60% du nombre de tressaillements, une hyperalgésie thermique atténuée ainsi qu'une répartition des masses corporelles normale. Par la suite, Deval *et al.* (2011) ont pu mettre en évidence la surexpression du gène codant ASIC3 en dosant par RT-qPCR (*Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction*), la quantité d'ARN dans les neurones des noyaux rachidiens ipsilatéraux à l'opération.

En conclusion, les canaux ASIC3 périphériques provoquent une sensibilisation centrale après injection d'acide ou lors de chirurgie contribuant à la mise en place d'une hyperalgésie qui est aussi observée lors d'injection d'adjuvant de Freund. Cibler ces canaux pourrait représenter une nouvelle approche dans le traitement des douleurs musculaires et post-opératoires.

IV.2. La toxine APHC1

La toxine APHC1 (pour *Analgesic Peptides of Heteractis crispa 1*) est extraite du venin de l'anémone *Heteractis crispa*. Cette toxine est composée de 56 acides aminés pour un poids moléculaire de 6187 Da. Elle cible les récepteurs TRPV1.

L'étude de l'activité de la toxine sur des oocytes de xénopes exprimant le récepteur TRPV1 de l'homme par Andreev *et al.* (2008) a montré qu'elle réduisait les courants ioniques provoqués par l'action de la capsaïcine de façon partielle et réversible avec une dose efficace à 50% de 54 ± 4 nmol. Elle agirait comme un modulateur et non pas comme un bloqueur. Dans cette étude, l'effet de l'APHC1 a été testé chez la souris sur le test de retrait de la queue, à la dose de 0,1 mg/kg *im* injectée à la base de la queue, et le test de léchage après injection de capsaïcine, à la dose de 0,1 mg/kg *iv* injectée 15 minutes avant l'irritant. Andreev *et al.* (2008) ont montré, dans les deux cas, une amélioration des résultats aux tests de douleur jusqu'à en obtenir proches de ceux mesurés avec les souris TRPV1 KO lors d'injection *iv*. Aucune toxicité n'a été observée jusqu'à la dose maximale testée de 1 mg/kg *iv*.

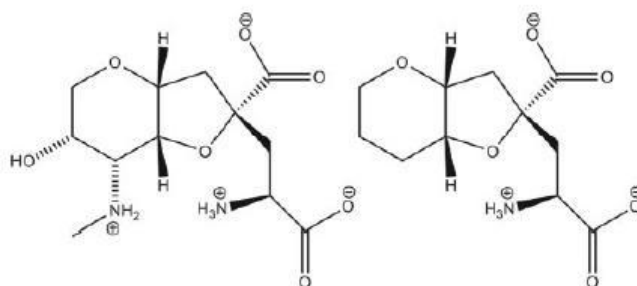
Les anticorps polyclonaux de lapin anti TRPV1 de rats, spécifiques de la boucle considérée comme étant le capteur de pH, à l'instar de l'action d'APHC1, ne sont pas capables de bloquer totalement l'activation des canaux par la capsaïcine. De plus, dans une concentration à saturation, ils n'ont que 55% d'effet au maximum ce qui ressemble aux caractéristiques de l'action de la toxine. Andreev *et al.* (2008) ont donc émis l'hypothèse que la toxine d'anémone agissait, de la même façon, sur la boucle sensible au pH.

V. Le dérivé MSVIII-19 d'une toxine extraite d'une éponge marine

Le composé MSVIII-19 est un dérivé de la dysiherbaïne, une toxine de l'éponge marine *Lendenfeldia chondrodes*. Les deux molécules sont présentées dans la Figure 45. La toxine est un antagoniste vrai du récepteur ionotropique kaïnate au glutamate GluK1 (GluR5) alors que MSVIII-19 est un agoniste partiel très faible, qui les désensibilise sans les activer, lui donnant une propriété d'antagoniste (Frydenvang *et al.* (2009)).

Qiu *et al.* (2011) ont testé l'efficacité de MSVIII-19 sur plusieurs modèles de douleur. La douleur lors des deux phases du test au formol était bloquée significativement par des injections it de 2, 1, 0,5, 0,1 nmol de composés, 15 minutes avant le formol. Dans le même contexte, l'injection ipl de MSVIII-19 n'agissait pas sur la douleur. L'hyperalgésie thermique a été mesurée sur le membre ayant reçu l'injection de formol et le traitement avec 0,5 nmol de composés it. Le traitement a permis de retourner à des valeurs de base. En revanche, MSVIII-19 n'a pas été capable, dans les mêmes conditions, de renverser l'allodynie tactile. Des résultats similaires ont été enregistrés pour la même dose dans le test d'inflammation avec de l'adjuvant de Freund. Dans le test de douleur neuropathique des lésions de constriction chronique du nerf sciatique chez la souris, Qiu *et al.* (2011) ont montré que le MSVIII-19 avait la capacité de renverser l'hyperalgésie thermique et l'allodynie mécanique, toujours à la dose de 0,5 nmol it, mais comme précédemment, l'injection ipl de 2 nmol n'a pas eu d'effet. Le composé n'a pas agit sur la douleur viscérale lors du test des crampes ni sur le test de retrait de la queue. Enfin, quelle que fût la dose injectée it, le composé ne provoquait pas d'incoordination motrice.

Figure 45 : Structure de la dysiherbaïne (à gauche) et de MSVIII-19 (à droite) (d'après Frydenvang *et al.* (2009))



VI. Propriétés analgésiques du venin d'abeille

L'utilisation du venin d'abeille dilué pour tremper les aiguilles avant de les utiliser en acupuncture a montré un effet analgésique dans plusieurs modèles de douleur chez l'animal. L'acupuncture avec du venin d'abeille, aussi appelée apipuncture, inhibe les comportements douloureux lors du test d'injection de formol, réduit l'hyperalgésie thermique et mécanique ainsi que la nociception viscérale. Elle soulage la douleur arthrosique induite par l'injection de collagène ainsi que la douleur liée à l'arthrose du genou (Chen *et al.* (2010)). Cette méthode aurait un effet analgésique dans des modèles de douleur aiguë comme celui de la plaque chauffante (Chen et Larivière (2010)). L'apipuncture inhibe aussi la formation d'œdème lors d'induction d'inflammation par l'injection d'irritants ce qui met en évidence un effet anti inflammatoire (Chen *et al.* (2010)).

L'effet analgésique de l'apipuncture proviendrait de la douleur provoquée par la réaction cutanée au lieu d'injection (quoiqu'en disent les partisans de la technique) qui activerait les centres supra-spinaux et les voies descendantes inhibitrices ainsi que les CIDN. Nous avons déjà vu l'implication des neurones en provenance de la RBVM, libérant de la sérotonine, et ceux en provenance du *locus coeruleus*, libérant de la noradrénaline. La yohimbine et l'idazoxan, deux antagonistes des récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques, inhibent l'effet analgésique du venin, ce que ne font ni la prozacine, ni le propranolol, antagonistes respectivement des récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques et β -adrénergiques. De plus, le méthysergide, un antagoniste des récepteurs de la sérotonine, inhibe aussi l'effet de l'apipuncture. Ces observations apportent des arguments pour prouver, effectivement, l'implication des centres supérieurs (Chen et Larivière (2010)). Une autre étude a mis en évidence l'augmentation de l'activité des neurones du *locus coeruleus* par l'injection au point d'acupuncture Zusanli (5 mm en-dessous et latéralement à la tubérosité tibiale) de 0,25 mg/kg de venin d'abeille deux fois par jour pendant une semaine, 15 jours après la constriction chronique du nerf sciatique chez des rats (Kang *et al.* (2012)). Ils ont observé de manière concomitante une diminution de l'activité des récepteurs NMDA dans les cornes dorsales en mesurant la quantité de sous-unités NR1 phosphorylées.

