



HAL
open science

Nouvelle stratégie basée sur les polypeptides comme agents modulateurs des processus tumoraux

Riadh Hmaidi

► **To cite this version:**

Riadh Hmaidi. Nouvelle stratégie basée sur les polypeptides comme agents modulateurs des processus tumoraux. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Picardie Jules Verne; Université de Tunis El Manar, 2022. Français. NNT : 2022AMIE0073 . tel-04098204

HAL Id: tel-04098204

<https://theses.hal.science/tel-04098204v1>

Submitted on 15 May 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat

UPJV

Mention Biologie – Santé

Spécialité Physiopathologie Humaine – Signalisation ionique et cancers

UTM

Spécialité Sciences biologiques

Présentée à l'*Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Riadh HMAIDI

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne et de l'Université de Tunis el Manar

Nouvelle stratégie basée sur les polypeptides comme agents modulateurs des processus tumoraux

Soutenue le 01 Décembre 2022, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. Hamid MORJANI	Pr, Université de Reims	Président
M. Sébastien ROGER	MCF-HDR, Université de Tours	Rapporteur
M. Imed REGAYA	Pr, ISSTE Borj Cédria	Rapporteur
M. Hamid MORJANI	Pr, Université de Reims	Examineur
M ^{me} Olfa MASMOUDI	Pr, Faculté des Sciences de Tunis	Examineur
M ^{me} Balkiss BOUHAOUALA-ZAHAR	Pr, Faculté de Médecine de Tunis	Directeur de thèse
M ^{me} Halima OUADID-AHIDOUCH	Pr, Université de Picardie Jules Verne	Directeur de thèse
M. Mathieu GAUTIER	Pr, Université de Picardie Jules Verne	Co-directeur de thèse

Remerciements

Je voudrais remercier le Docteur Sébastien ROGER et le Professeur Imed REGAYA qui ont fait part de leur intérêt à cette thèse et d'en être rapporteurs. La version finale de ce manuscrit a bénéficié de leur lecture très attentive et de leurs remarques très précieuses. Je tiens aussi à remercier le Professeur Hamid MORJANI d'avoir accepté de juger mon travail et de présider mon jury de thèse. Je remercie également le Professeur Olfa MASMOUDI d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Mes sincères remerciements s'adresse tout particulièrement à mes chers directeurs de thèse, le Professeur Halima OUADID-AHIDOUCHE, le Professeur Balkiss BOUHAOUALA-ZAHAR et le Professeur Mathieu GAUTIER. Vous m'avez accueilli dans vos laboratoires et vous m'avez offert la chance de faire cette thèse. Certes les conditions étaient très particulières pour moi, mais vous étiez toujours présents pour me soutenir par tous les moyens possibles. Je suis tellement reconnaissant à l'égard de tout ce que vous m'avez donné humainement et professionnellement. Je tiens à vous remercier de tout mon cœur pour votre précieux encadrement et vos encouragements tout au long de ce travail, sans vous je n'aurais jamais réussi cette aventure...

Mes remerciements s'adressent ensuite au Professeur Hamid MORJANI et le Docteur, Anas CHERQUI qui ont participé d'une façon active au suivi des mes travaux de recherche où ils n'ont jamais compté leurs soutiens et leurs conseils pendant ces années dans le cadre de mon comité de suivi de thèse. Merci d'avoir cru en l'intérêt de ma thématique de recherche et de nous avoir aidé à suivre les bons volets.

Je remercie également le Professeur Pascal SONNET et le Docteur Viviane ANTONIETTI pour leur collaboration et leur expertise scientifique en matière de biochimie et pour la qualité et la fluidité de communication.

Je tiens aussi à remercier le Docteur Ayoub KSOURI pour sa contribution au volet bio-informatique de ce travail de recherche. Ton aide a été essentielle pour l'aboutissement de mes travaux de recherche.

Mes vifs remerciements s'adressent également à l'ensemble de l'équipe du LPCM, le Docteur Frédéric HAGUE pour m'avoir initié aux techniques de l'imagerie calcique avec une pédagogie

irréprochable, Merci au Docteur Isabelle DHENNIN pour sa bienveillance quotidienne et sa bonne humeur, Merci également au Docteur Lise RODAT-DESPOIX pour son écoute et à ses interventions pertinentes lors de nos réunions de laboratoire. Je remercie également le Docteur Alban GIRAULT pour sa disponibilité à la moindre question. Je remercie tout particulièrement le Professeur Ahmed AHIDOUCHE pour ses qualités humaines et aussi pour nos différentes discussions chaleureuses et très enrichissantes. Je tiens aussi à adresser mes sincères remerciements à Madame Marie Sophie TELLIEZ, Madame Lucille DUBUISSON pour leurs bienveillances, leurs aides et leurs disponibilités tout au long de ces années. Merci également à Madame Nathalie GUINGAND pour sa gentillesse.

Je n'oublierai pas sans doute de remercier l'ensemble de l'équipe du LBVAT, le Docteur Rahma BEN ABDERAZZAK pour son aide et sa collaboration notamment pour la partie biochimique de cette thèse, le Docteur Jed JEBALI et Monsieur Amene Allah ELLAFI pour leurs disponibilités, leurs aides et leurs bienveillances, le Professeur Najet SRAIRI-ABID qui nous a facilité la partie de la purification biochimique du venin en nous empruntant l'appareil de la HPLC et sans oublier Madame Thouraya CHAGOUR pour son aide pour le processus de la filtration en basse pression et la lyophilisation.

La thèse est une longue aventure très particulière mais enrichissante sur tous les niveaux, et c'est par la bonne compagnie des collègues que j'ai pu vivre les plus beaux moments au laboratoire. Mes pensées s'adressent particulièrement aux nouveaux et futurs docteurs, notamment, le PhD Thibaut LEFEBVRE, Le PhD Mohamed CHAMLALI, le PhD Sylvie RATOSLAVOVA, le PhD Hiba ABOUDAYA, le PhD Sana KOUBA, le PhD Sayda DHAOUADI, le PhD Hazar KRAIEM, Julie AUWERCX, Julie SCHNIPPER et la plus gentille de tous Hiba MEJRI. Nos discussions intéressantes ainsi que nos blagues sans cesse resteront toujours dans ma mémoire. Je vous remercie pour tous ces beaux souvenirs.

