

2023-2024

Mention Toxicologie Ecotoxicologie

Spécialité Toxicologie Humaine et Environnementale

Analyse des effets pharmacologiques de venins de scorpions du Moyen-Orient sur le canal TRPV1 humain

Samuel TEITGEN

Sous la direction de :

César Mattei | MCF

Florian Beignon | Post-doctorant



Engagement de non-plagiat

Je, soussigné(e),.....

déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Nom-Prénom :



Analyse des effets pharmacologiques de venins de scorpions du Moyen-Orient sur le canal TRPV1 humain

TEITGEN Samuel

Résumé

*Le canal TRPV1 est un récepteur polymodal impliqué dans la perception de la chaleur nociceptive et dans la douleur inflammatoire. Il est sensible à la température ($>42^{\circ}\text{C}$), au pH($<5,5$) et activé par la capsaïcine, le composé irritant du piment. Il est également la cible de toxines présentes dans des venins, pour favoriser des douleurs intenses à une proie ou à un prédateur. Il est exprimé principalement dans les nocicepteurs (type C) et on le considère aujourd’hui comme une cible thérapeutique de la douleur. Des travaux récents ont identifié des variants pathologiques de TRPV1 chez l’homme, ayant pour conséquences une abrogation de la sensation de chaleur et de douleur associée ou une dysrégulation de la température interne menant à des pathologies de type hyperthermie maligne ou coup de chaleur d’exercice (CCE). Des données générées au laboratoire ont montré qu’il existe un variant de TRPV1 humain (mitoTRPV1) présentant une séquence d’adressage mitochondriale en N-terminal. Une fois activé, ce variant assure la sortie de Ca^{2+} de la mitochondrie parallèlement à une limitation de sa température, sans altérer la production d’ATP. L’objectif de ce travail est d’identifier de nouveaux agonistes de TRPV1 pour favoriser une réduction de la température mitochondriale. Nous avons, pour ce faire, testé les venins de deux scorpions originaires du Moyen-Orient, *Hottentotta judaicus* (Hj) et *Leiurus abdullahbayrami* (La). Nous faisons l’hypothèse que (i) les venins de scorpions induisent de fortes douleurs (comportant des agonistes putatifs de TRPV1) et (ii) que ces venins sont riches en peptides courts, faciles à synthétiser et à coupler à un cargo pour adressage mitochondrial. Nous avons testé ces deux venins sur des cellules HEK293 surexprimant le canal TRPV1 humain, en mesurant les variations de Ca^{2+} . Le venin de Hj induit une augmentation dose-dépendante du Ca^{2+} , suggérant qu’il possède au moins une toxine agoniste du canal. Nous envisageons par la suite d’isoler et de séquencer cette toxine. À terme, ce type de ligands pourrait permettre de réduire les risques d’hyperthermie.*

Mots-clefs : TRPV1, mitochondrie, venins de scorpions, calcium, agonistes

Abstract

*The TRPV1 channel is a polymodal receptor involved in nociceptive heat and inflammatory pain. It is sensitive to temperature ($>42^{\circ}\text{C}$), pH (<5.5) and activated by capsaicin, the irritant ingredient in chilli peppers. It is also the target of toxins present in venoms, promoting intense pain to a prey or a predator. It is expressed mainly in nociceptors (type C) and is now considered a therapeutic target for pain. Recent work has identified pathological variants of human TRPV1, resulting in abrogation of the sensation of heat and associated pain, or dysregulation of internal temperature, leading to pathologies such as malignant hyperthermia or exertional heat stroke (EHC). Data generated in the lab have shown that there is a mitochondrial variant of human TRPV1 (mitoTRPV1), flanked by a mitochondrial targeting sequence. Once activated – it ensures the exit of Ca^{2+} from the mitochondria in parallel with mitochondrial cooling, without altering ATP production. The aim of this work is to identify new TRPV1 agonists to promote a reduction in mitochondrial temperature. To this end, we tested the venoms of two scorpions native to the Middle East, *Hottentotta judaicus* (Ht) and *Leiurus abdullahbayrami* (La). We hypothesise that (i) scorpion venoms*



1/20

induce strong pain (including putative TRPV1 agonists) and (ii) these venoms are rich in short peptides that are easy to synthesise and to couple to a cargo for mitochondrial addressing. We tested these two venoms on HEK293 cells overexpressing the human TRPV1 channel, by measuring Ca^{2+} variations. Ht venom induced a dose-dependent increase in Ca^{2+} , suggesting that it possesses at least one TRPV1 agonist. We plan to isolate and sequence this toxin. Ultimately, this type of ligand could be used to reduce the risk of hyperthermia.

Keywords: TRPV1, mitochondria, scorpion venoms, calcium, agonists

Abréviations

CAP	Capsaïcine
CPZ	Capsazépine
<i>H.j</i>	<i>Hottentotta judaicus</i>
<i>L.a</i>	<i>Leiurus abullahbaydamy</i>
RTX	Résinifératoxine
SNC	Système nerveux central
TRP	Transient Receptor Potential
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1
mitoTRPV1	TRPV1 mitochondrial

Introduction

Les canaux TRP (Transient Receptor Potential) sont une superfamille de canaux ioniques cationiques. Certains d'entre eux sont exprimés dans des neurones thermosensibles et/ou associés à des voies de la douleur [1]. En particulier, TRPV1 est exprimé principalement dans les neurones sensoriels périphériques, jouant un rôle de transducteur de douleurs aiguë et inflammatoire. Au site d'une inflammation, son expression augmente dans les ganglions spinaux associés à la transmission du signal de douleur, ce qui en fait un marqueur d'hypersensibilité après une blessure ou une inflammation. De plus, on retrouve le canal TRPV1 dans la substance grise péréiaqueducale du système nerveux central (SNC), où il permettrait de réguler positivement la voie descendante d'inhibition de la douleur, ce qui laisse penser que son rôle dans la signalisation de la douleur est lié à un mode d'action multiple, impliquant le système nerveux périphérique et central [2]. Le canal TRPV1 possède une structure homo-tétramérique, avec chaque sous-unité de

838 acides aminés, constituée de six segments transmembranaires (S1 à S6), et six domaines *Akyrin Repeat* sur le segment N-terminal intracellulaire, et un domaine C-terminal également cytoplasmique (Fig. 1). Les segments S1 à S4 forment un domaine *Voltage-Sensor Like*, on retrouve un *linker* entre les segments S4 et S5, et les segments S5 et S6 bordent le pore du canal. TRPV1 est un canal cationique non sélectif, qui laisse passer préférentiellement le Ca^{2+} . Le filtre sélectif des ions est situé au niveau des résidus 643 à 646, dans la partie supérieure du pore. TRPV1 contient plusieurs sites de liaison spécifiques, en particulier une poche de liaison aux vanilloïdes (*Vanilloid Binding Pocket*) située dans la partie transmembranaire du canal, entre le S3 et le linker S4-S5 d'une sous-unité, et impliquant également des interactions avec le pore des sous-unités adjacentes (S5 et S6) [3]. Les récepteurs TRPV1 peuvent être activés par différentes conditions, comme les températures supérieures à 42°C ou un pH extracellulaire inférieur à 5.5, mais aussi par des agonistes endogènes ou exogènes. Ceux-ci comptent principalement des molécules vanilloïdes qui



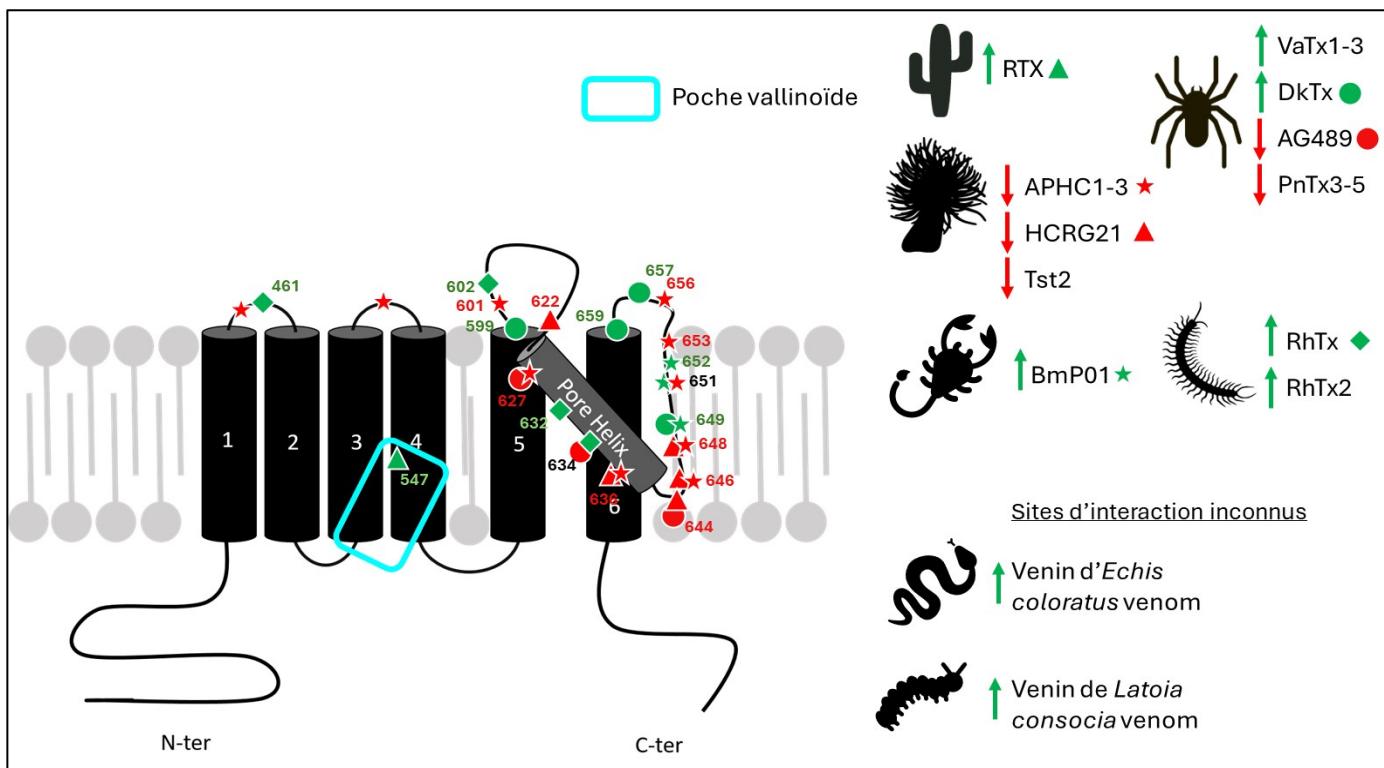


Figure 1 - Schéma d'une sous-unité de TRPV1. Les domaines ankyrines ne sont pas représentés en N-terminal, ni la TRP box en C-terminal. Les différents agonistes (vert) et antagonistes (rouge) retrouvés dans les venins animaux (pictogrammes noirs) et la RTX sont représentés en fonction du site d'interaction avec le canal, s'il est connu. Schéma C. Mattei.

interagissent avec la *Vanilloid Binding Pocket*, notamment la capsaïcine (CAP) et la résinifératoxine (RTX), présentes respectivement dans les piments *Capsicum spp.* et chez *Euphorbia resinifera*, mais aussi des terpénoïdes comme la R-(-)-carvone issu des *Mentha spp.* L'interaction d'une molécule avec la *Vanilloid Binding Pocket* provoque un réarrangement structural pour stabiliser le linker S4-S5, ce qui déplace le segment S6 et ouvre le pore [3,4]. D'autres ligands sont capables d'interagir avec ce récepteur, comme l'acide oléique, le cholestérol, le phosphatidylinositol (PI) et le PI(4-5)P₂. Parmi les molécules activatrices de TRPV1 on trouve également des toxines peptidiques. Par exemple les venins des tarentules *Psalmopoeus cambridgei* et *Ornithoctonus huwena* contiennent des toxines peptidiques (Fig. 1), dites « vanillotoxines », activatrices des canaux TRPV1 [1]. On retrouve également des toxines activatrices de TRPV1 dans le venin de *Cyriopagopus schmidti*, une tarentule retrouvée en Chine et au Vietnam. Son venin contient une *Double Knot Toxin* (DkTx), une toxine contenant 2

motifs *Inhibitory Cystein Knot*. Celle-ci interagit avec la zone supérieure du pore, et provoque un déplacement du domaine Voltage-Sensor-Like et l'ouverture du canal [3]. De nombreuses autres toxines animales s'avèrent être des agonistes ou des antagonistes de TRPV1 (Fig. 1).