L'injection ipl de venin d'abeille permet l'obtention d'un modèle de douleur d'origine inflammatoire avec une douleur spontanée persistante, de l'hyperalgésie mécanique et thermique, ainsi que des marques évidentes d'inflammation tel que de l'œdème et de la rougeur sur le lieu d'injection. Chen *et al.* (2010) ont utilisé ce modèle pour tester l'efficacité de la méthode d'acupuncture avec d'autres pro-inflammatoires : le formol et l'adjuvant de Freund. Ils ont montré que ces deux composés injectés aux points d'acupuncture Zusanli produisaient une inhibition significative de la douleur persistante spontanée et diminuaient l'hyperalgésie mécanique mais n'avaient aucun effet sur l'œdème inflammatoire. De plus, ils ont mis en évidence, par le prétraitement par la naloxone, que l'effet analgésique de l'apipuncture agissait indépendamment des récepteurs aux opioïdes.

En conclusion, l'effet analgésique du venin d'abeille injecté dilué par des aiguilles d'acupuncture ne proviendrait pas de sa composition mais plutôt de sa capacité à provoquer une réaction douloureuse et à activer les voies descendantes inhibitrices de la douleur.

CONCLUSION

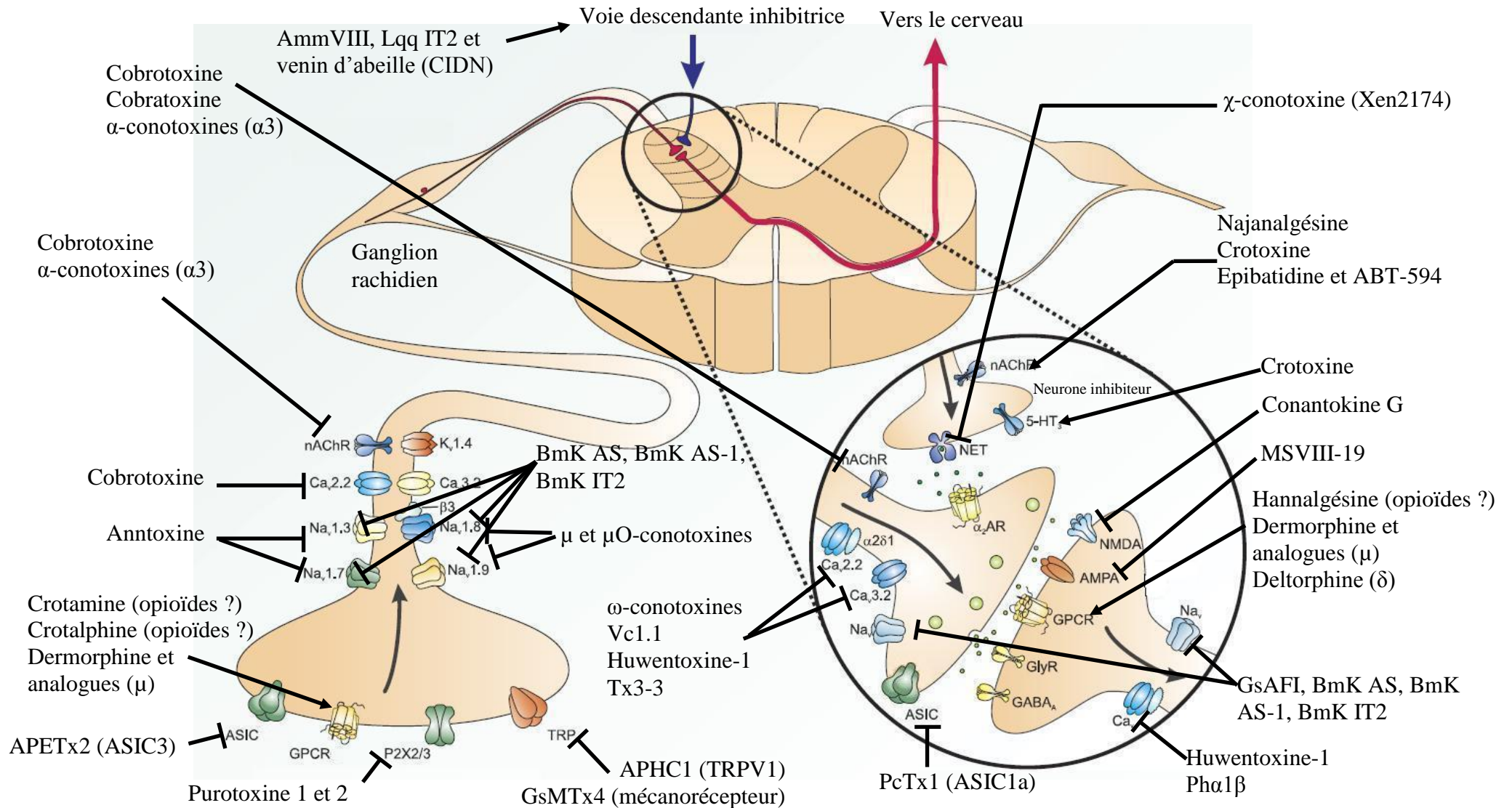
Les premiers composés analgésiques ont été extraits des plantes, comme par exemple l'aspirine produite à l'origine à partir de l'écorce de Saules du genre *Salix* et la morphine extraite de la sève du pavot *Papaver somniferum*.

Les avancées en toxicologie moléculaire ont montré le rôle potentiel des toxines de venins d'animaux dans le contrôle de la douleur. La Figure 46 illustre l'action des toxines décrites dans cette synthèse bibliographique sur leurs cibles. Ces actions peuvent être des activations (flèche) ou des inhibitions (trait barré) et elles ont lieu, soit à la périphérie soit au niveau central. En raison de leur grande sélectivité, les composés extraits des venins ont prouvé qu'ils étaient particulièrement utiles dans les études expérimentales *in vitro* et *in vivo* pour mieux comprendre la physiologie des organismes. Cependant, avant de voir ces composés devenir des médicaments, un certain nombre de problèmes liés à l'innocuité, à la pharmacocinétique et au mode de délivrance doivent être abordés. Mais ces écueils ne sont pas insurmontables comme l'a montré l' ω -conotoxine MVIIA disponible sur le marché sous le nom déposé de Prialt® qui a su se faire accepter malgré sa voie d'administration peu commune. De plus, le Xen2174 (ou Pyroglutamate1-MrIA) est un composé prometteur en phase IIb d'essai clinique.