Table des matières

Remerciements	1
.....	1
Liste des abréviations	1
Liste des figures	1
Liste des tableaux	4
Avant-Propos	1
Introduction	3
Chapitre 1 : Le venin de scorpion	4
1. Généralités sur l'envenimation scorpionique	5
2. Composition du venin de scorpion	6
3. Toxicité du venin de scorpion	7
4. Classification des toxines de scorpions	8
4.1. Les toxines de scorpions agissant sur les canaux sodiques (NaScTxS)	8
4.2. Les toxines de scorpions agissant sur les canaux potassiques (KTxs).....	9
4.3. Les toxines de scorpions agissant sur les canaux calciques (CaTxS).....	10
4.4. Les toxines de scorpions agissant sur les canaux chlorure (ClTxS).....	11
5. Utilisation de peptides de scorpions pour des intérêts thérapeutiques	12
5.1. Toxines de scorpions ciblant les canaux sodiques dans le cancer	13
5.2. Toxines de scorpions ciblant les canaux potassiques dans le cancer.....	17
5.3. Toxines de scorpions ciblant les canaux chlorure dans le cancer	19
5.4. Toxines de scorpions ciblant les canaux calciques dans le cancer	22
Chapitre 2 : Canaux sodiques et toxines de scorpions	26
1. Les gènes des canaux Nav	27
2. Caractéristiques des sous types des canaux Nav	29
• Localisation et pathologies associées au canal Nav1.1	30

• Localisation et pathologies associées au canal Nav1.2	30
• Localisation et pathologies associées au canal Nav1.3	31
• Localisation et pathologies associées au canal Nav1.4	31
• Localisation et pathologies associées au canal Nav1.5	31
• Localisation et pathologies associées au canal Nav1.6	32
• Localisation et pathologies associées au canal Nav1.7	33
• Localisation et pathologies associées au canal Nav1.8	33
• Localisation et pathologies associées au canal Nav1.9	33
3. La structure des canaux Nav	34
4. Mode de fonction des canaux Nav.....	37
4.1. Activation des canaux Nav	38
4.2. Inactivation rapide des canaux Nav	39
5. Sites de fixation des neurotoxines sur les canaux Nav	40
• Le site de fixation 3	42
6. Pharmacologie des peptides de scorpions agissant sur les canaux Nav.....	42
6.1. Effets physiologiques sur les canaux Nav suite à la fixation des α -toxines de scorpion.....	43
6.2. Effet physiologique sur les canaux Nav suite à la fixation des β -toxines de scorpion	
45	
Chapitre 3 : Immunothérapie et antitoxines de scorpions	47
1. Historique et limite de l'immunothérapie contre l'envenimation scorpionique....	48
2. Cartographie des épitopes des toxines d'<i>Androctonus</i>	49
2.1. Premières tentatives de caractérisation des sites antigéniques des toxines.....	49
2.2. Utilisation de peptides synthétiques pour définir des épitopes conformationnels .	50
2.3. La méthode Pepscan (Peptide scan).....	52
2.4. Utilisation d'anticorps monoclonaux pour caractériser les épitopes des toxines d' <i>Androctonus</i>	53

3. Les différentes études de recherche visant à améliorer la préparation des anticorps anti-venin.....	55
3.1. Désintoxication par modification chimique.....	55
3.2. Venin piégé dans des liposomes	55
3.3. Utilisation de peptides synthétiques ou de la AahII synthétiques pour générer des anticorps neutralisants.....	56
3.4. Variante de AahII synthétisée chimiquement et dépourvue des ponts de cystéines	56
3.5. Utilisation d'anatoxine native pour générer un antisérum.....	56
3.6. Les toxines d' <i>Androctonus</i> comme protéines de fusion exprimées dans <i>Escherichia coli</i>	57
3.7. Technologie du système Phage Display	57
3.8. Anticorps monoclonaux	59
3.9. Les nanoanticorps des camélidés (Nbs).....	62
4. Thérapies avancées des envenimations scorpioniques.....	64
Objectifs de la thèse.....	66
Matériels et méthodes	69
1. Venin de scorpion	70
1.1. Généralités	70
1.2. Extraction et préparation.....	70
2. Purification des molécules du venin	70
2.1. Chromatographie à basse pression.....	71
2.2. Chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC)	72
2.3. Chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	72
3. Lyophilisation	74
4. Culture cellulaire : modèles, milieu et entretien.....	75
4.1. Modèles cellulaires	75
4.2. Culture cellulaire et milieu de culture.....	76

4.3.	Congélation et décongélation des cellules	78
5.	Estimation de la viabilité et la mortalité cellulaire.....	78
5.1.	Test au Bleu de Trypan (BT)	78
5.2.	Test de métabolisation de MTT	79
6.	Etude de la migration cellulaire	80
6.1.	Test de cicatrisation de blessure	80
6.2.	Etude de la migration cellulaire par chambre de Boyden	81
6.3.	Etude de l'invasion cellulaire par chambre de Boyden avec le matrigel	82
7.	Production et purification du Nb10.....	84
8.	Patch clamp.....	85
9.	Etude de l'expression des gènes des canaux ioniques :	87
9.1.	Extraction des Acides ribonucléiques (ARN) totaux :	87
9.2.	Transcription Reverse par Réaction en Chaîne par Polymérase (RT-PCR) :	88
9.3.	Amplification génique par qRT-PCR :	88
10.	Imagerie cellulaire par fluorescence : Etude de la concentration cationique intracellulaire :.....	90
10.1.	Principe :	90
10.2.	Etude du calcium basal et l'entrée calcique <i>via</i> les canaux de la membrane cytoplasmique :	92
10.3.	Evaluation de l'entrée cationique par le Quench au manganèse :	93
11.	Analyse statistique	94
Résultats	95
Partie I :	Caractérisation électrophysiologique, pharmacologique et structurale de l'interaction de l'α-toxine AahII avec le canal Nav1.5 en présence et en absence du nanoanticorps Nb10 (anti-AahII).....	96
1.	Fractionnement de l'extrait du venin de Aah sur gel de Sephadex-G50 par chromatographie à basse pression.....	96