La recherche s'intéresse beaucoup à la caractérisation de molécules antagonistes des récepteurs TRPV1 pour leur intérêt putatif en clinique dans la prise en charge de la douleur. En effet, le rôle majeur de TRPV1 dans la genèse et la transmission des signaux de douleur en fait une cible thérapeutique prometteuse. À ce jour, plusieurs molécules sont en phase d'essais cliniques, par exemple les molécules AMG-517 (Amgen), et ABT-102 (Abbot). Ces deux molécules sont des antagonistes compétitifs de TRPV1, qui ciblent le site de liaison de la capsaïcine, et qui passent la barrière hémato-encéphalique. Les études pré-cliniques *in vivo* de l'AMG-517 ont mis en évidence une activité inhibitrice de l'hyperalgésie thermique chez le rat, et les essais de l'ABT-102 montrent une activité de cette



molécule sur différentes types de douleurs chez le rat, comme les douleurs inflammatoires et post-opératoires [2]. Toutefois, les essais cliniques mettent en évidence des effets secondaires non négligeables, comme l'apparition d'hyperthermies pouvant aller, par exemple, jusqu'à 40,2°C dans le cas de l'AMG-517 [5]. Réciproquement, les agonistes de TRPV1 induisent une hypothermie. Des études récentes indiquent que le récepteur TRPV1 pourrait donc être impliqué dans la thermorégulation en raison de la diversité de sa localisation.

En effet, les fonctions décrites de TRPV1 concernent son isoforme membranaire, mais TRPV1 a également été retrouvé dans les compartiments intracellulaires, notamment dans les mitochondries de certains tissus (cellules cardiaques, microgliales et endothéliales) [6-8]. Les mitochondries permettent de transformer l'énergie chimique des nutriments en source d'énergie universelle pour les cellules, l'adénosine triphosphate (ATP), via la respiration cellulaire et divers cycles biochimiques. Cependant, cette production d'ATP s'accompagne d'une production d'une grande quantité de chaleur dans les mitochondries avec un ratio ATP/chaleur de 40/60% [9]. Les mitochondries sont donc le siège de la thermogénèse dans les cellules eucaryotes.

Au laboratoire, un variant mitochondrial de TRPV1 (mitoTRPV1) a été identifié. MitoTRPV1 diffère de l'isoforme à la membrane plasmique (pmTRPV1) grâce à la présence d'une séquence d'adressage mitochondriale de 150 acides aminés en N-terminal. Ce variant résulte d'un épissage alternatif du gène TRPV1, par le décalage du cadre de lecture grâce à un codon d'initiation alternatif suivi de la rétention d'un intron permettant de rattraper le cadre de lecture et de coder normalement le reste de la protéine [10]. Les premiers travaux de caractérisation de mitoTRPV1 au laboratoire ont montré que ce variant permet de générer des flux de Ca²⁺ dans la mitochondrie et de réduire la température mitochondriale sans affecter la production d'ATP

[10]. Ces résultats indiquent que l'activation de mitoTRPV1 pourrait participer à la régulation de la thermogénèse mitochondriale. Par ailleurs, il a été mis en évidence que certaines mutations du canal TRPV1 sont impliquées dans des troubles de la régulation de la température corporelle, notamment les syndromes d'hyperthermie maligne [11,12] et les coups de chaleur à l'exercice [12]. Ces pathologies se caractérisent par une forte augmentation de la thermogénèse, surpassant les capacités d'élimination de la chaleur de l'organisme, pouvant mener à la dysfonction de plusieurs organes et possiblement à la mort. La principale prise en charge repose sur un refroidissement rapide du patient. Des analyses génétiques suggèrent que 4 mutations de TRPV1 sont impliquées dans ces troubles : les mutations G684V et R772C pour le coup de chaleur d'exercice [12] et les mutations T612M et N394del pour l'hyperthermie maligne [11]. Ces mutations modifient la cinétique d'activation de TRPV1 et perturbent le relargage de Ca²⁺ induit par la capsaïcine (perte ou gain *apparent* de fonction).

À partir de ces éléments, nous pensons que la température mitochondriale au-delà de 42°C provoque l'activation de mitoTRPV1, provoquant une fuite du Ca²⁺ de la mitochondrie et une inhibition de son échauffement [10]. Bien que cette hypothèse reste encore à vérifier, ces données suggèrent que mitoTRPV1 joue un rôle dans la régulation du métabolisme mitochondrial et dans la thermogénèse. Dans ce contexte, l'étude du canal mitoTRPV1 et la caractérisation de nouveaux agonistes représentent un intérêt majeur dans la compréhension de la thermorégulation cellulaire et offrent des perspectives nouvelles dans le développement de thérapies contre les troubles de la régulation thermique. Parmi les agonistes potentiels de TRPV1, notre intérêt s'est porté sur les venins de scorpions.

Les envenimations de scorpions sont systématiquement douloureuses. Elles provoquent une douleur aiguë, constante et



durable, même pour les espèces les moins dangereuses [13] et leurs venins contiennent une grande diversité de peptides bioactifs [14]. Il s'agit de neurotoxines actives sur les canaux ioniques de cellules excitables et non-excitables, et provoquant des symptômes qui peuvent être fatals, parmi lesquels on retrouve alternativement hypertension/hypotension, bradycardie/tachycardie et des défaillances cardiaques, ainsi que des œdèmes pulmonaires [15]. La majorité des effets observés est liée à l'action des venins sur les canaux Na^+ , mais ils ciblent également d'autres canaux ioniques, K^+ , Ca^{2+} , Cl^- et même TRP [14]. La toxine BmP01, issue du venin du scorpion doré de Mandchouri, *Mesobuthus martensii* est un exemple de toxine agoniste de TRPV1 [3,16] (Fig. 1). Certaines toxines ne sont retrouvées que chez les scorpions de la famille des buthidés, c'est le cas notamment de la chlorotoxine (CITx), qui cible les canaux Cl^- [15]. Elle présente un potentiel anticancéreux pour le diagnostic et le traitement du glioblastome (phase III clinique). Ainsi, les venins de scorpions, qui montrent une abondance et une diversité remarquable de toxines ciblant les canaux ioniques, suscitent une grande attention de la recherche de peptides à usage thérapeutique.

Hottentotta judaicus est un scorpion buthidé originaire du Moyen-Orient (Fig. 2). Selon une étude, son venin contient des peptides activateurs des canaux Na^+ , qui présentent des propriétés inotropes qui pourraient avoir un intérêt en clinique [17]. Une autre étude montre que ce venin contient deux toxines activatrices du récepteur à la ryanodine RyR1 dans le réticulum sarcoplasmique [18]. Peu d'autres études visant à décrire l'activité de ce venin sont publiées, ce qui fait du venin de *Hottentotta judaicus* un bon candidat pour la caractérisation de nouveaux peptides actifs. De la même façon, *Leiurus abdullahbayrami* est un scorpion buthidé également retrouvé au Moyen-Orient et en Afrique du Nord. Son venin provoque des symptômes cliniques aigus chez l'enfant comme des œdèmes pulmonaires et des dysfonctions cardiaques graves. Une étude vénomique a montré que la majorité des composants de ce venin ont une masse correspondant aux toxines agissant sur les canaux ioniques [19]. L'exploration de nouveaux venins peut permettre de mettre en évidence des peptides aux propriétés intéressantes, tout en alimentant les données disponibles dans la bibliographie. Ainsi, les venins de *Hottentotta judaicus* et *Leiurus abdullahbayrami* suscitent un intérêt notable dans le cadre de notre étude.



Hottentotta judaicus



Leiurus abdullahbayrami

Figure 2 - Images des deux scorpions du Moyen-Orient dont les venins ont été utilisés dans le cadre de cette étude. D'après WikimediaCommons.



L'objectif de ce travail est d'étudier les interactions pharmacologiques entre les venins de *Hottentotta judaicus* et *Leiurus abdullahbayrami* et pmTRPV1. Nous envisageons d'identifier un ligand potentiel du canal pour – à moyen terme – en faire un outil d'activation de mitoTRPV1. Nous utilisons des cellules HEK293 surexprimant pmTRPV1, et mesurons l'activation de celui-ci en réponse à différentes stimulations en imagerie calcique.

Matériels & Méthodes

1- Venins de scorpions

Les venins de *Hottentotta judaicus* et *Leiurus abdullahbayrami* sont fournis par l'équipe du Pr. Ziad FAJLOUN de l'Université Libanaise (Tripoli, Liban). Les venins ont été lyophilisés et stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Le prélèvement des venins a été réalisé par stimulation électrique du telson des animaux.

2- Cultures cellulaires

Toutes les manipulations de cellules se font sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) dans des conditions stériles. Les cellules HEK293 sont cultivées dans du milieu de culture contenant du DMEM (High Glucose ØPyruvate ØGlutamine, PAN Biotech, P04-03500) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtale (SVF) (Eurobio Scientific, CVFSVF0001), 1mM Glutamine (PAN Biotech, P04-80100) et 10% d'antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine, PAN Biotech, P06-07100). Les cellules, conservées à -80°C dans du milieu de culture avec 10% de DMSO, sont transférées dans un tube et centrifugées à 850 rpm pendant 4 min pour éliminer le surnageant avec le DMSO. Le culot est repris dans du milieu de culture et transféré dans des flasques de culture. Les cellules sont incubées à 37°C, dans une atmosphère contrôlée à 5% CO₂.