Mais l'intérêt des toxines d'origine animale ne se cantonne pas à la recherche de nouveaux composés pour lutter contre la douleur. Les venins ont évolué pour provoquer le plus de dégâts possibles, avec un temps d'action très court, chez la proie. Par conséquent, ce sont des cocktails de molécules avec des actions variées comme des anticoagulants, des bloqueurs des canaux ioniques, des agonistes des canaux ioniques, des molécules algogènes, immunomodulatrices... Ainsi, d'autres médicaments sur le marché dérivent de toxines comme le Captopril® qui est un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine dérivé du téprotide extrait du venin du serpent *Bothrops jararaca* ou encore le Byetta®, composé d'exanetide, un dérivé de l'exentine-4 du venin du monstre de Gila *Heloderma suspectum*. Ce principe actif agit comme un analogue du récepteur du *glucagon-like peptide 1*, il sert à traiter le diabète de type 2 chez l'adulte en induisant une sécrétion d'insuline et une inhibition de la libération de glucagon.

Escoubas et King (2009) estiment à vingt millions le nombre cumulé de peptides dans les venins de tous les animaux et seulement quelques milliers ont été caractérisés. Il reste des pistes à creuser. Par exemple, les peptides d'araignées n'ont pas été testés sur les récepteurs ligand-dépendants ni sur les récepteurs couplés à des protéines G ni sur les transporteurs des neurotransmetteurs... La toxicologie possède de beaux jours devant elle.

Figure 46 : Schéma bilan représentant l'action des toxines sur leur(s) cible(s) (trait barré = inhibition et flèche = activation) (d'après Lewis *et al.* (2012)) :



BIBLIOGRAPHIE

ADAM F. et LE BARS D. Voies de la douleur. *In*: MARTIN C., RIOU B. et VALLET B. (2006). *Physiologie humaine appliquée*. Arnette, Rueil-Malmaison, 845-857

ANDREEV Y. A., KOZLOV S. A., KOSHELEV S. G., IVANOVA E. A., MONATYRNAYA M. M., KOSLOVSKAYA E. P. *et al.* (2008) Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispata* is the first polypeptide inhibitor of vanilloïde receptor 1 (TRPV1). *J. Biol. Chem.*, **283**, 23914-23921

ALICINO I., GIGLIO M., MANCA F., BRUNO F. et PUNTILLO F. (2012) Intrathecal combination of ziconotide and morphine for refractory cancer pain : A rapidly acting and effective choice. *Pain*, **153**, 245-249

AMBRIZ-TUTUTI M., ROCHA-GONZALEZ H. I., CRUZ S. et GRANADOS-SOTO V. (2009) Melatonin : A hormone that modulates pain. *Life Sci.*, **84**, 489-498

ANDREOTTI N., JOUIROU B., MOUHAT S., MOUHAT L. et SABATIER J.-M., (2010) Therapeutic Value of Peptides from Animal Venoms. *In*: MANDER L. and LIU H.-W. *Comprehensive Natural Products II – Chemistry and Biology*. Elsevier Science Ltd, Saint Louis, **5**, 287-303

BAI Z.-T., LIU T., PANG X.-Y., CHAI Z.-F. et JI Y.-H. (2007) Suppression by intrathecal BmK IT2 on rat spontaneous pain behaviors and spinal c-Fos expression induced by formalin. *Brain Res. Bull.*, **73**, 248-253

BANNON A. W., DECKER M. W., CURZON P., BUCKLEY M. J., KIM D. J. B., RADEK R. J. *et al.* (1998) ABT-594 [(R)-5-(2-Azetidinylmethoxy)-2-chloropyridine]: A novel, orally effective antinociceptive agent acting via neuronal nicotinic acetylcholine receptors: II. *In vivo* characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 787-794

BERECKI G., MOTIN L., HAYTHORNTHWAITE A., VINK S., BANSAL P., DRINKWATER R. *et al.* (2010). Analgesic ω -conotoxins CVIE and CVIF selectively and voltage-dependently block recombinant and native calcium channels. *Mol. Pharmacol.*, **77**, 139-148

BINGHAM J.-P., MITSUNAGA E. et BERGERON Z. L. (2010). Drugs from slugs – past, present and future perspectives of ω -conotoxin research. *Chem.-Biol. Interact.*, **183**, 1-18

BLAKE D. W., SCOTT D. A., ANGUS J. A. et WRIGHT C. E. (2005) Synergy between intrathecal ω -conotoxin CVID and dexmedetomidine to attenuate mechanical hypersensitivity in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **506**, 221-227

BOURNE Y., TALLEY T. T., HANSEN S. B., TAYLOR P. et MARCHOT P. (2005) Crystal structure of a Cbtx-AChBP complex reveals essential interactions between snake α -neurotoxins and nicotinic receptors. *EMBO J.*, **24**, 1512-1522

- BOWMAN C. L., GOTTLIEB P. A., SUCHYNA T. M., MURPHY Y. K. et SACHS F. (2007) Mechanosensitive ion channels and the peptide inhibitor GsMTx-4: History, properties, mechanisms and pharmacology. *Toxicon*, **49**, 249-270
- BRIGATTE P., HOFFMANN F. A., BERNARDI M. M., GIORGI R., FERNANDES I., TAKEHARA H. A. *et al.* (2001) Tolerance to the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice is mediated by pharmacodynamic mechanisms, *Toxicon*, **39**, 1399-1410
- BROCCARDO M., USENKO A. B., URANOVA M. G., GUZEVATYKH L. S., KAMENSKY A. A., ANDREEVA L. A. *et al.* (2003) *In vitro* and *in vivo* opioid activity of [DPro⁶]dermorphin, a new dermorphin analogue. *Peptides*, **24**, 419-428
- CALLAGHAN B. et ADAMS D. J. (2010). Analgesic α -conotoxins Vc1.1 and RgIA inhibit N-type calcium channels in sensory neurons of α 9 nicotinic receptor knockout mice. *Channels*, **4**, 51-54
- CAO F., CHEN S. S., YAN X. F., XIAO X.-P., LIU X.-J., YANG S.-B. *et al.* (2009) Evaluation of side effects through selective ablation of the mu opioid receptor expressing descending nociceptive facilitatory neurons in the rostral ventromedial medulla with dermorphin-saporin. *Neurotoxicology*, **30**, 1096-1106
- CHEN B. et JI Y. (2002) Antihyperalgesia effect of BmK AS, a scorpion toxin, in rat by intraplantar injection. *Brain Res.*, **952**, 322-326
- CHEN H.-S., QU F., HE X., LIAO D., KANG S.-M. et LU S.-J. (2010) The anti-nociceptive effect and the possible mechanism of acupoint stimulation caused by chemical irritants in the bee venom pain model. *Brain Res.*, **1355**, 61-69
- CHEN J., FENG X.-H., SHI J. TAN Z.-Y., BAI Z.-T., LIU T. *et al.* (2006) The anti-nociceptive effect of BmK AS, a scorpion active polypeptide, and the possible mechanism on specifically modulating voltage-gated Na⁺ currents in primary afferent neurons. *Peptides*, **27**, 2182-2192
- CHEN J. et LARIVIERE W. R. (2010) The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: a double-edged sword. *Prog. Neurobiol.*, **92**, 151-183
- CHEN J.-Q., ZHANG Y.-Q., DAI J., LUO Z.-M. et LIANG S.-P. (2005) Antinociceptive effects of intrathecally administered huwentoxin-I, a selective N-type calcium channel blocker, in the formalin test in conscious rats. *Toxicon*, **45**, 15-20
- CHEN Z.-X., ZHANG H.-L., GU Z.-L., CHEN B.-W., HAN R., REID P. F. *et al.* (2006) A long-form α -neurotoxin from cobra venom produces potent opioid-independent analgesia. *Acta Pharmacol. Sin.*, **27**, 402-408
- CHENG B.-C., ZHOU X.-P., ZHU Q., GONG S., QIN Z.-H., REID P. F. *et al.* (2009) Cobratoxin inhibits pain-evoked discharge of neurons in thalamic parafascicular nucleus in rats: involvement of cholinergic and serotonergic systems. *Toxicon*, **54**, 224-332
- CHIPPAUX J. P. (2002) *Venins de serpents et envenimations*. IRD Editions, Toulouse, 288p