2. Séparation de la fraction AahG50 contenant la toxine AahII par chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC)	98
3. Purification de la toxine AahII à partir du pic 9 de la FPLC par chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	99
4. Production et purification du nanoanticorps Nb10 (Anti-AahII)	99
5. Effet de la toxine AahII sur l'activité du canal Nav1.5.....	100
6. Le Nb10 reverse l'effet de l'AahII sur l'inactivation du canal Nav1.5.....	102
7. Le Nb10 annule l'effet de l'AahII sur l'invasion des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231	105
8. Simulation structurelle <i>in silico</i> d'interaction du complexe Nav1.5 et l'AahII.....	107
Partie II : Évaluation des fractions issues du venin de scorpion Aah sur la viabilité et la migration des cellules cancéreuses mammaires humaines	109
1. Evaluation de l'effet des fractions issues du venin de Aah sur la viabilité des cellules cancéreuses mammaires humaine	109
2. Évaluation de l'effet des fractions issues du venin de Aah sur la migration des cellules cancéreuses mammaires humaines.....	112
3. Purification des fractions M1, M2 et AahG50 par Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	114
4. Criblage de l'effet des sous-fractions issues de M2 et AahG50 fractionnées par HPLC sur la viabilité des cellules MDA-MB-231	115
5. Effet des sous-fractions M2_15, AahG50_2 et AahG50_6 sur la viabilité des cellules MDA-MB-231	117
6. Les sous-fractions AahG50_2 et AahG50_6 n'affectent pas l'expression du canal ORAI1 et de STIM1.....	118
Discussion.....	121
Partie I : Caractérisation électrophysiologique, pharmacologique et structurale de l'interaction de l'α-toxine AahII avec le canal Nav1.5 en présence et en absence du nanoanticorps Nb10 (anti-AahII).....	122

Partie II : Évaluation des fractions issues du venin de scorpion Aah sur la viabilité et la migration des cellules cancéreuses mammaires humaines	126
Conclusion et perspectives.....	132
Références bibliographiques	136

Liste des abréviations

AA : Acide aminée	CaTxS : Toxines de scorpions agissant sur les canaux calciques
Aah : <i>Androctonus australis hector</i>	Ca _v : Canal calcique voltage-dépendant
Aam : <i>Androctonus amoreux</i>	Cdk4 : Kinase dépendante des cyclines 4
AcMs = mAbs : Anticorps monoclonaux	CE ₅₀ : Concentration efficace médiane
ADN : Acide désoxyribonucléique	CFTR : Régulateur de conductance transmembranaire pour la fibrose kystique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire	CI ₅₀ : Concentration inhibitrice médiane
AKT : Protéine kinase B	Cl ⁻ : Ion chlore
AM : Acétyle-Méthyle	CLC-3 : Canal chlorure 3
Arg : Arginine	CITx : Chlorotoxine
ARNm : Acide ribonucléique messager	CITxs : Toxines de scorpions agissant sur les canaux chlorure
Asp : Acide aspartique	CO ₂ : Dioxyde de carbone
ATP : Adénosine triphosphate	Ct : Cycle seuil
BK _{Ca} : Canaux potassiques activés par le calcium à grande conductance	CTx : Charybdotoxine
BmK AGAP : <i>Buthus martensii Karsch</i> antitumor-analgesic peptide	Cys : Cystéine
Bot : <i>Buthus occitanus tunetanus</i>	DBP : Peptides avec des ponts disulfures
BSA : Albumine de sérum bovin	DL ₅₀ : Dose létale médiane
BT : Bleu de Trypan	DMSO : Diméthylsulfoxyde
C : Carbone	DO : Densité optique
Ca ²⁺ : Ion calcium	DP : Domaine du pore
	EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique

ELISA : Dosage immuno-enzymatique

EMEM : Milieu Eagle's Minimal Essential

ER : œstrogènes

ERG : Ether-à-go-go-Related Gene

Erk1/2 : Extracellular signal-regulated kinases

F : Fluorescence

F(ab) : Fragment de liaison à l'antigène monomérique

F(ab')₂ : Fragment de liaison à l'antigène dimérique

FPLC : Chromatographie liquide rapide des protéines

Gly : Glycine

GPCR : Récepteur couplé aux protéines G

GΩ : Gigaohm

h : Heure

H⁺ : Ion hydrogène

H₂O : Eau

HCa : Hémiacalcine

HCL : Acide chlorhydrique

HdCa : Hadrucalcine

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HER2 : Récepteur du facteur de croissance épidermique humain

His : Histidine

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

Hz : Hertz

IbTx : Ibériotoxine

ICK : nœud de cystine inhibiteur

IFM : Motif « isoleucine, phénylalanine et méthionine »