Lors des repiquages, le milieu est retiré et les cellules sont rincées au PBS 1X. Les cellules sont dissociées du support de culture avec de la

Trypsine-EDTA (PAN Biotech, P10-020100) et une incubation de 5 min à 37°C dans une atmosphère contrôlée à 5% CO₂. La trypsine est ensuite inactivée directement avec du milieu de culture, complémenté en SVF. Les cellules sont ensuite transférées dans de nouvelles flasques contenant du milieu de culture, et sont incubées dans les mêmes conditions.

3- Préparation et transfection des cellules

La transfection est réalisée à l'aide du réactif Avalanche®-Everyday Transfection Reagent (EZ Biosystems LLC, EZT-EVDY-1) qui contient un mélange des polymères de lipides cationiques formant des complexes (lipopolyplexes) avec les acides nucléiques chargés négativement, facilitant le passage de ceux-ci à travers les membranes plasmiques.

Pour cela, les cellules sont transférées dans une plaque 6 trous à 500 000 cellules par trou 24h avant la transfection. Le lendemain, lorsque les cellules sont à environ 70% de confluence, le mélange de transfection préparé dans du milieu de culture sans SVF avec 2µl de réactif Avalanche®-Everyday Transfection Reagent et 2µg du plasmide pcDNA5FRT TRPV1pm (ou pcDNA5FRT vide) est ajouté dans chaque trou. Les cellules sont ensuite placées en incubation à 37°C pendant 24h. Les plasmides sont fournis par Florian Beignon et produit comme décrit précédemment [10]. 24h après la transfection, les cellules transfectées en plaques 6 trous sont transférées dans une plaque 96 trous à fond noir préalablement traitée à la fibronectine à 8µg/mL dans une solution de PBS pendant 10 minutes puis mise à sécher sous le PSM. Les cellules sont à nouveau placées en incubation pendant 24h, puis analysées en imagerie calcique dans les différentes conditions.

4- Traitement des cellules et imagerie calcique

L'imagerie calcique est réalisée avec du Fura-2 (Life Science™ Fura-2 AM 1201), une sonde calcique ratiométrique. Sous sa forme libre, elle



est excitée par une longueur d'onde de 380nm et émet à 510nm. Lorsqu'elle se lie au Ca^{2+} , la longueur d'onde d'excitation se déplace à 340nm [20]. En mesurant le ratio de fluorescence émise lors de l'excitation à 340nm par rapport à celle émise après l'excitation à 380nm, nous pouvons déterminer la proportion de sonde liée par rapport à la sonde libre. Lors de la lecture à la FlexStation 3 (Multi-Mode Microplate Reader - Molecular Devices), les cellules sont excitées à 340nm (λ_1) et la fluorescence est mesurée à 510nm, puis elles sont excitées à 380nm (λ_2) et la fluorescence est à nouveau mesurée. Les résultats sont donnés en ratio de fluorescence λ_1/λ_2 . Plus ce ratio est élevé, plus la sonde est liée à du Ca^{2+} , plus la quantité de Ca^{2+} intracellulaire est élevée.

Pour cela, le milieu de culture est retiré de la plaque 96 puits, et les cellules sont rincées avec du tampon calcium, constitué de HBSS 1X, CaCl_2 à 2,5mM, du MgCl_2 à 1mM, et du HEPES à 10mM. Les cellules sont ensuite incubées avec une solution contenant du tampon calcium, du Fura-2 à 4 μM , et de l'acide pluronique F-127 à 0,02% pendant 1h à température ambiante dans le noir. Après incubation, les cellules sont rincées à nouveau avec du tampon calcium.

L'exposition des cellules aux différents agents se fait directement au sein du lecteur de plaque FlexStation 3. Les réactifs sont repris dans le tampon calcium. Les venins lyophilisés sont reconstitués dans ce même tampon à des concentrations allant de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à 10mg/mL. Lors de l'injection, 15 μL sont prélevés de la plaque d'injection et sont ajoutés à 135 μL dans la plaque de cellules. Les concentrations effectives sont donc de 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 1mg/mL.

5- Analyse des données

Les données d'imagerie calcique sont exportées et triées sur Microsoft Excel, puis analysées avec le logiciel Prism 8 GraphPad. Lors des analyses statistiques, chaque réplica est utilisé pour modéliser une courbe de ratio λ_1/λ_2 par rapport

au temps qui est rapportée à la ligne de base, et l'aire sous la courbe est calculée par rapport à celle-ci. Cette ligne de base est estimée grâce à la moyenne de toutes les mesures avant injection. Chaque condition est testée sur 6 à 12 réplicas. Les différences entre les aires sous les courbes sont analysées avec un test de Student (Two-Tailed Unpaired t-test). Les significativités sont symbolisées comme décrit sous les figures.

Résultats

1. Validation du protocole expérimental

Dans un premier temps, afin de valider l'efficacité de la transfection de TRPV1 dans les HEK293, les cellules sont exposées à des agonistes connus de TRPV1, la CAP et la RTX. Comme attendu, la stimulation des cellules contrôles avec ces molécules ne provoque pas de réponse, contrairement aux cellules surexprimant TRPV1 qui montrent une augmentation significative du ratio F_{340}/F_{380} traduisant une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, avec une cinétique rapide faisant suite à l'injection des agonistes (Fig. 2ab).

Le Triton X-100 et la thapsigargin ont également été utilisées dans le but de valider l'intégration de la sonde Fura-2 et servir de contrôle positif de réponse calcique. La thapsigargin est un inhibiteur des pompes Ca^{2+} ATPase du réticulum endoplasmique (RE). Son action empêche la réabsorption du Ca^{2+} par le RE ce qui provoque son accumulation dans le cytoplasme [21]. Les cellules contrôles et surexprimant TRPV1 montrent une augmentation du ratio F_{340}/F_{380} avec une cinétique lente lors de l'injection de thapsigargin (Fig. 2c), ce qui correspond à l'accumulation de Ca^{2+} intracellulaire attendue. Le Triton X-100 est un détergent qui dégrade les membranes et provoque la mise en contact de la sonde Fura-2 présente dans le milieu intracellulaire et le Ca^{2+} présent dans le milieu extracellulaire. L'injection du Triton X-100 induit donc une forte augmentation du ratio F_{340}/F_{380} et permet de valider l'intégration de la sonde (Fig. 2d)



Ces données permettent d'assurer que les cellules surexpriment TRPV1 après transfection, et que la sonde Fura-2 est bien intégré dans le cytoplasme. Ces injections « contrôles » sont d'ailleurs réalisées pour chaque plaque pour contrôler ces paramètres à chaque fois,

2. Effets pharmacologiques du venin de *Leiurus abdullahbayrami*

Pour étudier d'éventuels effets agonistes, le venin de *L. abdullahbayrami* a été testé sur les cellules contrôle à des concentrations de 1 et 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, et une gamme de concentrations allant de 0,01 à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a été testée sur les cellules surexprimant TRPV1. Les résultats montrent que

l'injection de venin de *L. abdullahbayrami* provoque une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire significative chez les cellules contrôles et surexprimant TRPV1, avec une cinétique rapide (Fig. 3). On observe en effet une hausse du ratio F_{340}/F_{380} directement après l'injection du venin (Fig. 3ab), et il n'y a pas de différence entre les cellules contrôles et les cellules surexprimant TRPV1. L'augmentation de l'aire sous la courbe n'est pas significative pour l'injection de venin à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mais l'est pour la dose de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De façon générale, l'augmentation des concentrations testées semble provoquer une plus forte hausse de l'AUC (Annexe 1). Les données obtenues jusqu'à présent ne permettent pas d'établir une relation dose-réponse fiable, mais la modélisation laisse

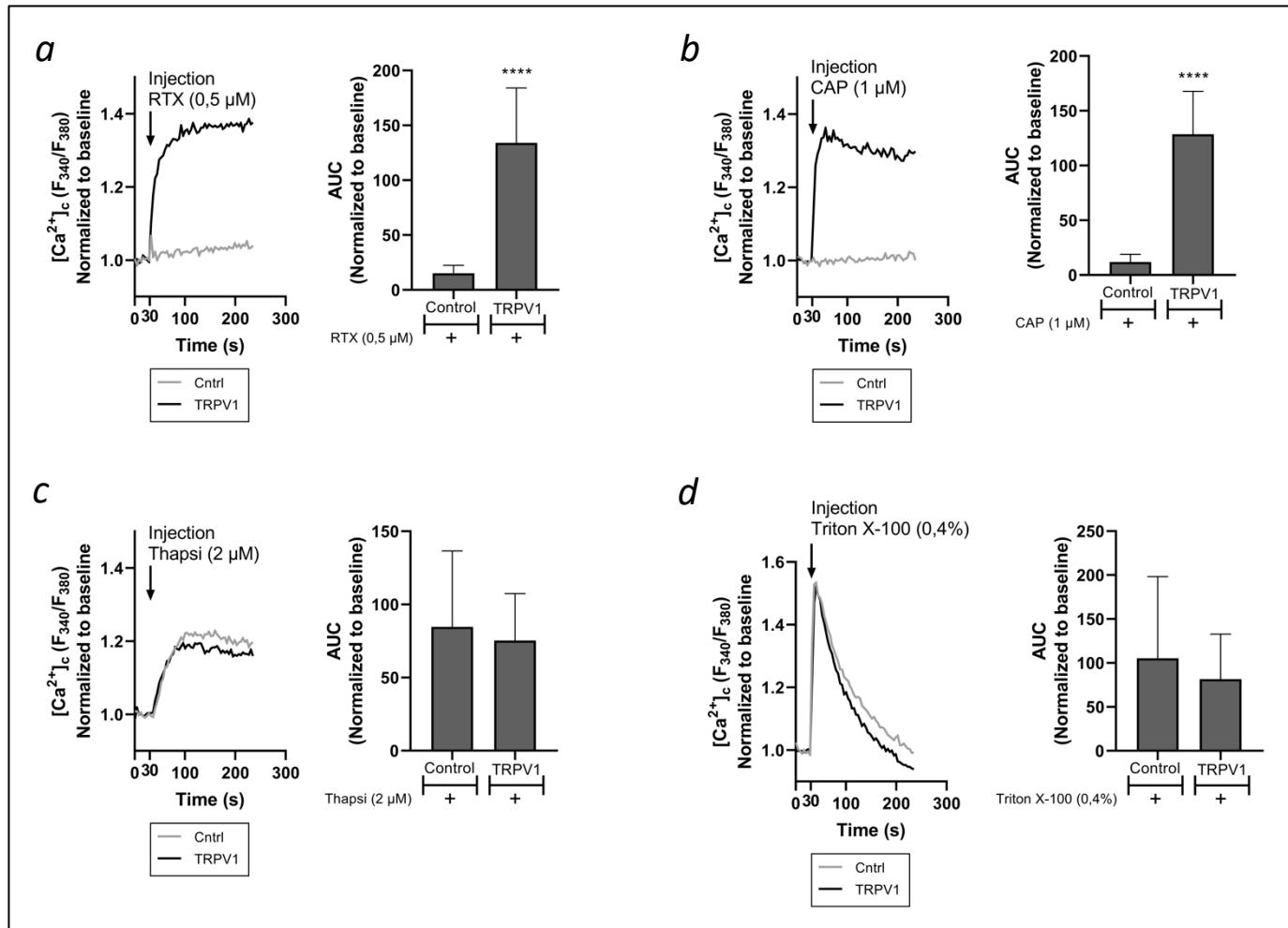


Figure 3 - Validation expérimentale du modèle cellulaire. Le niveau de Ca^{2+} intracellulaire est donné par les courbes de fluorescence F_{340}/F_{380} des cellules HEK293 contrôles et surexprimant pmTRPV1 en réponse à l'injection de RTX 0,5 μM (a), de CAP 1 μM (b), de Thapsigargin (Thapsi) 2 μM (c) et de Triton X-100 0,4% (d), et aires sous les courbes (AUC) correspondantes. $N = 12$, test de Student, **** : $p < 0,0001$.



apparaître une tendance d'un effet-dose (Annexe 2). La co-injection du venin avec l'antagoniste spécifique capsazépine (CPZ) diminue significativement l'intensité de l'effet, sans modifier la cinétique des variations de Ca^{2+} intracellulaire (Fig. 4ef).