- CLARK R. J., AKCAN M., KAAS Q., DALY N. L. et CRAIK D. J. (2012) Cyclization of conotoxins to improve their biopharmaceutical properties. *Toxicon*, **59**, 446-455
- CUCCHIARO G., CHAIJALE N. et COMMONS K. G. (2005) The dorsal raphe nucleus as a site of action of the antinociceptive and behavioral effects of the $\alpha 4$ nicotinic receptor agonist epibatidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **313**, 389-394
- CUCCHIARO G., CHAIJALE N. et COMMONS K. G. (2006) The locus coeruleus nucleus as a site of action of the antinociceptive and behavioral effects of the nicotinic receptor agonist, epibatidine. *Neuropharmacology*, **50**, 769-776
- CUMMINS T. H., SHEETS P. L. et WAXMAN S. G. (2007). The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *Pain*, **13**, 243-257
- CURA J. E., BLANZACO D. P., BRISSON C., CURA M. A., CABROL R., LARRATEGUY L. et al. (2002) Phase I and Pharmacokinetics Study of Crotoxin (Cytotoxic PLA₂, NSC-624244) in Patients with Advanced Cancer, *Clin. Cancer Res.*, **8**, 1033-1041
- CURY Y., PICOLO G., GUTIERREZ V. P. et FERREIRA S. H. (2011) Pain and analgesia: the dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide-Biol. Ch.*, **25**, 243-254
- DAI X., CUI S.-G., LI S.-R., CHEN Q. et WANG R. (2007) Melatonin attenuates the development of antinociceptive tolerance to delta-, but not to mu-opioid receptor agonist in mice. *Behav. Brain Res.*, **182**, 21-27
- DALMOLIN G. D., SILVA C. R., RIGO F. K., GOMES G. M., NASCIMENTO CORDEIRO M., RICHARDSON M. et al. (2011) Antinociceptive effect of Brazilian armed spider venom toxin Tx3-3 in animal models of neuropathic pain. *Pain*, **152**, 2224-2232
- DECKER M. W., CURZON P., HOLLADAY M. W., NIKKEL A. L., BITNER R. S., BANNON A. W et al. (1998) The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in antinociception: Effects of ABT-594. *J. Physiol. (Paris)*, **92**, 221-224
- DEVAL E., GASULL X., NOEL J., SALINAS M., BARON A., DIOCHOT S. et al. (2010) Acid-Sensing Ion Channels (ASICs): Pharmacology and implication in pain. *Pharmacol. Ther.*, **128**, 549-558
- DEVAL E., NOEL J., GASULL X., DELAUNAY A., ALLOUI A., FRIEND V. et al. (2011) Acid-Sensing Ion Channels in postoperative pain. *J. Neurosci.*, **31**, 6059-6066
- DEVAL E., NOEL J., LAY N., ALLOUI A., DIOCHOT S., FRIEND V. et al. (2008) ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J.*, **27**, 3047-3055
- DIOCHOT S., SALINAS M., BARON A., ESCOUBAS P. et LAZDUNSKI M. (2007) Peptides inhibitors of acid-sensing ion channels. *Toxicon*, **49**, 271-284
- DONNELLY-ROBERTS D. L., PUTTFARCKEN P. S., KUNTZWEILER T. A., BRIGGS C. A., ANDERSON D. J., CAMPBELL J. E. et al. (1998) ABT-594 [(R)-5-(2-Azetidinylmethoxy)-2-

chloropyridine]: A novel, orally effective analgesic acting *via* neuronal nicotinic acetylcholine receptors: I. *In vitro* characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 777-786

EKBERG J., JAYAMANNE A., VAUGHAN C. W., ASLAN S., THOMAS L., MOULD J. *et al.* (2006). μ O-conotoxin MrVIB selectively blocks $\text{Na}_v1.8$ sensory neuron specific sodium channels and chronic pain behavior without motor deficits. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **103**, 17030-17035

ESCOUBAS P., DE WEILLE J. R., LECOQ A., DIOCHOT S., WALDMANN R., CHAMPIGNY G. *et al.* (2000) Isolation of a Tarantula Toxin Specific for a Class of Proton-gated Na^+ Channels. *J. Biol. Chem.*, **275**, 25116-25121

ESCOUBAS P. et DIOCHOT S. (1999) Les toxines peptidiques dans les venins d'araignées. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, **10**, 235-251

ESCOUBAS P. et KING G. F. (2009) Venomics as a drug discovery platform. *Expert Rev. Proteomic.*, **6**, 221-224

FAURE G., XU H. et SAUL F. A (2011) Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin. *J. Mol. Biol.*, **412**, 176-191

FRYDENVANG K., LASH L. L., NAUR P., POSTILA P. A., PICKERING D. S., SMIYH C. M. *et al.* (2009) Full domain closure of the ligand-binding core of the ionotropic glutamate receptor iGluR5 induced by the high affinity agonist dysiherbaine and the functional antagonist 8,9-Dideoxyneodysiherbaine. *J. Biol. Chem.*, **284**, 14219-14229

GANESH A., GONZALEZ-SULSER A., CHAIJALE N. et CUCCHIARO G. (2008) Electrophysiological effects of systemic and locally infused epibatidine on locus coeruleus neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, **584**, 93-99

GAYNOR J. S. et MUIR W. W. III. (2009) *Handbook of veterinary pain management. 2nd ed.* Mosby elsevier, Saint Louis, 641p

GEBHART G. F. (2004) Descending modulation of pain. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **27**, 729-737

GENDRON L., ESDAILE M. J., MENNICKEN F., PAN H., O'DONNELL D., VINCENT J.-P. *et al.* (2007) Morphine priming in rats with chronic inflammation reveals a dichotomy between antihyperalgesic and antinociceptive properties of deltorphin. *Neuroscience.*, **144**, 263-274

GILLES R. (2006) *Physiologie animale.* De boeck université, Bruxelles, 673p

GRAY A. C., COUPAR I. M. et WHITE P. J. (2006) Comparison of opioid receptor distributions in the rat central nervous system. *Life Sci.*, **79**, 674-685

GRISHIN E. (2012) Spider venom components affecting the function of purinergic receptors. Abstracts Toxins 2012, *Toxicon*, **60**, 230

GUIRIMAND F. et LE BARS D. (1996) Physiologie de la nociception, *Ann. Fr. Anesth.*, **15**, 1048-1079