IgG : Immunoglobulines G

IgY : Immunoglobulines Y

IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

IpTxA : Imperatoxine A

K⁺ : Ion potassium

K_{Ca} : Canaux potassiques activés par le calcium

K_d : Constante de dissociation à l'équilibre

kDa : Kilodalton

kHz : Kilohertz

KLH : Keyhole limpet hemocyanin

KTxs : Toxines de scorpions agissant sur les canaux potassiques

K_v : Canal potassique voltage-dépendant

LPA : lysophosphatidique

Lys : Lysine	NDBP : Peptides sans des ponts disulfures
M : Molaire	NF- κ B : Nuclear factor-kappa B
MBP : Protéine de liaison au maltose	Ni : Nickel
MCa : Maurocalcine	nm : Nanomètre
mg : Milligramme	nM : Nanomolaire
MgTx : Margatoxine	p21 ^{Waf1/Cip1} : Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
min : Minutes	PBS : Tampon phosphate salin
ml : Millilitre	PCR : Amplification en Chaîne par Polymérase
mm : Millimètre	PET : Polyéthylène téréphtalate
mM : Millimolaire	pH : Potentiel hydrogène
MMP : Métalloprotéinase matricielle	pM : Picomolaire
mOsm : Milliosmol	PR : Progestérones
ms : Milliseconde	PSM : Poste de sécurité microbiologique
MTT : Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium	PTX3 : Pentraxine 3
mV : Millivolt	q-PCR : Amplification en Chaîne par Polymérase quantitative
M Ω : Megaohm	rBmK AGAP : Recombinant <i>Buthus martensii</i> Karsch antitumor-analgesic peptide
<i>n</i> : Nombre d'expérience réalisée	RIA : Radio-immunoassay
Na ⁺ : Ion sodium	RMN : Résonance magnétique nucléaire
NaChBac : Canaux sodiques bactériens	ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène
NaOH : Hydroxyde de sodium	Rpm : Rotation par minute
NaScTxS : Toxines de scorpions agissant sur les canaux sodiques	RT : Transcriptase reverse
Na _V : Canal sodiques voltage-dépendant	
Nb : Nanoanticorps	

RyR1 : Recepteur de ryanodine type 1

RyRs : Recepteur de ryanodine

s : Seconde

S : Segment (d'un canal ionique)

scFv : Single-chain variable fragment

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SEM : Erreur standard à la Moyenne

Ser : Sérine

SNA : Système nerveux périphérique autonome

SNC : Système nerveux central

SOCE : Store Operated Calcium Entry

SVF : Sérum de Vœu Fœtal

tau : Constante du temps d'inactivation

TES : Acide N-[trisméthyl]-2-aminoéthanesulfonique

TFA : Trifluoroacétique

Tg : Thapsigargine

TRPC : Canaux de potentiel de récepteur transitoire

TRPV : Transient receptor potential vanilloïde 1

TTX : Tétrodotoxine

TTX-R : Tétrodotoxine-resistant

Tyr : Tyrosine

U.A : Unité d'absorption

UV : Ultraviolet

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VH : Human heavy chain variable domain

VH : Région variable de la chaîne lourde des immunoglobulines

VHH : Région variable de la chaîne lourde des anticorps des camélidés

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VL : Région variable de la chaîne légère des immunoglobulines

VSD : Domaine sensible au voltage

X g (centrifugation) : Force de gravité

µg : Microgramme

µM : Micromolaire

% : Pourcentage

[XX]_i : Concentration intracellulaire de XX

° : Degré

°C : Degré Celsius

µl : Microlitre

3D : 3 dimensions

Å : Ångström

Liste des figures

Figure 1 : Composition du venin de scorpion (Schéma adapté à partir de (Tobassum et al., 2020))	7
Figure 2 : Représentation schématique en ruban de la toxine Maurocalcine (PDB : 1C6W). 11	
Figure 3 : Modulation de la prolifération cellulaire et l'apoptose par les NaScTxS (Schéma réadapté à partir de l'article (Srairi-Abid et al., 2019)).....	16
Figure 4 : Modulation de la prolifération et la migration cellulaire par les KTxS (Schéma réadapté à partir de l'article (Srairi-Abid et al., 2019)).....	19
Figure 5 : Modulation des processus tumoraux par les CITxS, exemple de la CITx, rBmK-CTa, CA4 et CTx23 (Schéma réadapté à partir de l'article (Srairi-Abid <i>et al.</i> , 2019)).....	22
Figure 6 : Modulation des processus cellulaires par les toxines de scorpions	25
Figure 7 : Représentation schématique du canal Nav (Detta <i>et al.</i> , 2015).....	36
Figure 8 : Schéma fonctionnel des canaux Nav (A : source,(Israel <i>et al.</i> , 2017))	38
Figure 9 : Arbre phylogénétique des différentes isoformes des canaux Nav (Catterall, 2015)	Erreur ! Signet non défini.
Figure 10 : Représentation schématique de la sous-unité α fonctionnelle des canaux Nav et identification des zones connues de liaison des neurotoxines (Stevens <i>et al.</i> , 2011)	42
Figure 11 : Représentation schématique de l'effet des α -toxines de scorpion sur les propriétés biophysiques des canaux Nav (Israel <i>et al.</i> , 2017)	45
Figure 12 : Représentation schématique de l'effet des β -toxines de scorpion sur les propriétés biophysiques des canaux Nav (Israel <i>et al.</i> , 2017)	46
Figure 13 : Représentation schématique en ruban de la toxine AahII (PDB : 1AHO)	50
Figure 14 : Principe simplifié de la technique de Pepscan (www.pepscan.com; antibody-discovery).....	53
Figure 15 : Principe de production des AcMs (Livre : Immunohématologie, Roselyne L'Italien 2008, Chapitre 2, section 2.6.8, page 53).....	54
Figure 16 : Illustration des principales étapes de la technique du phage display (www.Biocytogen.com ; phage-display).....	59
Figure 17 : Structure cristallographique du complexe AahII-F(ab) ₄ C1 ; (PDB : 4AEI).....	62
Figure 18 : Comparaison entre un anticorps conventionnel et un nanoanticorps (www.chromotek.com, Nanobodies/VHHs, modifiée).....	64