Nous avons ensuite testé les propriétés antagonistes putatives du venin en exposant les cellules surexprimant TRPV1 à une co-injection de venin de *L. abdullahbayrami* et de RTX. Les résultats montrent une légère modification de la cinétique des variations de Ca^{2+} intracellulaire provoquée par la RTX, sans modification significative de l'AUC (Fig. 4def), ce qui indique

qu'il n'y a pas de changement dans l'intensité de la réponse.

3. Effets pharmacologiques du venin de *Hottentotta judaicus*

Nous avons ensuite testé les effets agonistes du venin de *Hottentotta judaicus* de la même façon, à des concentrations de 1 et 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur les cellules contrôles, et avec une gamme de concentrations allant de 0,01 à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur les cellules surexprimant TRPV1. Ces analyses ne montrent pas d'effet du venin à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur le ratio de fluorescence F_{340}/F_{380} (Fig. 5abc). Toutefois, l'injection de venin à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a provoqué une hausse rapide du ratio F_{340}/F_{380} , et

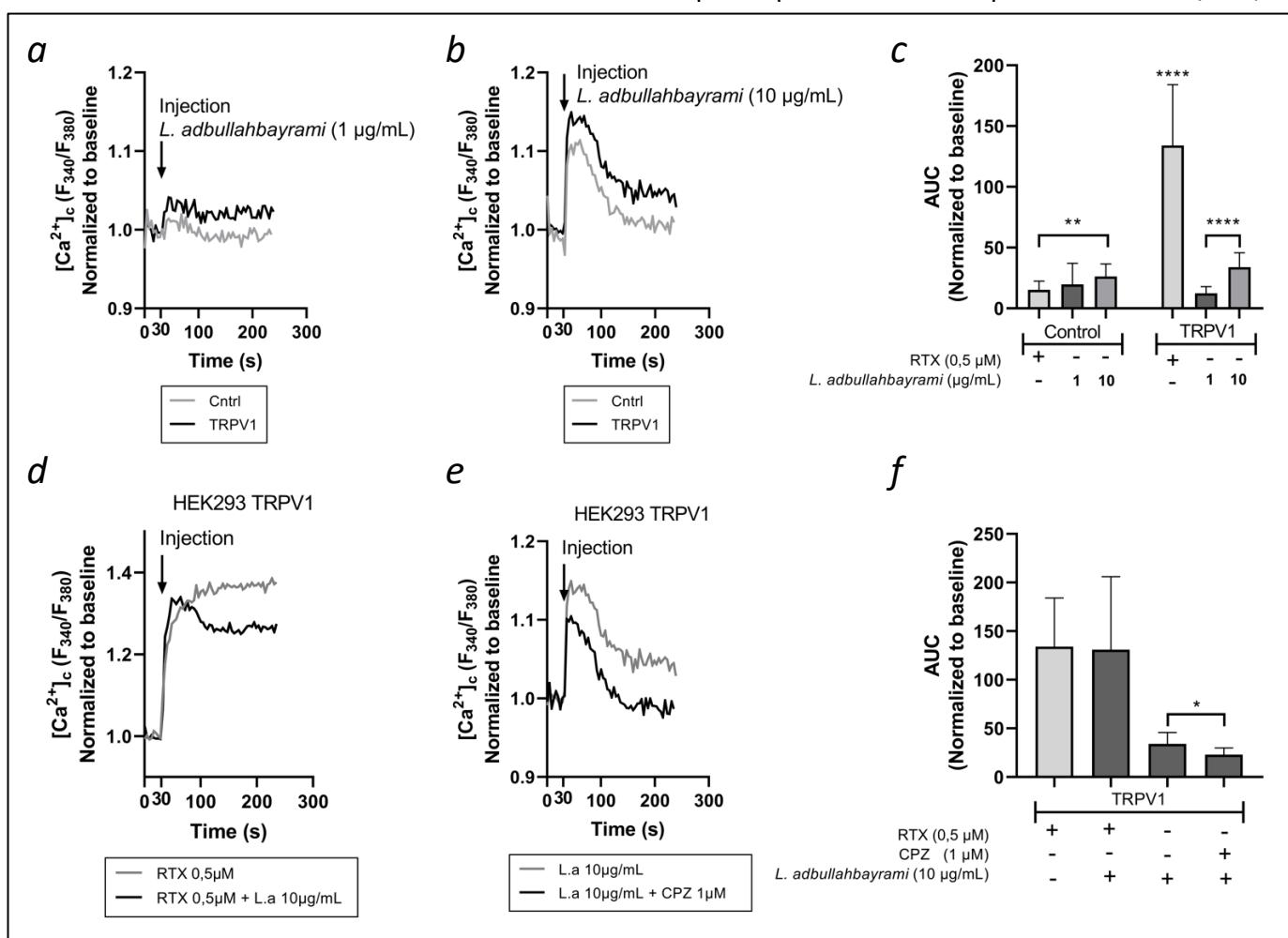


Figure 4 - Effets du venin de *Leirus abdullahbayrami* sur le Ca^{2+} intracellulaire. Niveaux de Ca^{2+} intracellulaire indiqués par les courbes de fluorescence F_{340}/F_{380} des HEK293 contrôles et surexprimant TRPV1 en réponse à l'injection de venin de *L. abdullahbayrami* (*L.a*) à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (a), à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b) et aires sous les courbes (AUC) correspondantes (c). Niveaux de Ca^{2+} intracellulaire indiqués par les courbes de fluorescence F_{340}/F_{380} des HEK293 surexprimant TRPV1 en réponse à la co-injection de venin de *L.a* à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et de RTX (d), de venin et de CPZ (e) et AUC correspondantes (f) $N = 12$, test de Student, * : $p < 0,1$; ** : $p < 0,01$; **** : $p < 0,0001$ par rapport au contrôle correspondant ou à l'histogramme indiqué.



une augmentation significative de l'AUC par rapport au contrôle correspondant (Fig. 5bc). L'ajout de CPZ en co-injection avec le venin inhibe l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (Fig. 5e), et baisse significativement l'AUC (Fig. 5f) ce qui indique un effet spécifique sur TRPV1.

Ensuite, comme précédemment, nous avons étudié les propriétés antagonistes du venin en co-injection avec la RTX sur les cellules surexprimant TRPV1. Les résultats ne montrent aucun effet du venin sur l'action de la RTX (Fig. 5def).

Globalement, ces données sont en faveur de la présence d'une molécule activatrice de TRPV1 dans le venin de *H. judaicus*, et les effets

semblent augmenter à mesure qu'on augmente les concentrations (Annexe 3), ce qui suggère une relation dose-réponse.

4. Relation dose-réponse du venin de *Hottentotta judaicus*

Par la suite nous avons donc essayé d'établir une corrélation entre les concentrations de venin testées et l'intensité de la réponse observée. Pour cela nous avons d'abord testé le venin de *H. judaicus* à de plus fortes concentrations. Les cellules ont été exposées à des concentrations allant de 0,01mg/mL à 1mg/mL. Les résultats montrent une augmentation du ratio de fluorescence F_{340}/F_{380} ainsi qu'une hausse