- GUTIERREZ V. P., KONNO K., CHACUR M., COCCUZO SAMPAIO S., PICOLO G., BRIGATTE P. *et al.* (2008) Crotalpine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **594**, 84-92
- HAMA A. et SAGEN J. (2009). Antinociceptive effects of the marine snail peptides conantokin-G and conotoxin MVIIA alone and in combination in rat models of pain. *Neuropharmacology.*, **56**, 556-563
- HAN T. S., TEICHERT R. W., OLIVERA B. M. et BULAJ G. (2008). *Conus* venoms – a rich source of peptide-based therapeutics. *Curr. Pharm. Des.*, **14**, 2462-2479
- HAWGOOD B. J. (2006). The marine biologist – Bob Endean. *Toxicon*, **48**, 768-779
- HERZIG V., WOOD D. L. A., NEWELL F., CHAUMEIL P.-A., KAAS Q., BINFORD G. J. *et al.* (2011) ArachnoServer 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures. *Nucleic Acids Res.*, **39**, D653-D657
- HSIEH H.-C., KRISHNASWAMY T., KUMAR S. et YU C. (2004) Cloning, overexpression, and characterization of cobrotoxin. *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, **320**, 1374-1381
- JIANG W.-J., LIANG Y.-X., HAN L.-P., QIU P.-X., YUAN J. et ZHAO S.-J. (2008) Purification and characterization of a novel antinociceptive toxin from Cobra venom (*Naja naja atra*). *Toxicon*, **52**, 638-646
- KAAS Q., WESTERMANN J.-C. et CRAIK D. J. (2010). Conopeptides characterization and classifications: an analysis using ConoServer. *Toxicon*, **55**, 1491-1509
- KAAS Q., YU R., JIN A.-H., DUTERTRE S. et CRAIK D. J. (2012). ConoServer : updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database. *Nucleic Acids Res.*, **40**, D325-D330
- KANG S.-Y., ROH D.-H., YOON S.-Y., MOON J.-Y., KIM H.-W., LEE H.-J. *et al.* (2012) Repetitive treatment with diluted bee venom reduces neuropathic pain via potentiation of locus coeruleus noradrenergic neuronal activity and modulation of spinal NR1 phosphorylation in rats. *J. Pain*, **13**, 155-166
- KARCZEWSKI J., SPENCER R. H., GARSKY V. M., LIANG A., LEITL M. D., CATO M. J. *et al.* (2010) Reversal of acid-induced and inflammatory pain by the selective ASIC3 inhibitor, APETx2. *Br. J. Pharmacol.*, **161**, 950-960
- KESINGLAND A. C., GENTRY C. T., PANESAR M. S., BOWES M. A., VERNIER J.-M., CUBE R. *et al.* (2000) Analgesic profile of the nicotinic acetylcholine receptor agonists, (+)-epibatidine and ABT-594 in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, **86**, 113-118
- KING G. F., GENTZ M. C., ESCOUBAS P. et NICHOLSON G. M. (2008) A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon*, **52**, 264-276
- KLIMIS H., ADAMS D. J., CALLAGHAN B., NEVIN S., ALEWOOD P. F., VAUGHAN C. W. *et al.* (2011). A novel mechanism of inhibition of high-voltage activated calcium channels by α -conotoxins contributes to relief of nerve injury-induced neuropathic pain. *Pain*, **152**, 259-266

- KLINT J. K., SENFF S., RUPASINGHE D. B., ER S. Y., HERZIG V., NICHOLSON G. M. *et al.* (2012) Spider-venom peptides that target voltage-gated sodium channels: Pharmacological tools and potential therapeutic leads. *Toxicon*, doi:10.1016/j.toxicon.2012.04.337
- KOH D. C. I., ARMUGAM A. et JEYASEELAN K. (2006) Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 3030-3041
- KOLOSOV A., AURINI L., WILLIAMS E. D., COOKE I. et GOODCHILD C. S. (2011). Intravenous injection of leconotide, an omega conotoxin: synergistic antihyperalgesic effect with morphine in a rat model of bone cancer pain. *Pain Med.*, **12**, 923-941
- KOLOSOV A., GOODCHILD C. S., COOKE I. C. (2010). CNSB004 (leconotide) causes antihyperalgesia without side effects when given intravenously: a comparison with ziconotide in a rat model of diabetic neuropathic pain. *Pain Med.*, **11**, 262-273
- KONNO K., PICOLO G., GUTIERREZ V. P., BRIGATTE P., ZAMBELLI V. O. CAMARGO A. C. M. *et al.* (2008) Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Peptides*, **29**, 1293-1304
- KOSTANTAKAKI M., CHANGEUX J.-P. et TALY A. (2007) Docking of α -cobratoxin suggests a basal conformation of the nicotinic receptor. *Bioch. Bioph. Res. Commun.*, **359**, 413-418
- KUNIYASU A., KAWANO S., HIRAYAMA Y., JI Y.-H., XU K., OHKURA M. *et al.* (1999) A new scorpion toxin (BmK-PL) stimulates Ca^{2+} -release channel activity of the skeletal-muscle ryanodine receptor by an indirect mechanism. *Biochem. J.*, **339**, 343-350
- LABUZ D., CHOCYK A., WEDZONY K., TOTTH G., PRZEWLOCKA B. (2003) Endomorphin-2, deltorphin II and their analogs suppress formalin-induced nociception and c-Fos expression in the rat spinal cord. *Life Sci.*, **73**, 403-412
- LAMPE R. A. (1998) Analgesic peptides from venom of *Grammostola spatulata* and use thereof. Report: *United States Patent n°5.776.896*
- LAMPE R. A. et SACHS F. (1999) Antiarrhythmic peptide from venom of spider *Grammostola spatulata*. Report: *United States Patent n°5.968.838*
- LE BARS D. et WILLER J.-C. (2004) Physiologie de la douleur. *EMC - Anesthésie-Réanimation*, **1**, 227-266
- LEIPOLD E., MARKGRAF R., MILOSLAVINA A., KIJAS M., SCHIRMMEYER J., IMHOF D. *et al.* (2011). Molecular determinants for the subtype specificity of μ -conotoxin SIIIA targeting neuronal voltage-gated sodium channels. *Neuropharmacology*, **61**, 105-111
- LEWIS R. J. (2011). Discovery and development of the χ -conopeptide class of analgesic peptides. *Toxicon*, **59**, 524-528
- LEWIS R. J., DUTERTRE S., VETTER I. et McDONALD J. C. (2012). Conus venom peptide pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **64**, 259-298