Figure 19 : Illustration du protocole de la chromatographie à basse pression	71
Figure 20 : Illustration du protocole de la HPLC.....	74
Figure 21 : Schématisation du test de cicatrisation (www.trends.medicaexpo.fr, Test de cicatrisation).....	80
Figure 22 : Schématisation du protocole de la migration cellulaire par la technique de la chambre de Boyden.....	82
Figure 23 : Schématisation du protocole de l'invasion cellulaire par la technique de la chambre de Boyden.....	83
Figure 24 : Schématisation du protocole de la production et la purification du Nb10	85
Figure 25 : Structure et principe de fonctionnement de la sonde Fura-2	92
Figure 26 : Méthode d'analyse du Quench au Manganèse.....	94
Figure 27 : Profil chromatographique du fractionnement de l'extrait du venin de Aah sur gel de Sephadex-G50 par chromatographie à basse pression	97
Figure 28 : Profil chromatographique du fractionnement de la fraction toxique AahG50 par FPLC	98
Figure 29 : Profil chromatographique du fractionnement du pic 9 par HPLC.....	99
Figure 30 : Profil de migration des protéines d'élution de Nb10 sur gel de polyacrylamide dénaturant à 12 %	100
Figure 31 : Effet pharmacologique de la toxine AahII sur le canal Nav1.5 surexprimé dans les cellules HEK293 en incubation et en perfusion	102
Figure 32 : Effet électrophysiologique de Nb10 sur le complexe AahII-Nav1.5 en incubation	103
Figure 33 : Effet électrophysiologique de Nb10 sur le complexe AahII-Nav1.5 en perfusion	104
Figure 34 : Effet de AahII, Nb10 et AahII+Nb10 sur l'invasion des cellules MDA-MB-231	106
Figure 35 : Présentation de deux faces de l'interaction moléculaire du complexe AahII-Nav1.5	107
Figure 36 : Évaluation de la viabilité des cellules MCF-7 traitées par différentes concentrations des fractions issues du venin de Aah.....	110
Figure 37 : Evaluation de la viabilité des cellules MDA-MB-231 traitées par différentes concentrations des fractions issues du venin de Aah	112

Figure 38 : Evaluation de la migration cellulaire des cellules MDA-MB-231 traitées par les fractions issues du venin de Aah	113
Figure 39 : Profil chromatographique du fractionnement des fractions de Aah sur gel par HPLC	114
Figure 40 : Evaluation de la viabilité des cellules MDA-MB-231 traitées par différentes sous-fractions de M2 et AahG50	116
Figure 41 : Evaluation de la viabilité des cellules MDA-MB-231 traitées par différentes sous-fractions de M2 et AahG50 sur une cinétique de 96h	118
Figure 42 : Effet des sous-fractions de AahG50 sur l'expression transcriptionnelle de ORAI1 et STIM1 dans les cellules MDA-MB-231	119
Figure 43 : Schéma de synthèse de l'interaction de la toxine AahII avec le nanoanticorps Nb10 et les conséquences au niveau électrophysiologique et physiologique	125
Figure 44 :Schéma de synthèse de l'évaluation des fractions issues du venin de scorpion Aah sur la viabilité des cellules cancéreuses mammaires humaines	131

Liste des tableaux

Tableau 1 : Gradient de séparation des molécules par HPLC	73
Tableau 2 : Composition du milieu de cultures des cellules MCF-7, MDA-MB-231 et HEK293	77
Tableau 3 : Composition du milieu extracellulaire utilisé en Patch-clamp.	86
Tableau 4 : Composition du milieu intracellulaire (intra pipete) utilisé en Patch-clamp.	86
Tableau 5 : Séquence des amorces utilisées pour la q-PCR	89
Tableau 6 : Composition du milieu physiologique extracellulaire utilisé en imagerie calcique à 2 mM Ca ²⁺	91
Tableau 7 : Tableau récapitulatif des effets des molécules issues du venin de Aah sur la viabilité cellulaire des lignées du cancer du sein	120

Avant-Propos

Le venin de scorpion est considéré comme l'une des principales sources exploitées pour extraire des molécules d'origine naturelle.

Historiquement, les études sur les venins de scorpions ont été étroitement liées aux problématiques en lien avec les envenimations scorpioniques et aux symptômes provoqués par la présence du venin suite à une piqûre de scorpion. Ainsi, l'Homme s'est intéressé à l'étude de ces venins dans le but d'améliorer les moyens de lutte contre les nombreuses envenimations scorpioniques. Les premières recherches effectuées sur les venins des scorpions visaient à comprendre les causes et les formes de toxicités observées ainsi que l'identification des principes actifs.

De nos jours, les compositions des venins de scorpions ainsi que leurs molécules toxiques ont été bien analysées. Ces molécules sont de nature protéiques connues sous le nom de toxines et agissent sur les canaux sodiques, potassiques, calciques ou chlorure. Les toxines les plus actives, responsables de la symptomatologie de l'envenimation scorpionique chez l'Homme, sont majoritairement hautement spécifiques des canaux sodium.

Sur le plan structural, ces polypeptides sont considérés comme des toxines longues, formées par 60 à 75 résidus d'acides aminés réticulés par quatre ponts disulfures. Ces toxines se caractérisent par un véritable polymorphisme moléculaire à l'intérieur d'un même venin. Certaines sont spécifiquement actives sur les mammifères, d'autres sur les insectes, d'autres encore sur les crustacés.

La lutte contre l'envenimation scorpionique consiste entre autre à disposer d'un anti-venin qui soit capable de neutraliser avant tout les peptides les plus toxiques connus comme agissant sur les canaux sodiques. Il existe sur le marché, plusieurs anti-venins dont les performances sont variables et qui diffèrent par leurs conceptions et leurs technologies de développement.

Les précédents travaux élaborés par notre équipe ont permis de produire un anti-venin très prometteur à base de nanoanticorps. Ce nanoanticorps s'est montré très efficace pour protéger des souris contre une envenimation scorpionique provoquée par l'injection de la toxine la plus toxique extraite à partir du scorpion Nord-Africain *Androctonus australis Hector*. La

dynamique d'interaction de ce nanoanticorps avec la toxine en présence du récepteur et au niveau cellulaire reste à étudier.