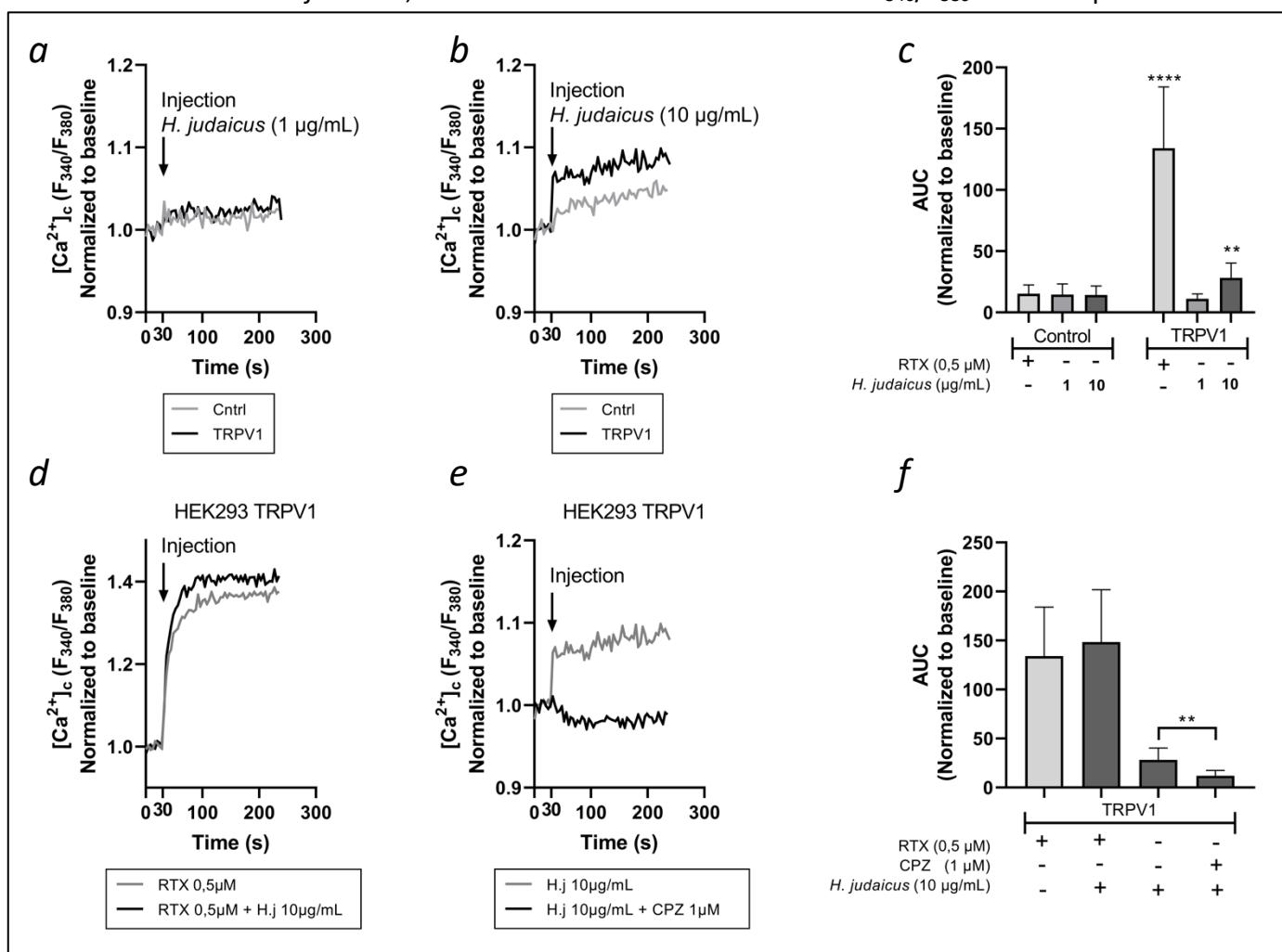


Figure 5 - Effets du venin de *Hottentotta judaicus* sur le Ca^{2+} intracellulaire. Niveaux de Ca^{2+} intracellulaire indiqués par les courbes de fluorescence F_{340}/F_{380} des HEK293 contrôle et surexprimant TRPV1 en réponse à l'injection de venin de *H. judaicus* (*H.j.*) à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (a), à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b) et aires sous les courbes (AUC) correspondantes (c). Niveaux de Niveaux de Ca^{2+} intracellulaire indiqués par les courbes de fluorescence F_{340}/F_{380} des HEK293 surexprimant TRPV1 en réponse à la co-injection de venin de *L.a* à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et de RTX (d), de venin et de CPZ (e) et AUC correspondantes (f) $N = 12$, test de Student, ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,0001$ par rapport au contrôle correspondant ou à l'histogramme indiqué.



significative de l'AUC pour les concentrations de 0,1mg/mL et 0,25mg/mL chez les cellules surexprimant TRPV1 par rapport au contrôle (Fig. 6abe). Toutefois, pour les concentrations supérieures, les cellules contrôles montrent également une augmentation du ratio F_{340}/F_{380} et de l'AUC, se rapprochant des cellules TRPV1 (Fig. 6cde). Il est important de noter que les cellules contrôles exposées à la RTX montrent une AUC qui semble anormalement élevée, significativement supérieure à l'AUC qui correspond aux cellules contrôles exposées au venin de *H. judaicus* aux concentrations de 0,1mg/mL et 0,25mg/mL.

Comme précédemment, nous avons également réalisé des co-injections de venin de *H. judaicus* avec de la CPZ pour confirmer que l'effet observé

est associé à une interaction avec TRPV1. Bien que le Ca^{2+} intracellulaire semble diminuer avec l'ajout de la CPZ (Fig. 7abc), ces variations se jouent à une trop faible échelle pour être significatives. On n'observe ainsi aucune différence significative entre les AUC lors de l'ajout de la CPZ (Fig. 7cef).

Bien que nous ne puissions pas confirmer que nous observons un effet sur TRPV1 pour les fortes concentrations, les effets du venin sur le Ca^{2+} intracellulaire sont légèrement plus importants pour les concentrations plus élevées que pour les plus faibles concentrations testées précédemment. Ainsi, nous avons pu modéliser une courbe dose-réponse avec toutes les doses testées sur les cellules surexprimant TRPV1 (Fig. 8), et déterminer une concentration efficace 50

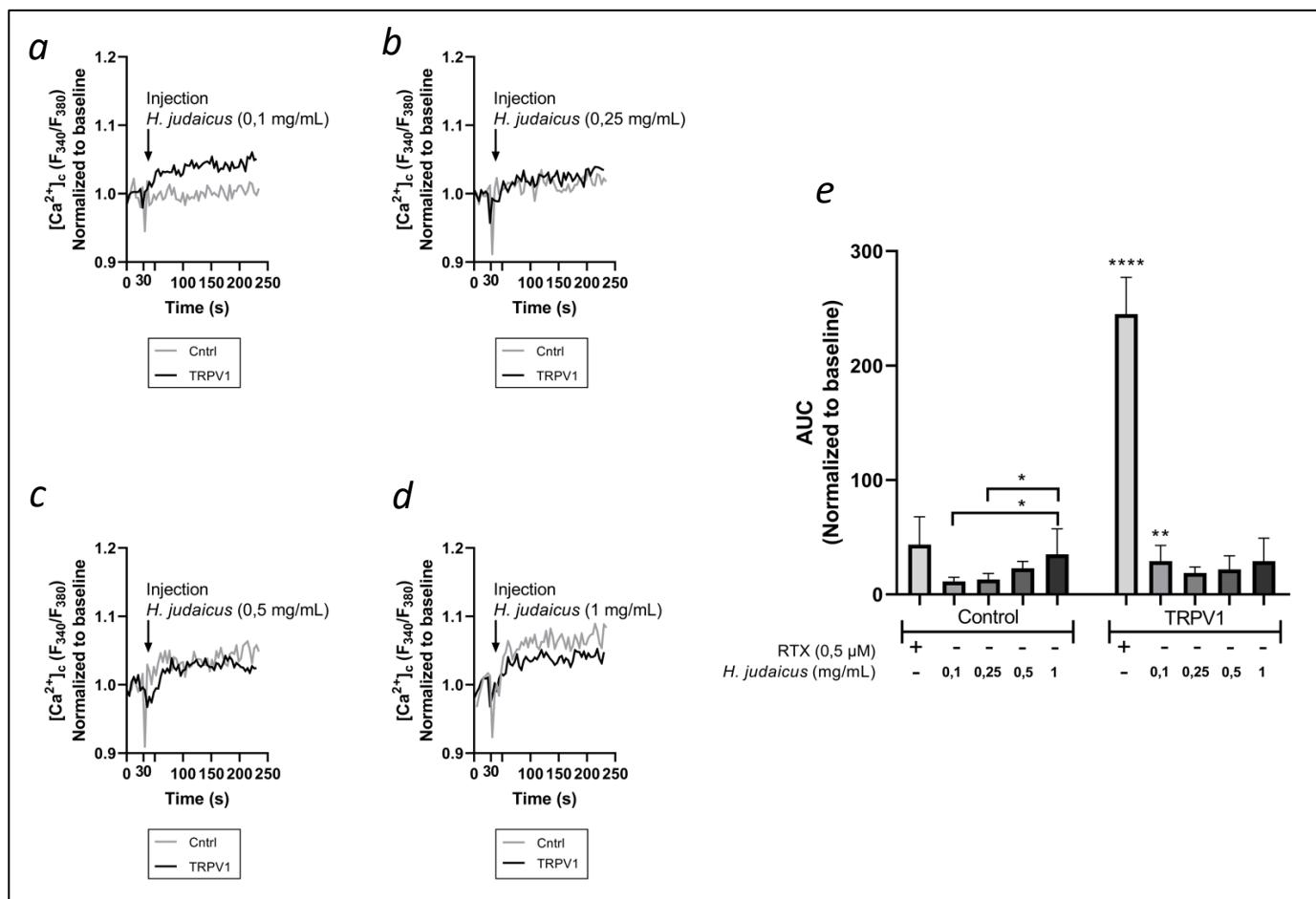


Figure 6 - Effets du venin de *Hottentotta judaicus* sur le Ca^{2+} intracellulaire. Niveaux de Ca^{2+} intracellulaire indiqués par les courbes de fluorescence F_{340}/F_{380} des cellules HEK293 contrôles et surexprimant TRPV1 en réponse à l'injection de venin de *H. judaicus* à 0,1mg/mL (a), à 0,25mg/mL (b), à 0,5mg/mL (c) et à 1mg/mL (d), et aires sous les courbes (AUC) correspondantes (e). N = 6 à 12, test de Student, * : $p < 0,1$; ** : $p < 0,01$; **** : $p < 0,0001$ par rapport au contrôle correspondant ou à l'histogramme indiqué.



(CE₅₀) de 4,107 µg/mL. Les données disponibles présentent néanmoins une forte variabilité et des écart-types très grands, et le coefficient de corrélation R² n'est que de 0,22, ce qui n'est pas suffisant pour tirer des conclusions fiables de la modélisation.

Discussion

Les venins animaux sont une source très importante de molécules pharmacologiquement actives [22]. Les toxines qui les composent sont le fruit de processus évolutifs longs consécutifs aux interactions entre l'animal venimeux et les espèces présentes dans son biotope [23]. Les stratégies d'envenimation d'une proie ou d'un prédateur sont principalement basées sur la

paralysie musculaire, la dysfonction de l'appareil cardio-vasculaire, la nécrose tissulaire ou encore la perturbation de l'hémostase. Cependant, la grande majorité des envenimations est à l'origine d'une douleur plus ou moins importante, ce qui a conduit à imaginer qu'en plus des fonctions précédemment citées, les venins peuvent contenir des toxines spécifiquement activatrices des nocicepteurs pour infliger des douleurs aiguës [13]. Dans ce contexte, nous cherchons de nouveaux ligands du canal TRPV1, qui correspond à un canal cationique exprimé dans les fibres nociceptives et transducteur de douleur. Plusieurs toxines issues de venins animaux ont été caractérisées comme agonistes spécifiques de TRPV1, et d'autres comme antagonistes.