- LI F., FENG J., CHENG Q., ZHU W. et JIN Y. (2007) Delivery of ^{125}I -cobrotoxin after intranasal administration to the brain: A microdialysis study in freely moving rats. *Int. J. Pharm.*, **328**, 161-167
- LI S.-R., WANG T., WANG R., DAI X., CHEN Q. et LI R.-D. (2005) Melatonin enhances antinociceptive effects of δ -, but not μ -opioid agonist in mice. *Brain Res.*, **1043**, 132-138
- LI Y., JIANG H. L., ZHU K. J., LIU J. H. et HAO Y. L. (2005) Preparation, characterization and nasal delivery of α -cobrotoxin-loaded poly(lactide-co-glycolide)/polyanhydride microspheres. *J. Control. Release*, **108**, 10-20
- LIANG S.-P., CHEN X.-D., SHU Q., ZHANG Y. et PENG K. (2000) The presynaptic activity of huwentoxin-I, a neurotoxin from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *Toxicon*, **38**, 1237-1246
- LIANG Y., JIANG W., HAN L. et ZHAO S. (2009) Peripheral and spinal antihyperalgesic activity of najanalgesin isolated from *Naja naja atra* in rat experimental model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.*, **460**, 191-195
- LIU T., PANG X.-Y., JIANG F., BAI Z.-T. et JI Y.-H. (2008) Anti-nociceptive effects induced by intrathecal injection of BmK AS, a polypeptide from the venom of Chinese-scorpion *Buthus martensi* Karsch, in rat formalin test. *J. Ethnopharmacol.*, **117**, 332-338
- LIU Y.-F., MA R.-L., WANG S.-L., DUAN Z.-Y., ZHANG J.-H., WU L.-J. et al. (2003) Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensi* Karsch in *Escherichia coli*. *Protein Express. Purif.*, **27**, 253-258
- LIVETT B. G., SANDALL W. D., KEAYS D., DOWN J., GAYLER K. R., SATKUNANATHAN N. et al. (2006). Therapeutic applications of conotoxins that target the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Toxicon*, **48**, 810-829
- MA R., CUI Y., ZHOU Y., BAO Y.-M., YANG W.-Y., LIU Y.-F. et al. (2010) Location of the analgesic domain in Scorpion toxin BmK AGAP by mutagenesis of disulfide bridges. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **394**, 330-334
- MAERTENS C., CUYPERS E., AMININASAB M., JALALI A., VATANPOUR H. et TYTGAT J. (2006) Potent modulation of the voltage-gated sodium channel NaV1.7 by OD1, a Toxin from the scorpion *Odonthobuthus doriae*. *Mol. Pharmacol.*, **70**, 405-414
- MANCIN A. C., SOARES A. M., ANDRILAO-ESCARSO S. H., FACA V. M., GREENE L. J., ZUCCOLOTTO S. et al. (1998) The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. *Toxicon*, **36**, 1927-1937
- MALMBERG A. B., GILBERT H., McCABE R. T. et BASBAUM A. I. (2003). Powerful antinociceptive effects of the cone snail venom-derived subtype-selective NMDA receptor antagonists conantokins G and T. *Pain*, **101**, 109-116

- MARTIN-EAUCLAIRE M.-F., ABBAS N., SAUZE N., MERCIER L., BERGE-LEFRANC J.-L., CONDO J. *et al.* (2010) Involvement of endogenous opioid system in scorpion toxin-induced antinociception in mice. *Neurosci. Lett.*, **482**, 45-50
- MATHUR V. S. (2000). Ziconotide: A new pharmacological class of drug for the management of pain. *Semin. Anesth. Perio. M.*, **19**, 67-75
- MAZZUCA M., HEURTEAUX C., ALLOUI A., DIOCHOT S., BARON A., VOILLEY N. *et al.* (2007) A Tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat. Neurosci.*, **10**, 943-945
- McCURDY C. R. et SCULLY S. S. (2005) Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). *Life Sci.*, **78**, 476-484
- McDONALD J. et LAMBERT G. D. (2010) Opioid mechanisms and opioid drugs. *Anaesth. Intens. care med.*, **12**, 31-35
- MIZOGUCHI H., BAGETTA G., SAKURADA T. et SAKURADA S. (2011) Dermorphin tetrapeptide analogs as potent and long-lasting analgesics with pharmacological profiles distinct from morphine. *Peptides*, **32**, 421-427
- MIZOGUCHI H., WATANABE C., WATANABE H., MORIYAMA K., SATO B., OHWADA K. *et al.* (2007) Involvement of endogenous opioid peptides in the antinociception induced by the novel dermorphin tetrapeptide analog amidino-TAPA. *Eur. J. Pharmacol.*, **560**, 150-159
- MIZOGUCHI H., YUHKI M., WATANABE H., HAYASHI T., SAKURADA C., YONEZAWA A. *et al.* (2004) Differential involvement of μ 1-opioid receptors in dermorphin tetrapeptide analogues-induced antinociception. *Eur. J. Pharmacol.*, **486**, 19-24
- NAPIER I. A., KLIMIS H., RYCROFT B. K., JIN A. H., ALEWOOD P. F., MOTIN L. *et al.* (2012). Intrathecal α -conotoxins Vc1.1, AuIB and MII acting on distinct nicotinic receptor subtypes reverse signs of neuropathic pain. *Neuropharmacology*, **62**, 2202-2207
- NEGRI L., MELCHIORRI P. et LATTANZI R. (2000) Pharmacology of Amphibian Opiate Peptides. *Peptides*, **21**, 1639-1647
- NIELSEN C. K., LEWIS A. J., ALEWOOD A., DRINKWATER R., PALANT E., PATTERSON M. *et al.* (2005). Anti-allodynic efficacy of the χ -conopeptide, Xen2174, in rats with neuropathic pain. *Pain*, **118**, 112-124
- NISHIYAMA T., GYERMEK L., TRUDELL M. L. et HANAOKA K. (2003) Spinally mediated analgesia and receptor binding affinity of epibatidine analogs. *Eur. J. Pharmacol.*, **470**, 27-31
- NOGUEIRA-NETO F., AMORIM R. L., BRIGATTE P., PICOLO G., FERREIRA Jr. W. A., GUTIERREZ V. P. *et al.* (2008) Tha analgesic effect of crotoxin on neuropathic pain is mediated by central muscarinic receptors and 5-lipoxygenase-derived mediators. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **91**, 252-260

- PARK S. P., KIM B. M., KOO J. Y., CHO H., LEE C. H., KIM M. *et al.* (2008) A tarantula spider toxin, GsMTx4, reduces mechanical and neuropathic pain. *Pain*, **137**, 208-217
- PATAPOUTIAN A., TATE S. *et* WOOLF C. J. (2009) Transient receptor potential channels : targetting pain at the source. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **8**, 55-68
- PAKKARI P., PAKKARI I., VONHOF S. *et al.* (1993) Dermorphin analog Tyr-D-Arg-Phe-sarcosine-induced opioid analgesia and respiratory stimulation: the role of mu 1-receptors? *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **266**, 544-550
- PENG K., CHEN X.-D. *et* LIANG S.-P. (2001) The effect of Huwentoxin-I on Ca²⁺ channels in differentiated NG108-15 cells, a patch-clamp study. *Toxicon*, **39**, 491-498
- PICOLO G., CASSOLA A. C. *et* CURY Y. (2003) Activation of peripheral ATP-sensitive K⁺ channels mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Eur. J. Pharmacol.*, **469**, 57-64
- PICOLO G. *et* CURY Y. (2004) Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom, a δ - and κ -opioid receptor agonist. *Life Sci.*, **75**, 559-573
- PICOLO G., GIORGI R., BERNARDI M. M. *et* CURY Y. (1998) The Antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom is mainly due to a supraspinally integrated response. *Toxicon*, **36**, 223-227
- PICOLO G., GIORGI R. *et* CURY Y. (2000) δ -Opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Eur. J. Pharmacol.*, **391**, 55-62
- PLEUVRY B. J. (2005) Opioid mechanisms and opioid drugs. *Anaesth. Int. Care Med.*, **6**, 30-34
- PRIEST B. T., BLUMENTHAL K. M., SMITH J. J., WARREN V. A. *et* SMITH McH. M. (2007) ProTx-I and ProTx-II: Gating modifiers of voltage-gated sodium channels. *Toxicon*, **49**, 194-201
- PU X. C., WONG P. T. H. *et* GOPALAKRISHNAKONE P. (1995) A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon*, **33**, 1425-1431
- QIU C.-H., WYHE L. L.-V., SASAKI M., SAKAI R., SWANSON G. T. *et* GEREAU IV R. W. (2011) Antinociceptive effects of MSVIII-19, a functional antagonist of the GluK1 kainate receptor. *Pain*, **152**, 1052-1060
- RAJENDRA W., ARMUGAM A. *et* JEYASEELAN K. (2004) Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. *Toxicon*, **44**, 1-17
- RAUCK R. L., WALLACE M. S., LEONG M. S., MINEHART M., WEBSTER L. R., CHARAPATA S. G. *et al.* (2006). A randomized, double-blind, placebo-controlled study of intrathecal ziconotide in adults with severe chronic pain. *J. Pain Symptom. Manag.*, **31**, 393-406