Grace à sa richesse en molécules naturelle à forte activité, le venin de scorpion a été utilisé dès l'antiquité pour ses activités thérapeutiques. Ce pouvoir est conféré par les peptides qui agissent en modulant l'activité des canaux ioniques impliqués dans des processus cellulaires. De nos jours, plusieurs peptides de scorpions sont utilisés comme des outils précieux pour le développement de médicaments thérapeutiques contre plusieurs types de cancers.

Dans ce contexte notre projet de recherche s'inscrit dans le cadre des démarches scientifiques entreprises par nos équipes de recherches pour une meilleure compréhension (i) d'une part des interactions moléculaires de type Toxine/Récepteur et Toxine/Nanoanticorps et (ii) d'autre part pour l'étude de la capacité des polypeptides de venin de scorpion à moduler la viabilité cellulaire des lignées cellulaires tumorales.

Introduction

Chapitre 1 : Le venin de scorpion

1. Généralités sur l'envenimation scorpionique

Les scorpions sont considérés parmi les premiers animaux apparus sur la Terre il y a plus de 400 millions d'années (Wendruff *et al.*, 2020). Ils sont largement répandus dans le monde entier et plus de 2200 espèces ont été décrites jusqu'à présent (Feola *et al.*, 2020). Les scorpions ont acquis une réputation négative en raison de leurs piqûres et de leurs envenimations. La majorité des scorpions dangereux pour l'Homme appartiennent à la famille des Buthidae. Cette famille regroupe le plus grand nombre de scorpions (plus que 1000 espèces) qui sont très répandus spécialement dans les zones arides. Les espèces de scorpions les plus dangereuses dans le grand Maghreb sont *Androctonus australis hector* (Aah), *Androctonus amoreuxi* (Aam), et *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) qui diffèrent par leur taille et par les effets létaux de leur venin. Les espèces *Centruroides* et *Tityus* sont principalement répandues respectivement en Amérique du Nord ou centrale et en Amérique du Sud (Bucherl 1971).

Plus de 1 500 000 piqûres de scorpions sont signalées chaque année et le nombre de décès pourrait dépasser 3 250 par an dans le monde (Chippaux and Goyffon, 2008 ; Feola *et al.*, 2020). De ce fait, l'envenimation scorpionique représente un problème de santé publique notamment dans les régions tropicales et subtropicales.

Les piqûres des scorpions peuvent provoquer divers effets allant de la douleur et de l'inflammation locales aux lésions tissulaires. Même si dans 95 % de cas, les piqûres de scorpions ne provoquent que des manifestations locales dominées par la douleur, les cas graves peuvent mettre la vie en danger (Chippaux, 2012). Les personnes piquées peuvent présenter des signes et des symptômes impliquant le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique autonome (SNA) et parfois une insuffisance respiratoire et cardiaque entraînant ainsi la mort dans les cas les plus graves. La gravité des piqûres de scorpions dépend de l'espèce concernée, de sa taille, de son âge, de sa nutrition, des conditions climatiques de son habitat, de la quantité de venin injecté et du retard dans la prise en charge du patient. Une sévérité élevée est observée principalement lorsque le site de la piqûre est une zone vascularisée, comme le tronc, la tête ou le cou, ainsi que lorsque les victimes sont des enfants. L'envenimation scorpionique s'accompagne souvent d'une détresse cardiorespiratoire comprenant l'hypertension, la bradycardie, la tachycardie, l'hypotension, la bronchorrhée et des œdèmes pulmonaires (Ismail, 1995 ; Bawaskar and Bawaskar, 2012).

Les effets cardiovasculaires observés après une envenimation scorpionique se produisent généralement en deux phases, la phase initiale hyperdynamique caractérisée par une

hypertension et une tachycardie attribuée à la sécrétion de catécholamines par les terminaisons nerveuses du SNA sympathique postganglionnaire et des glandes surrénales. Cette phase est suivie d'une autre phase caractérisée par une hypotension hypokinétique prolongée et une bradycardie (Ismail, 1995).

La sérothérapie associée au traitement symptomatique reste le seul moyen pour combattre ce grave problème de santé publique, afin de neutraliser les effets délétères survenus chez les patients envenimés.

2. Composition du venin de scorpion

Les scorpions ont été largement étudiés en raison de la complexité de leurs venins (Al-Asmari *et al.*, 2016b). Les venins de scorpions sont des mélanges très complexes qui contiennent une grande variété de composés tels que les peptides de faible poids moléculaire, les enzymes, les acides aminés libres, les amines biogènes, les nucléotides, les mucopolysaccharides, les mucoprotéines, l'histamine, la sérotonine, les composants hétérocycliques et plusieurs substances non identifiées (**Figure 1**). Les peptides présents dans les venins de scorpions sont subdivisés en peptides présentant des ponts disulfures (DBP) et ceux sans ponts disulfures (NDBP) qui sont les principaux composants (Ortiz *et al.*, 2015). L'analyse de l'empreinte de la masse moléculaire a révélé que les peptides de faible poids moléculaire représentent plus d'un tiers de tous les peptides qui composent le venin d'un scorpion (Rodriguez de la Vega *et al.*, 2010). Ces peptides sont surtout connus pour leurs effets délétères sur un organisme vivant. Cependant, ils présentent aussi des activités antipaludiques, antimicrobiennes, anticancéreuses et/ou immunosuppressives souvent importantes et prises en considérations pour le développement de médicaments (Ortiz *et al.*, 2015).