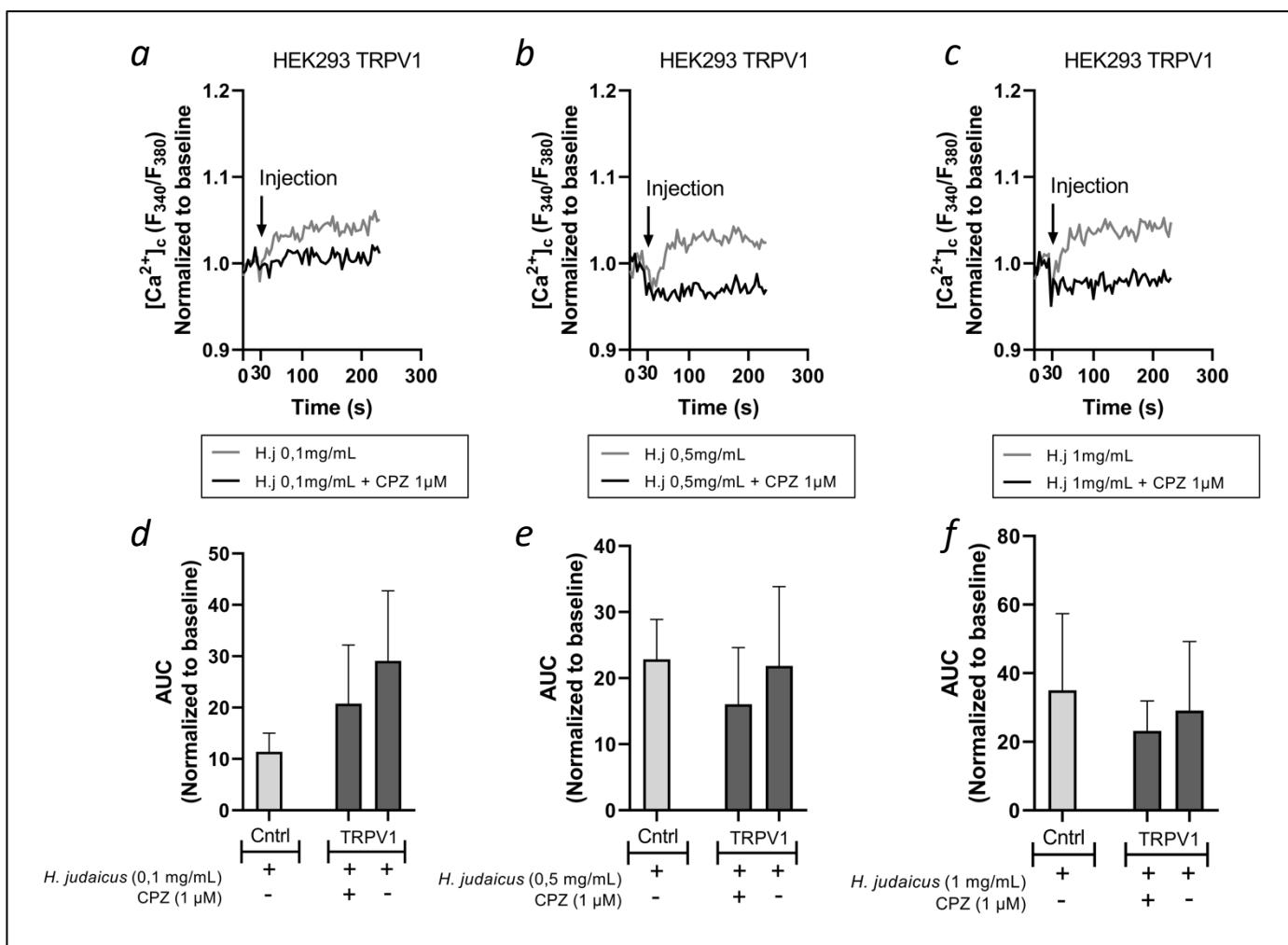


Figure 7 – Effet du venin de *Hottentotta judaicus* sur le Ca²⁺ intracellulaire. Niveaux de Ca²⁺ intracellulaire indiqués par les courbes de fluorescence F₃₄₀/F₃₈₀ des HEK293 surexprimant TRPV1 en réponse à la co-injection de CPZ et de venin de *H.j* à 0,1mg/mL (a), 0,5mg/mL (b), 1mg/mL (c), et AUC correspondantes (d, e, f) N = 12, test de Student, ** : p<0,01.



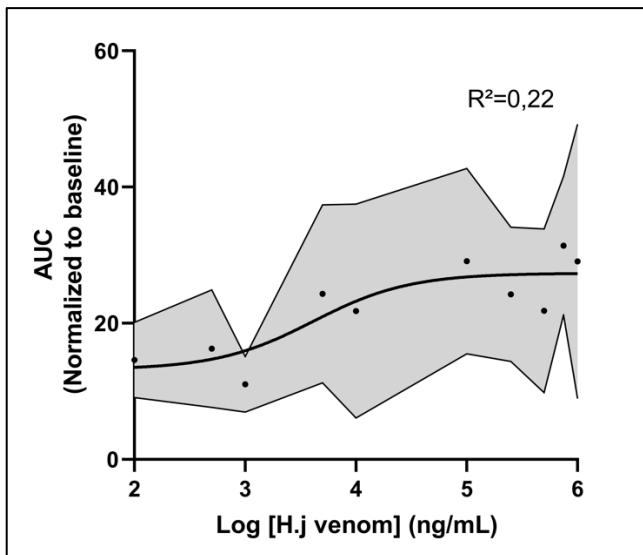


Figure 8 - Régression non linéaire de la réponse calcique (Ca^{2+} intracellulaire indiqué par la fluorescence F_{340}/F_{380}) en fonction de la concentration en venin de *H. judaicus* injectée. La zone grise indique l'écart-type pour chaque point.

Dans ce travail, nous avons cherché de tels agents actifs sur TRPV1 dans les venins de deux scorpions du Moyen-Orient, *Leiurus abdullahbayrami* et *Hottentotta judaicus*. Ces venins sont assez peu caractérisés. Cependant, une piqûre par *L.a* s'avère extrêmement douloureuse [24] et celle de *H.j* est à l'origine d'une douleur moyenne [25].

Nous avons mis en évidence plusieurs propriétés de ces deux venins sur TRPV1 en mesurant le Ca^{2+} intracellulaire dans des cellules HEK293, une approche très courante pour caractériser des ligands d'intérêt [26]. Premièrement, les résultats ont montré une activité du venin de *Leiurus abdullahbayrami* sur le Ca^{2+} intracellulaire des cellules contrôles et surexprimant TRPV1. La cinétique rapide de cette variation suggère que ce venin contient des molécules agissant directement ou indirectement sur d'autres canaux ioniques présents dans les HEK293. Ces cellules expriment en effet un certain nombre de canaux endogènes dont l'activation pourrait provoquer les effets observés, notamment des canaux Ca^{2+} voltage dépendants $\text{Ca}_v1.2$ et $\text{Ca}_v1.3$, mais également des canaux piezo comme Piezo1, ou encore des canaux TRPC1, TRPC3, TRPC4,

TRPC6 et TRPC7 [27]. Les effets du venin de *L. abdullahbayrami* sur le Ca^{2+} semblent être dose-dépendants, aussi la caractérisation de la relation dose-réponse demanderait d'étudier une gamme de concentrations plus large avec un grand nombre d'échantillons pour réduire l'écart-type et obtenir une modélisation robuste. La CPZ a provoqué une réduction de l'intensité de l'effet du venin sur les cellules surexprimant TRPV1, sans modifier la cinétique des variations du Ca^{2+} intracellulaire. Toutefois, les effets du venin ont la même intensité chez le contrôle et chez les cellules surexprimant TRPV1, il ne s'agit donc pas d'un effet spécifique à TRPV1. Pour expliquer l'effet de la CPZ, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en surexprimant TRPV1 il pourrait être impliqué de façon constitutive dans l'homéostasie du Ca^{2+} , et que son inhibition perturbe les capacités des cellules à faire rentrer du Ca^{2+} dans le cytosol. Le venin modifie légèrement la cinétique de réponse calcique provoquée par la RTX, mais ne provoque pas de baisse du niveau de Ca^{2+} intracellulaire, nous ne pouvons ainsi pas conclure sur un effet antagoniste.

Ensuite, nos résultats suggèrent que le venin de *Hottentotta judaicus* active spécifiquement pmTRPV1. Une augmentation significative du Ca^{2+} intracellulaire a été observée lors de l'injection de venin de *H. judaicus* à $10\mu\text{g}/\text{mL}$, et à $0,1\text{mg}/\text{mL}$, chez les cellules surexprimant TRPV1 par rapport aux contrôles. Au-delà de $100\mu\text{g}/\text{mL}$, on observe également une réponse calcique chez les cellules contrôles – un effet non spécifique – et il n'y a plus de différence avec les cellules surexprimant TRPV1. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cet effet. Premièrement, il est possible que le venin contienne une molécule agissant sur une autre cible à de fortes concentrations. Toutefois, on se serait attendu à ce que cet effet s'ajoute à l'effet observé sur les cellules surexprimant TRPV1, ce qui n'est pas le cas. Ensuite, nous pouvons également penser qu'après un certain seuil, le venin a une action cytotoxique sur les cellules menant à une lyse des membranes. Toutefois une précédente étude a



montré qu'il n'avait pas d'activité cytotoxique sur des cellules HTC-116 (Annexe 4). Il est important de noter que le contrôle exposé à la RTX durant cette expérience donne une réponse anormalement élevée, et les résultats obtenus sont susceptibles d'être faussés. La RTX a provoqué sur les cellules contrôles un effet d'un même ordre de grandeur que le venin de *H. judaicus* sur les cellules surexprimant TRPV1. Au vu de la faible intensité de cette réponse, il n'est pas exclu que l'action du venin ne soit qu'un bruit de fond, ou liée à un artéfact d'injection. En effet, dans un système de surexpression comme celui-ci, une activation spécifique aurait provoqué une réponse d'une intensité beaucoup plus élevée pour les très fortes concentrations. Ici la différence entre les réponses aux très faibles et très hautes concentrations n'est pas très marquée. La CPZ a permis de diminuer significativement les effets du venin de *H. judaicus* à 10µg/mL, mais n'a produit aucun changement marquant pour les concentrations supérieures. De plus, la CPZ avait également baissé la réponse non spécifique produite par le venin de *L. abdullahbayrami*, on ne peut donc pas exclure que l'action de la CPZ sur l'effet du venin de *H. judaicus* ne résulte du même phénomène. Enfin, il est probable que le venin possède bien une activité agoniste de TRPV1, mais sans exclure la possibilité qu'il contienne également des antagonistes. La capacité d'un venin animal à posséder des toxines exerçant des effets opposés sur un même système – voire un même récepteur – est déjà décrite dans la littérature : le venin de l'Échide carénée (*Echis carinatus*, Viperidae) incorpore l'échistatine et l'écarine, qui inhibe et active l'agrégation plaquettaire, respectivement [28]. Pour évaluer la pertinence de continuer à étudier ce venin, il faudrait reproduire ces expériences dans diverses conditions pharmacologiques (milieu avec et sans Ca²⁺, modification du pH, de la température externe etc.). Si l'activité agoniste du venin de *H. judaicus* est confirmée, il sera envisageable de le fractionner et des séparer ses différents composants en HPLC. L'isolement des peptides permettra de les tester sans être limité par la

complexité du venin complet. La littérature montre qu'il existe de nombreux venins possédant des agonistes de TRPV1. Celles-ci sont supposées jouer un rôle clé dans les stratégies de prédation, défense ou relations intraspécifiques [29]. À l'inverse, d'autres toxines sont connues pour leur activité spécifique de blocage du TRPV1, mais leurs rôles écologiques et évolutifs restent à clarifier. La diversité des sites allostériques d'action de ces toxines illustre d'une part la fonction polyvalente et polymodale de TRPV1, et d'autre part la diversité et la spécificité des toxines naturelles qui se lient à des domaines particuliers de ce récepteur (Fig. 1). Ces toxines constituent des outils pharmacologiques intéressants qui ouvrent des voies innovantes pour la conception de nouveaux traitements des douleurs aiguës et inflammatoires [30]. Différentes espèces animales ont intégré dans leur stratégie d'envenimation la douleur, en ciblant TRPV1 araignées, scorpion, anémones de mer, serpents, centipèdes, lépidoptères []. Produite par le scorpion *Mesobuthus martensii*, en Extrême-Orient, la neurotoxine BmP01 (Fig. 1) contient un domaine ICK (Inhibitory Cysteine Knot). Elle active assez spécifiquement TRPV1 avec une CE₅₀ de 132 µM. Ce peptide comprend 29 acides aminés réticulés par 3 liaisons disulfures [16], [31]. Fonctionnellement, le venin de ce scorpion a un pH naturel acide (6,5) synergisant par un processus bimodal l'activation des nocicepteurs par la protonation de TRPV1 [16] et peut augmenter l'affinité de la toxine pour TRPV1, ce qui explique sa faible affinité à pH physiologique. Bien qu'il ait également été démontré que la toxine inhibe les canaux Kv, l'acidification du pH diminue cette inhibition. L'injection de BmP01 chez la souris provoque des réponses douloureuses aiguës reflétant son effet spécifique sur le canal TRPV1 périphérique, puisque cette sensation de douleur est absente chez les souris TRPV1^{-/-}. Il est également intéressant de noter que le venin de *Mesobuthus martensii* contient plusieurs toxines analgésiques capables de bloquer les canaux Na⁺ (Nav1.7 ; Nav1.8) impliqués dans la douleur [13]. Pour activer TRPV1, la toxine BmP01 interagit avec les



résidus polaires du canal dans la boucle précédant le domaine transmembranaire S6 (E649 : site d'activation des protons, T651, E652 – Fig. 1) pour ouvrir le pore et favoriser la douleur consécutive à l'envenimation [16]. La caractérisation future de la toxine du venin de *H.j* permettra d'en comparer la séquence avec celle de *Mesobuthus martensii* : ces scorpions occupent des espaces géographiques totalement différents et il est possible qu'ils aient développé des toxines ciblant le même récepteur mais avec des structures divergentes.