RODRIGUEZ DE LA VEGA R. C. et POSSANI L. D. (2005) Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution. *Toxicon*, **46**, 831-844

SAEZ N. J., SENFF S., JENSEN J. E., ER S. Y., HERZIG V., RASH L. *et al.* (2010) Spider-venom peptides as therapeutics. *Toxins*, **2**, 2851-2871

SAMPAIO S. C., HYSLOP S., FONTES M. R. M., PRADO-FRANCESCHI J., ZAMBELLI V. O., MAGRO A. J. *et al.* (2010) Crotoxin : Novel activities for a classic β -neurotoxin. *Toxicon*, **55**, 1045-1060

SATKUNANATHAN N., LIVETT B., GAYLER K., SANDALL D., DOWN J. et KHALIL Z. (2005). Alpha-conotoxin Vc1.1 alleviates neuropathic pain and accelerates functional recovery of injured neurones. *Brain res.*, **1059**, 149-158

SCHMALHOFER W. A., CALHOUN J., BURROWS R., BAILEY T., KOHLER M. G., WEINGLASS A. B. *et al.* (2008) ProTx-II, a selective inhibitor of Na_v1.7 sodium channels, blocks action potential propagation in nociceptors. *Mol. Pharmacol.*, **74**, 1476-1484

SCHMIDTKO A., LÖTSCH J., FREYNHAGEN R. et GEISLINGER G. (2010). Ziconotide for treatment of severe chronic pain. *Lancet*, **375**, 1569-77

SCOTT D. A., WRIGHT C. E. et ANGUS J. A. (2002). Actions of intrathecal ω -conotoxins CVID, GVIA, MVIIA, and morphine in acute and neuropathic pain in rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **451**, 279-286

SERPELL M. (2005) Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesth. Int. Care Med.*, **6**, 7-10

SHIMOYAMA M., SHIMOYAMA N., ZHAO G.-M., SCHILLER P. W. et SZETO H. H. (2001) Antinociceptive and respiratory effects of intrathecal H-Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (DALDA) and [Dmt¹]DALDA. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **297**, 364-371

SOUZA A. H., FERREIRA J., NASCIMENTO CORDEIRO M., BRUNO VIEIRA L., DE CASTRO C. J., TREVISAN G. *et al.* (2008) Analgesic effect of native and recombinant Phal β toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. *Pain*, **140**, 115-126

SOUZA A. H., LIMA M. C., DREWES C. C., DA SILVA J. F., TORRES K. C. L., PEREIRA E. M. R. *et al.* (2011) Antiallodynic effect and side effects of Phal β , a neurotoxin from the spider *Phoneutria nigriventer*: Comparison with ω -conotoxin MVIIA and morphine. *Toxicon*, **58**, 626-633

SRINIVASAN V., PANDI-PERUMAL S. R., SPENCE D. W., MOSCOVITCH A., TRAKHT I., BROWN G. M. *et al.* (2010) Potential use of melatonergic drugs in analgesia: Mechanisms of action. *Brain Res. Bull.*, **81**, 362-371

SUN D., REN Z., ZENG X., YOU Y., PAN W., ZHOU M. *et al.* (2011). Structure-function relationship of conotoxin lt14a, a potential analgesic with low cytotoxicity. *Peptides*, **32**, 300-305

TAN Z.-Y., MAO X., XIAO H., ZHAO Z.-Q. et JI Y.-H. (2001a) *Buthus martensi* Karsch agonist of skeletal-muscle RyR-1, a scorpion active polypeptide: antinociceptive effect on rat peripheral nervous

system and spinal cord, and inhibition of voltage-gated Na⁺ currents in dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.*, **297**, 65-68

TAN Z.-Y., XIAO H., MAO X., WANG C.-Y., ZHAO Z.-Q. et JI Y.-H. (2001b) The inhibitory effects of BmK IT2, a scorpion neurotoxin on rat nociceptive flexion reflex and a possible mechanism for modulating voltage-gated Na⁺ channels. *Neuropharmacology*, **40**, 352-357

WANG C.-Z., ZHANG H., JIANG H., LU W., ZHAO Z.-Q. et CHI C.-W. (2006). A novel conotoxin from *Conus striatus*, μ -SIIIA, selectively blocking rat tetrodotoxin-resistant sodium channels. *Toxicon*, **47**, 122-132

WANG J., WANG L., LI M., JIN Q. et DONG S. (2011) Preliminary analgesic properties of deltorphin-5-methoxytryptamine chimeric opioid peptides. *Peptides*, **32**, 1055-1059

WANG M., GUAN X. et LIANG S. (2007) The cross channel activities of spider neurotoxin huwentoxin-I on rat dorsal root ganglion neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **357**, 579-583

WANG Y., HAO Z., SHAO J., SONG Y., LI C., LI C. *et al.* (2011) The role of Ser54 in the antinociceptive activity of BmK9, a neurotoxin from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon*, **58**, 527-532

WANG Y.-X., GAO D., PETTUS M., PHILLIPS C. et BOWERSOX S. S. (2000a). Interactions of intrathecally administered ziconotide, a selective blocker of neuronal N-type voltage-sensitive calcium channels, with morphine on nociception in rats. *Pain*, **84**, 271-281

WANG Y.-X., PETTUS M., GAO D., PHILLIPS C. et BOWERSOX S. S. (2000b). Effects of intrathecal administration of ziconotide, a selective neuronal N-type calcium channel blocker, on mechanical allodynia and heat hyperalgesia in a rat model of postoperative pain. *Pain*, **84**, 151-158

WATT A. P., HITZEL L., MORRISON D. et LOCKER K. L. (2000) Determination on the *in vitro* metabolism of (+)- and (-)- epibatidine. *J. Chromatogr. A*, **896**, 229-238

WEBSTER L. R., FISHER R., CHARAPATA S. et WALLAC S. (2009). Long-term intrathecal ziconotide for chronic pain: an open-label study. *J. Pain Symptom. Manage.*, **37**, 363-372

WEI L., DONG L., ZHAO T., YOU D., LIU R., YANG H. *et al.* (2011) Analgesic and anti-inflammatory effects of the amphibian neurotoxin, anntoxin. *Biochimie*, **93**, 995-1000

XIAO Y., LUO X., KUANG F., DENG M., WANG M. ZENG X. *et al.* (2008) Synthesis and characterization of huwentoxin-IV, a neurotoxin inhibiting central neuronal sodium channels. *Toxicon*, **51**, 230-239