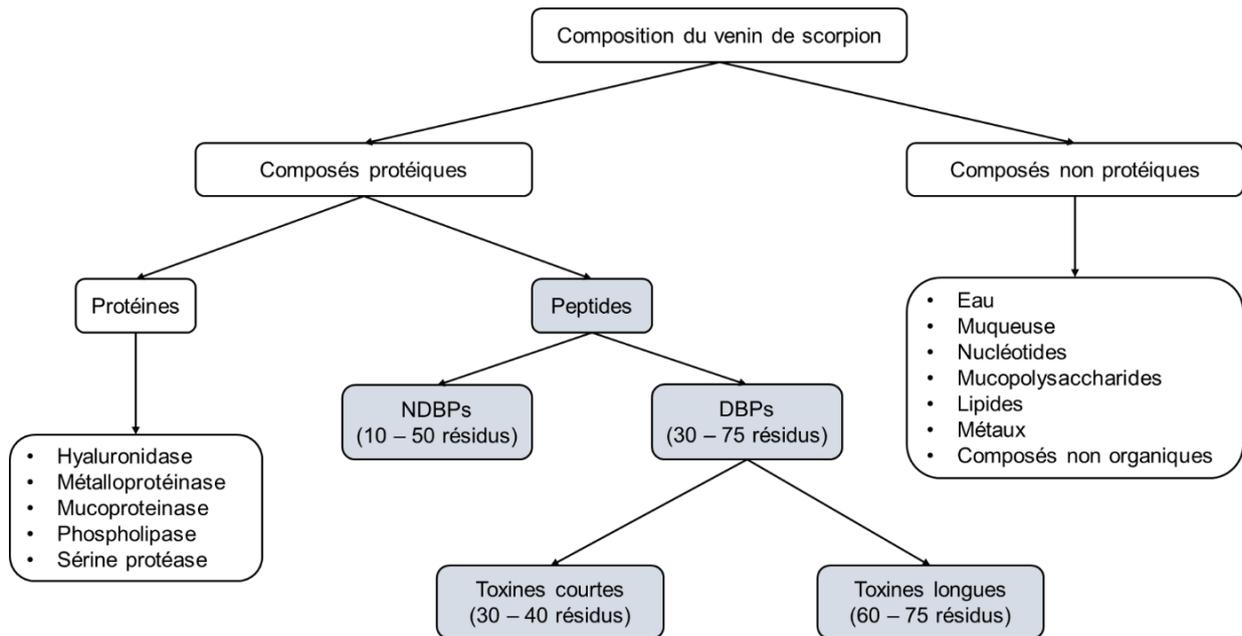


Figure 1: Composition du venin de scorpion (Schéma adapté à partir de (Tobassum *et al.*, 2020))

3. Toxicité du venin de scorpion

La plupart des venins de scorpions sont considérés comme toxiques et se caractérisent par une diffusion et une action très rapide (environ 15 min en moyenne avec un maximum de 60 min pour l'atteinte de certains organes tels que les poumons et le pancréas) (Hammoudi-Triki *et al.*, 2007). Leur toxicocinétique explique en grande partie les symptômes précoces observés chez les patients envenimés. L'analyse biochimique du venin de scorpion montre la présence d'un grand nombre de peptides de faible poids moléculaire correspondant aux toxines (Rodriguez de la Vega *et al.*, 2010 ; Cao *et al.*, 2014 ; Romero-Gutierrez *et al.*, 2017). Ces toxines sont les entités moléculaires qui ont été pendant longtemps les plus étudiées. Elles sont principalement des neurotoxines mais aussi des néphrotoxines, des cardiotoxines et des toxines hémolytiques qui interagissent avec les canaux ioniques, les enzymes et les composés allergènes (Almeida *et al.*, 2012).

La toxicité des venins de scorpions dépend de leur contenu en neurotoxines. Les neurotoxines interagissent avec les canaux ioniques (Huang and Jan, 2014 ; Rao *et al.*, 2015 ; Restano-Cassulini *et al.*, 2017) et provoquent une altération du fonctionnement des cellules excitables dans les tissus nerveux et musculaires, ce qui engendre les symptômes de l'envenimation (Restano-Cassulini *et al.*, 2017). Elles sont capables de moduler ou de bloquer les canaux

ioniques cibles (Ortiz *et al.*, 2015 ; Restano-Cassulini *et al.*, 2017) ce qui provoque de multiples événements physiologiques associés à des perturbations métaboliques et biologiques (Al-Asmari *et al.*, 2016a). De point de vue structural, les toxines de scorpions sont classées en deux catégories principales selon leurs cibles et leurs tailles. La première catégorie sont les toxines formée d'une chaîne courte composées de 30 - 40 acides aminés, stabilisés par 3 ou 4 ponts disulfures et qui modulent les canaux potassiques. La deuxième catégorie étant les toxines formée d'une chaîne longue composées de 60 - 75 acides aminés et stabilisés par 4 ponts disulfures qui affectent spécifiquement les canaux sodiques voltage-dépendants (Ortiz *et al.*, 2015). En raison de leur haute spécificité, certaines de ces toxines ont été utilisées comme sondes pharmacologiques pour étudier les canaux ioniques.

4. Classification des toxines de scorpions

Il existe plusieurs types de classification des toxines de scorpions. Dans les années 80, elles ont été initialement classées en familles de toxines courtes et toxines longues (**Figure 1**). Bien que ces toxines aient des séquences différentes, la plupart d'entre elles adoptent un motif structural et cristallographique formé par une hélice α liée à 2 ou 3 feuillets β antiparallèles stabilisés par trois ou quatre ponts disulfures (Fontecilla-Camps *et al.*, 1988)

En raison de leur grande affinité pour les canaux ioniques, une seconde classification selon leurs cibles pharmacologiques a été rapportée un peu plus tard. Les toxines courtes se fixent généralement sur les canaux potassiques, calciques ou chlorure, alors que la plupart des toxines longues sont actives sur les canaux Na_v .

4.1. Les toxines de scorpions agissant sur les canaux sodiques (NaScTxS)

Les toxines de type NaScTxS sont principalement responsables de l'effet neurotoxique des venins de scorpions. Ces toxines sont classées en fonction de leur sensibilité à la variation du potentiel électrique lors de la liaison avec la cible. On distingue donc les toxines de type α et les toxines de type β , respectivement sensibles et insensibles à la variation du potentiel électrique (Koppenhofer and Schmidt, 1968). Les α - et β -NaScTx sont décrites comme des activateurs des canaux Na_v , bien que leurs mécanismes d'action soient distincts. Cette différence est plus détaillée dans le chapitre 2 section 6.1 et 6.2.