Pour l'heure, ce projet a permis de proposer que le venin de *H.j* agit comme agoniste de pmTRPV1. C'est également le cas du venin de la vipère à écailles de Palestine *Echis coloratus* (Viperidae). Il contient des protéines pro-algésiques. Certaines fractions extraites du venin brut induisent des réponses cellulaires liées à l'activation du TRPV1, notamment un influx de Ca^{2+} dans les cellules HEK293 exprimant le TRPV1, ce qui est aboli dans les cellules TRPV1^{-/-} [32]. Le site de liaison de cette fraction peptidique de venin sur TRPV1 pourrait être différent des sites d'interaction comme la RTX ou les toxines d'araignées VaTx/DkTx (Fig. 1), car les mutations affectant les résidus impliqués dans leur liaison avec TRPV1 ne modifient pas l'amplitude du courant cationique induit par la fraction active de ce venin. On peut ajouter que le facteur de croissance nerveuse (NGF) présent naturellement dans le venin d'*Echis coloratus* agit en synergie avec la toxine, activant directement le TRPV1 et produisant une douleur intense lors d'une envenimation.

Parallèlement, le venin de la chenille *Latoia consocia* a récemment été étudié pour son activité activatrice de TRPV1 (Fig. 1). Chez les lépidoptères, la fonction venimeuse est souvent associée aux soies urticantes [33]. L'exposition au venin de cette chenille par injection intraplantaire chez des souris sauvages induit une intense douleur aiguë. Cet effet est associé à une activation directe de TRPV1, puisque les mêmes expériences ont révélé l'abolition de la douleur induite chez les souris TRPV1^{-/-}, et une diminution

de l'intensité de la douleur chez les souris sauvages après un prétraitement avec la CPZ. *In vitro*, une augmentation significative du Ca^{2+} intracellulaire est observée dans des nocicepteurs exposés au venin (100 µg/ml). La molécule responsable de cette activation du TRPV1 reste cependant à identifier [34].

Conclusions et perspectives

Les perspectives ouvertes par notre travail sont nombreuses. En premier lieu, l'identification de la toxine du venin d'*H.j* responsable de l'effet agoniste sur pmTRPV1 est un projet en soi : elle implique de réaliser du fractionnement bio-guidé pour parvenir à connaître la séquence complète de la toxine. L'alignement de ce peptide permettra de le comparer aux autres toxines animales ciblant TRPV1 et de définir son mécanisme d'action putatif sur le récepteur. Par la suite, nous envisageons de nous servir de ce type de molécule comme d'un système pour activer mitoTRPV1 en faisant l'hypothèse que cette isoforme mitochondriale joue un rôle de « thermostat » cellulaire, dont l'activation favorise la limitation de l'échauffement de la mitochondrie. En couplant cette toxine à un système de cargo mitochondrial (type MTS, mitochondrial targeting sequence), nous pourrions activer spécifiquement mitoTRPV1 sans affecter pmTRPV1. Alternativement, la pénétration à travers la membrane plasmique d'un peptide de venin est également possible. La toxine WaTx du scorpion australien *Urodacus manicatus* active le canal TRPA1 en pénétrant à travers la membrane plasmique et accède à un site intracellulaire identique de celui des agonistes végétaux de ce canal (wasabi, allicine). Cette toxine provoque une douleur aiguë mais pas de douleur inflammatoire [35]. Il s'agit d'un exemple assez exceptionnel dans lequel une toxine peptidique pénètre directement dans la cellule et agit sur un site identique à celui qui est ciblé par des molécules végétales.



Remerciements

J'adresse mes remerciements à **César MATTEI** pour la confiance qu'il m'a accordée et son investissement pour mon évolution. Merci de m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce stage à MitoVasc, autour de ce sujet passionnant.

Merci également à **Hélène TRICOIRE LEIGNEL** pour son accompagnement tout au long de l'année, ses conseils et son soutien dans l'élaboration de mes projets futurs.

Je remercie également **Florian BEIGNON**, qui m'a accompagné dans mes manipulations, a pris le temps de répondre à mes questions avec beaucoup de bienveillance, et qui m'a permis de me sentir à l'aise très rapidement dans le laboratoire.

Je remercie aussi toute l'équipe du laboratoire Carme qui s'est montrée accueillante et dont j'ai pu profiter du soutien. Un grand merci notamment à **Louis GOURDIN**, que j'ai trop souvent dérangé pendant son déjeuner, et qui m'a toujours aidé lorsque j'en avais besoin. Merci également à **Linda GRIMAUD** et **Coralyne PROUX**, pour leurs conseils et le temps accordé à nos discussions. Merci aussi à **Flavien BESSAGUET**, qui m'a donné des clés pour concrétiser mon projet professionnel.

Enfin je remercie les autres stagiaires qui ont été présents pour moi, **Maya, Hugo, Gwen, Leila et Julie**. Merci beaucoup pour les bons moments passés, et cette incroyable solidarité, grâce à laquelle j'avance en ayant l'assurance d'être bien entouré.

Références bibliographiques

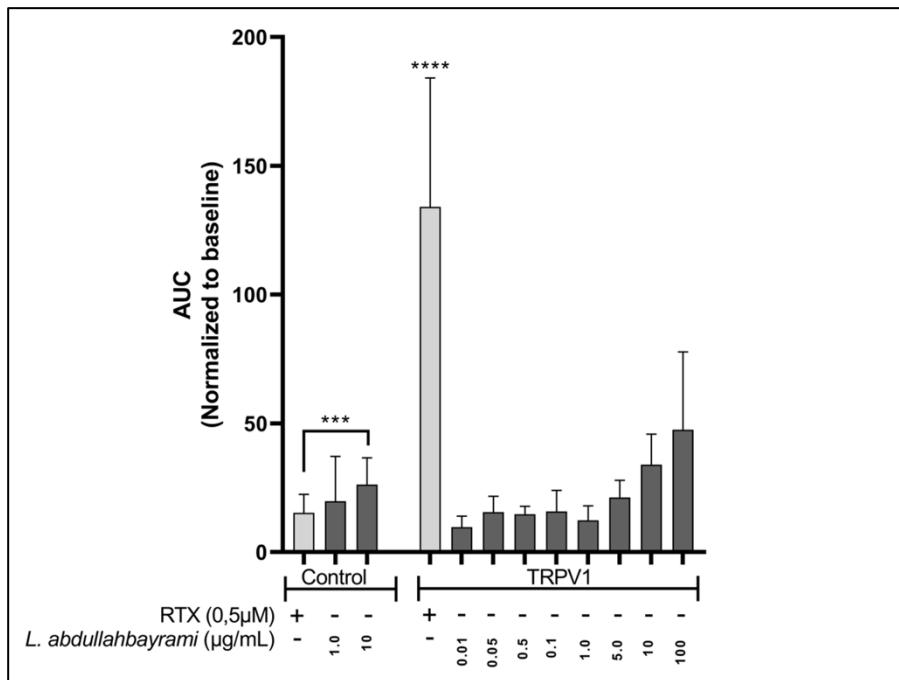
- [1] B. A. Cromer *et al.*, « Painful toxins acting at TRPV1 », *Toxicon*, vol. 51, n° 2, p. 163-173, févr. 2008, doi: 10.1016/j.toxicon.2007.10.012.
- [2] M. J. Gunthorpe *et al.*, « Clinical development of TRPV1 antagonists: targeting a pivotal point in the pain pathway », *Drug Discov. Today*, vol. 14, n° 1-2, p. 56-67, janv. 2009, doi: 10.1016/j.drudis.2008.11.005.
- [3] C. A. Amaya-Rodriguez *et al.*, « A journey from molecule to physiology and in silico tools for drug discovery targeting the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channel », *Front. Pharmacol.*, vol. 14, p. 1251061, janv. 2024, doi: 10.3389/fphar.2023.1251061.
- [4] J. C. R. Goncalves *et al.*, « The monoterpenes (–)-carvone: A novel agonist of TRPV1 channels », *Cytometry A*, 2013.
- [5] Y.-Z. Huang *et al.*, « TRPV1 analgesics disturb core body temperature via a biased allosteric mechanism involving conformations distinct from that for nociception », *Neuron*, p. S0896627324001260, mars 2024, doi: 10.1016/j.neuron.2024.02.016.
- [6] H. Lang *et al.*, « Activation of TRPV1 attenuates high salt-induced cardiac hypertrophy through improvement of mitochondrial function », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 172, n° 23, p. 5548-5558, déc. 2015, doi: 10.1111/bph.12987.
- [7] Z. Luo *et al.*, « TRPV1 activation improves exercise endurance and energy metabolism through PGC-1 α upregulation in mice », *Cell Res.*, vol. 22, n° 3, p. 551-564, mars 2012, doi: 10.1038/cr.2011.205.
- [8] T. Miyake *et al.*, « Activation of mitochondrial transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to microglial migration: Mitochondrial TRPV1 in Microglial Migration », *Glia*, vol. 63, n° 10, p. 1870-1882, oct. 2015, doi: 10.1002/glia.22854.
- [9] A. M. Bertholet *et al.*, « Mitochondrial H⁺ Leak and Thermogenesis », *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 84, n° 1, p. 381-407, févr. 2022, doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034405.
- [10] F. Beignon, « Identification et caractérisation d'une isoforme mitochondriale du canal TRPV1 humain », Université d'Angers, 2022.
- [11] F. Vanden Abeele *et al.*, « TRPV1 variants impair intracellular Ca²⁺ signaling and may confer susceptibility to malignant hyperthermia », *Genet. Med.*, vol. 21, n° 2, p. 441-450, févr. 2019, doi: 10.1038/s41436-018-0066-9.