XIONG Y.-M., LAN Z.-D., WANG M., LIU B., LIU X.-Q., FEI H. *et al.* (1999) Molecular characterization of a new excitatory insect neurotoxin with an analgesic effect on mice from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon*, **37**, 1165-1180

YOU D., HONG J., RONG M., YU H., LIANG S., MA Y. *et al.* (2009) The first gene-encoded amphibian neurotoxin. *J. Biol. Chem.*, **284**, 22079-22086

ZHANG H., HAN R., CHEN Z., CHEN B.-W., GU Z.-L., REID P. F. *et al.* (2006a) Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, **48**, 175-182

ZHANG H., HAN R., CHEN Z., GU Z.-L., REID P. F. RAYMOND L. N. *et al.* (2006b) Analgesics effects of receptin, a chemically modified cobratoxin from Thailand cobra venom, *Neurosci. Bull.*, **22**, 267-273

ZHANG L., ZHANG Y., JIANG D., REID P. F., JIANG X., QIN Z. *et al.* (2012) Alpha-cobratoxin inhibits T-type calcium currents through muscarinic M4 receptor and G₀-protein $\beta\gamma$ subunits-dependent protein kinase A pathway in dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology*, **62**, 1062-1072

ZHANG M.-M., GREEN B. R., CATLIN P., FIEDLER B., AZAM L., CHADWICK A. *et al.* (2007). Structure/function characterization of μ -conotoxin KIIIA, an analgesic, nearly irreversible blocker of mammalian neuronal sodium channels. *J. Biol. Chem.*, **282**, 30699-30706

ZHU Q., WU D., ZHOU X., GONG S., CHENG B.-C., QIN Z.-H. *et al.* (2008) Inhibitory effect of crotoxin on the pain-evoked discharge of neurons in thalamic parafascicular nucleus in rats. *Toxicon*, **51**, 102-111

ZHU S., GAO B., DENG M., YUAN Y., LUO L., PEIGNEUR S. *et al.* (2010) Drosotoxin, a selective inhibitor of tetrodotoxin-resistant sodium channels. *Biochem. Pharmacol.*, **80**, 1296-1302

ZHU S., LUO L., LI P., GAO B., ZHU L. et YUAN Y. (2011) DrTx(1-42), a C-terminally truncated analogue of drosotoxin, is a candidate of analgesic drugs. *Biochem. Pharmacol.*, **81**, 425-431

Sites internet :

AmphibiaWeb : Berkeley, California (dernière mise à jour le 17/06/2012), <http://amphibiaweb.org/>, dernière visite le 16/06/2012

ArachnoServer : Queensland Facility for Advanced Bioinformatics (version 2.1), www.arachnoserver.org/, dernière visite le 16/06/2012

Coneshell : PAGANELLI G. (dernière mise à jour en 2012), www.coneshell.net/, dernière visite le 16/06/2012

ConoServer : CRAIK D. et KAAS Q. (dernière mise à jour 21/03/2012), www.conoserver.org/, dernière visite le 16/06/2012

IUPAC : MOSS G. P. (dernière mise à jour le 05/05/2012), www.chem.qmul.ac.uk/iupac/

The UniProt Consortium (2012) Rorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acid Res*; **40**: D71-D75, www.uniprot.org/, dernière visite le 16/06/2012

The Reptile Database : UETZ P. et HOSEK J. (dernière mise à jour le 24/04/2012), www.reptile-database.org/, dernière visite le 16/06/2012

LES TOXINES D'ORIGINE ANIMALE POSSÉDANT DES PROPRIÉTÉS ANALGÉSIIQUES : MODES D'ACTION ET APPLICATIONS EN MÉDECINE HUMAINE

NAVARRO Florent

Résumé :

La douleur est le principal motif de visite chez le médecin et les médicaments disponibles sur le marché n'agissent pas de manière égale sur tous les patients et sur tous les types de processus douloureux (douleur aiguë, inflammatoire ou d'origine neuropathique). De nombreuses recherches sont effectuées dans le but de découvrir des molécules qui soulageraient plus efficacement ou avec moins d'effets secondaires. Parmi les voies explorées, la vénomique permet la découverte de nouvelles familles de composés analgésiques.

Cette synthèse bibliographique rappelle l'anatomie et la physiologie de la douleur avant de développer les modes d'action variés et les applications des toxines extraites des venins ou des sécrétions de plusieurs groupes d'animaux parmi lesquels les serpents, les grenouilles, les cônes marins, les arachnides avec les araignées et les scorpions, les anémones de mer, les éponges et le venin d'abeille. Plusieurs de ces composés sont à l'origine de nouvelles familles pharmacologiques, comme les ω -conotoxines qui sont les premiers bloqueurs sélectifs des canaux calciques voltage-dépendants. Une partie de ces toxines sont très toxiques pour les animaux mais leur grande sélectivité permet de les utiliser comme des outils pour caractériser la physiologie cellulaire, par exemple la Protoxine II bloque sélectivement le canal sodique voltage-dépendant Nav1.7. Enfin, certaines de ces toxines peuvent être utilisées en médecine en l'état, comme l' ω -conotoxine MVIIA, ou être modifiées pour améliorer certains aspects de leur pharmacologie, comme la cyclisation de Vc1.1 pour améliorer sa durée de vie dans l'organisme.

Mots clés : ANALGESIE / DOULEUR / VENIN / TOXINE DE SERPENT / TOXINE DE GRENOUILLE / CONOTOXINE / TOXINE D'ARAIGNÉE / TOXINE DE SCORPION / TOXINE D'ANÉMONE DE MER / TOXINE D'ÉPONGE / APIPUNCTURE / MÉDECINE HUMAINE

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Pr. Hélène COMBRISON

Assesseur : M. Christophe DESBOIS

TOXINS FROM ANIMAL ORIGINS WITH ANALGESIC PROPERTIES: MECHANISMS OF ACTION AND HUMAN MEDICINE APPLICATIONS

NAVARRO Florent

Summary:

Pain is the main reason for doctor visit and available medications do not equally act on all patients and on all type of painful processes (acute, inflammatory or neuropathic pain). Many studies are conducted to discover new drugs more powerful or with fewer side effects. Among the pathways explored, venomics permits the discovery of new families of analgesic compounds.

This review reminds the anatomy and the physiology of pain before developing various mechanisms of action and the applications of toxins extracted from venoms or secretions of several groups of animals including snakes, frogs, cone snails, arachnids with spiders and scorpions, sea anemones, marine sponges and bee venom. Several molecules are source of new pharmacological families such as ω -conotoxins who are the first voltage-gated calcium channels selective blockers. A part of these toxins are very toxic for animals but their high selectivity permits using them as tools to characterize cell physiology, for instance, Prototoxin II is a selective blocker of the voltage-gated sodium channel $Na_v1.7$. Finally, some toxins can be used directly in medicine, such as ω -conotoxin MVIIA, or modified to improve some pharmacological aspects, such as Vc1.1 cyclization to enhance its duration in organism.

Keywords: ANALGESIA / PAIN / VENOM / SNAKE TOXIN / FROG TOXIN / CONOTOXIN / SPIDER TOXIN / SCORPION TOXIN / SEA ANEMONE TOXIN / MARINE SPONGE TOXINE / APIPUNCTURE / HUMAN MEDICINE

Jury :

President : Pr.

Director : Pr. Hélène COMBRISSE

Assessor : Mr. Christophe DESBOIS