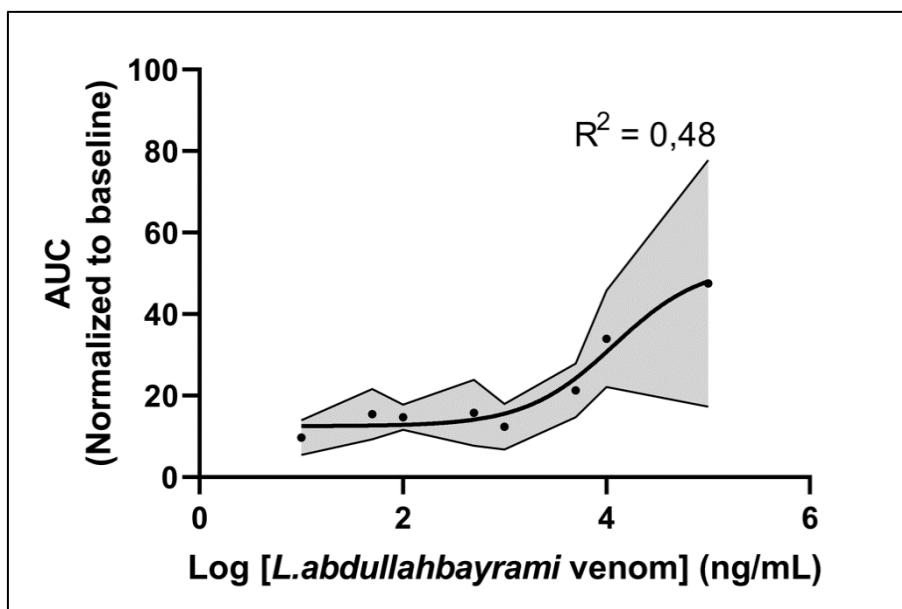
- [12] C. Bosson *et al.*, « Variations in the TRPV1 gene are associated to exertional heat stroke », *J. Sci. Med. Sport*, vol. 23, n° 11, p. 1021-1027, nov. 2020, doi: 10.1016/j.jsams.2020.04.018.
- [13] S. Diochot, « Pain-related toxins in scorpion and spider venoms: a face to face with ion channels », *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.*, vol. 27, p. e20210026, 2021, doi: 10.1590/1678-9199-jvatid-2021-0026.
- [14] Z. Xia *et al.*, « Scorpion venom peptides: Molecular diversity, structural characteristics, and therapeutic use from channelopathies to viral infections and cancers », *Pharmacol. Res.*, vol. 197, p. 106978, nov. 2023, doi: 10.1016/j.phrs.2023.106978.
- [15] E. Ortiz *et al.*, « Scorpion venom components as potential candidates for drug development », *Toxicon*, vol. 93, p. 125-135, janv. 2015, doi: 10.1016/j.toxicon.2014.11.233.
- [16] S. Yang *et al.*, « A bimodal activation mechanism underlies scorpion toxin-induced pain », *Sci. Adv.*, 2017.
- [17] M. A. Tekook *et al.*, « Gene construction, expression and functional testing of an inotropic peptide from the venom of the black scorpion *Hottentotta judaicus* », *Toxicon*, vol. 60, n° 8, p. 1415-1427, déc. 2012, doi: 10.1016/j.toxicon.2012.10.008.
- [18] X. Zhu *et al.*, « Activation of Skeletal Ryanodine Receptors by Two Novel Scorpion Toxins from *Buthotus judaicus* », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 25, p. 26588-26596, juin 2004, doi: 10.1074/jbc.M403284200.
- [19] A. Borges *et al.*, « Venomics of *Leiurus abdullahbayrami*, the most lethal scorpion in the Levant region of the Middle East », *Toxicon*, vol. 237, p. 107548, janv. 2024, doi: 10.1016/j.toxicon.2023.107548.
- [20] M. Tanaka *et al.*, *Biologically Active Peptides*. Elsevier, 2021. doi: 10.1016/C2019-0-02469-7.
- [21] M. Treiman *et al.*, « A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases », *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 19, n° 4, p. 131-135, avr. 1998, doi: 10.1016/S0165-6147(98)01184-5.
- [22] B. Uzair *et al.*, « Scorpion Venom Peptides as a Potential Source for Human Drug Candidates », *Protein Pept. Lett.*, vol. 25, n° 7, p. 702-708, sept. 2018, doi: 10.2174/0929866525666180614114307.
- [23] Schendel *et al.*, « The Diversity of Venom: The Importance of Behavior and Venom System Morphology in Understanding Its Ecology and Evolution », *Toxins*, vol. 11, n° 11, p. 666, nov. 2019, doi: 10.3390/toxins11110666.
- [24] M. Seiter *et al.*, « The case history of a toxic sting of a *Leiurus abdullahbayrami* scorpion in Turkey », *Arachnol. Mitteilungen*, vol. 51, p. 64-66, avr. 2016, doi: 10.5431/aramit5109.
- [25] Basis, *Israeli Journal of Emergency Medicine Vol. 5, No. 4: 60-62.* 2005.
- [26] J. Siemens *et al.*, « Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain », *Nature*, vol. 444, n° 7116, p. 208-212, nov. 2006, doi: 10.1038/nature05285.
- [27] J. Zhang *et al.*, « Endogenous ion channels expressed in human embryonic kidney (HEK-293) cells », *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.*, vol. 474, n° 7, p. 665-680, juill. 2022, doi: 10.1007/s00424-022-02700-z.
- [28] N. N. Nasrabadi *et al.*, « Analysis and Identification of Putative Novel Peptides Purified from Iranian Endemic *Echis Carinatus Sochureki* Snake Venom by MALDI-TOF Mass Spectrometry », *Arch. Razi Inst.*, p. 1503-1527, mai 2023, doi: 10.32592/ARI.2023.78.5.1503.
- [29] I. Nagy *et al.*, « The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology », *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 500, n° 1-3, p. 351-369, oct. 2004, doi: 10.1016/j.ejphar.2004.07.037.
- [30] V. Carnevale *et al.*, « TRPV1: A Target for Rational Drug Design », *Pharmaceuticals*, vol. 9, n° 3, p. 52, août 2016, doi: 10.3390/ph9030052.
- [31] M. Hakim *et al.*, « Scorpion Toxin, BmP01, Induces Pain by Targeting TRPV1 Channel », *Toxins*, vol. 7, n° 9, p. 3671-3687, sept. 2015, doi: 10.3390/toxins7093671.
- [32] M. Geron *et al.*, « Protein toxins of the *Echis coloratus* viper venom directly activate TRPV1 », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1861, n° 3, p. 615-623, mars 2017, doi: 10.1016/j.bbagen.2017.01.004.
- [33] A. Battisti *et al.*, « Urticating Hairs in Arthropods: Their Nature and Medical Significance », *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 56, n° 1, p. 203-220, janv. 2011, doi: 10.1146/annurev-ento-120709-144844.
- [34] Z. Yao *et al.*, « The Latoia consocia Caterpillar Induces Pain by Targeting Nociceptive Ion Channel TRPV1 », *Toxins*, vol. 11, n° 12, p. 695, nov. 2019, doi: 10.3390/toxins11120695.
- [35] J. V. Lin King *et al.*, « A Cell-Penetrating Scorpion Toxin Enables Mode-Specific Modulation of TRPA1 and Pain », *Cell*, vol. 178, n° 6, p. 1362-1374.e16, sept. 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.07.014.



Annexe

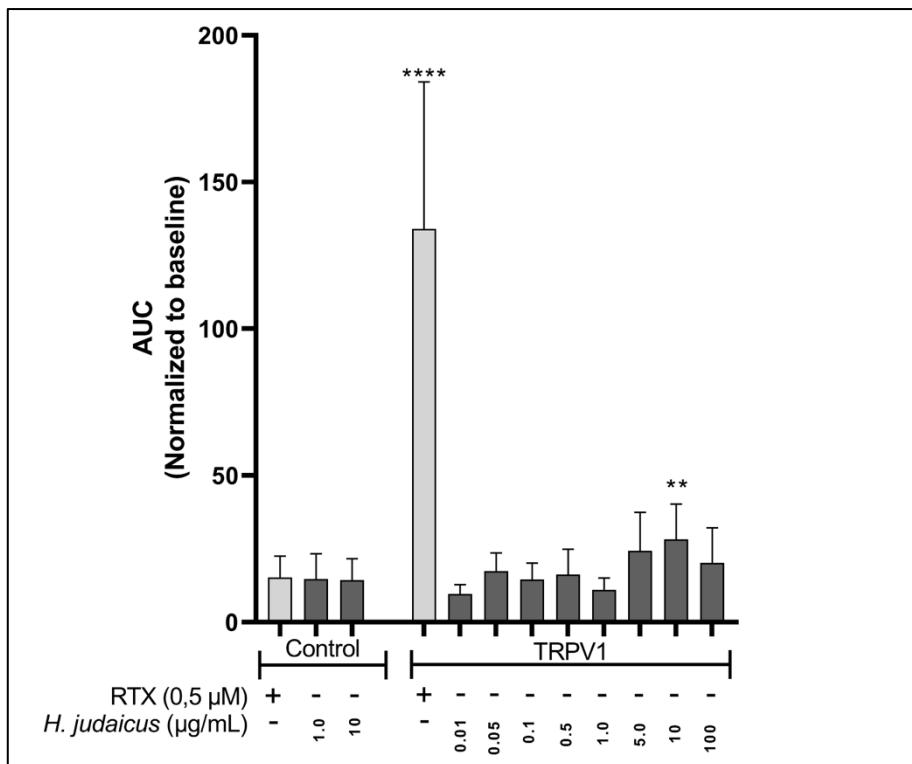


Annexe 1 – Niveaux de Ca^{2+} intracellulaire des HEK293 contrôle et surexprimant TRPV1 en réponse à l'injection d'une gamme de doses de venin de *Leiurus abdullahbayrami*. AUC normalisées des courbes de fluorescence F_{340}/F_{380} .



Annexe 2 - Régression non linéaire de la réponse calcique (Ca^{2+} intracellulaire indiqué par la fluorescence F_{340}/F_{380}) en fonction de la concentration en venin de *L. abdullahbayrami* injectée. La zone grise indique l'écart-type pour chaque point.





Annexe 3 - Niveaux de Ca^{2+} intracellulaire des HEK293 contrôle et surexprimant TRPV1 en réponse à l'injection d'une gamme de doses de venin de *Hottentotta judaicus*. AUC normalisées des courbes de fluorescence F_{340}/F_{380} .

Venom concentration (mg/mL)	Absorbance	Standard deviation (SD)	% of cell viability	Significance based on T-test
0.1	1.33	± 0.125865	92%	NS
0.25	1.068	± 0.014142	74%	NS
0.5	1.1565	± 0.130815	80%	NS
0.75	0.9735	± 0.143543	68%	NS
1	0.99	± 0.203647	68%	NS

Annexe 4 – D'après NASR S., 2023. "Study of the venom of the scorpion *Hottentotta judaicus*: Characterization, antibacterial effect and cytotoxic activities on cancer cell line". Pourcentage de viabilité de cellules HCT-116 après 24h d'incubation avec le venin de *H. judaicus* aux concentrations indiquées. Analyses statistiques : Prism Unpaired T-test. NS = non significatif.