Par ailleurs, les toxines de type NaScTx ont été également classées en fonction de l'organisme qu'elles ciblent : les toxines peuvent être spécifiques des mammifères, des insectes ou agissent simultanément sur plusieurs organismes différents (Dufton and Rochat, 1984). Cette classification est également liée aux similarités de séquences qui sont étroitement liées à leurs activités électrophysiologiques (Dufton and Rochat, 1984). Actuellement, 10 groupes de toxines de scorpions à chaîne longue ont été identifiés. Les 4 premiers groupes correspondent aux toxines de type α , les groupes 5 et 6 correspondent aux toxines de type β et les groupes 7, 8 et 9 correspondent à des toxines spécifiques des insectes.

Le dernier groupe identifié (groupe 10) contient des toxines de type Birtoxin. Il s'agit de peptides de 58 acides aminés avec seulement trois ponts disulfures (Inceoglu *et al.*, 2001 ; Martin-Eauclaire *et al.*, 2005). Ce groupe contient des peptides aux séquences similaires mais avec des activités différentes : certains de ces peptides sont actifs sur les canaux sodiques (Inceoglu *et al.*, 2001 ; Martin-Eauclaire *et al.*, 2005), tandis que d'autres sont actifs sur les canaux potassiques et très faiblement actifs sur les canaux Na_v (Srairi-Abid *et al.*, 2005). Il pourrait donc représenter un groupe intermédiaire entre les toxines actives sur les canaux sodiques et celles actives sur les canaux potassiques (Soli *et al.*, 2009).

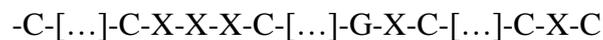
4.2. Les toxines de scorpions agissant sur les canaux potassiques (KTxs)

Les toxines de type KTxs sont moins majoritaires dans les venins de scorpions. Ce sont des peptides courts constitués de 30 - 40 acides aminés. Certains d'entre eux ont une affinité très élevée (de l'ordre du pM ou du nM) pour un ou plusieurs sous-types de canaux potassiques. Ces peptides sont généralement réticulés par trois ponts disulfures qui permettent à la molécule globulaire d'avoir une conformation tridimensionnelle stable (Darbon, 1999).

La classification des KTxs en fonction de leurs séquences a été établie pour la première fois par Miller (Miller *et al.*, 1985). Cette classification est basée sur l'alignement de la Cystéine et d'autres résidus hautement conservés. Le nombre de peptides de venin de scorpion rapportés comme bloquant ou modifiant la perméabilité des canaux potassiques dans les cellules excitables et non-excitables a fortement augmenté ces dernières années. Aujourd'hui, il est proposé de regrouper toutes les KTxs en 6 familles basées sur leur homologie de séquence, leur modèle de repliement 3D et leur activité. Les toxines $\text{CS}\alpha/\beta$ sont divisées en trois familles : α -KTxs (20-40 résidus), β -KTxs (45-75 résidus) et γ -KTxs (affectant un sous-ensemble particulier de K_v , appelés canaux ERG). Les toxines $\text{CS}\alpha/\alpha$ sont placées dans la famille des ϕ -

KTxs. Les toxines Kunitz sont nommées δ -KTxs et récemment les toxines ICK (Inhibitor Cystine Knot) ont été proposées pour constituer la famille κ -KTxs (Kuzmenkov *et al.*, 2016).

La famille α -KTxs est considérée comme la plus importante et compte environ 200 peptides (Kuzmenkov *et al.*, 2016). Ils sont divisés en 31 sous-familles (α -Ktx1 à α -Ktx31 ; la sous-famille α -Ktx25 est vide) (ElFessi-Magouri *et al.*, 2015 ; Olamendi-Portugal *et al.*, 2017). Ces toxines présentent une séquence consensus permettant d'établir un motif structural commun. En effet, la position des 6 résidus cystéine est conservée dans toutes les toxines KTxs, ce qui assure la formation du motif architectural α/β (Srairi-Abid *et al.*, 2019). Cette architecture a été exploitée par Bontems et al (Bontems *et al.*, 1991) pour ensuite proposer un enchainement qui fixe la position de 7 résidus (6 Cystéines et une Glycine) :



4.3. Les toxines de scorpions agissant sur les canaux calciques (CaTxS)

La première toxine de scorpion active sur un canal calcique à avoir été identifiée est l'Imperatoxine A (IpTxA), isolée à partir du venin de *Pandinus imperator* (Valdivia *et al.*, 1992). Plusieurs peptides semblables à l'IpTxA ont ensuite été identifiés dans d'autres venins de scorpions, notamment la Maurocalcine (MCa) (Fajloun *et al.*, 2000), l'Hémicalcine (HCa) (Shahbazzadeh *et al.*, 2007) et l'Hadrucalcine (HdCa) (Schwartz *et al.*, 2009). Elles sont constituées de 33 à 35 acides aminés dont 6 résidus de Cystéine. Deux autres toxines BjTx-1 et BjTx2 de 28 acides aminés ont été isolées du venin du scorpion *Buthus Judaicus* (Zhu *et al.*, 2004). Tous ces peptides stimulent l'interaction de la [3 H]-ryanodine avec le récepteur aux Ryanodine de type R1 (RyR1) et entraînent une libération importante de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique. Ces toxines stabilisent aussi la conductance calcique des RyRs du muscle squelettique reconstitué dans les couches bilipidiques. D'autres peptides, comme les Opicalcines 1 et 2 ont été identifiés à partir de séquences nucléotidiques de bibliothèques d'ADNc de venin de scorpion *Opisthophthalmus carinatus* (Zhu *et al.*, 2003). Ces calcines n'ont pas encore été purifiées ni testées pour leur activité biologique.

Les structures 3D de la MCa et l'IpTxA ont été déterminées par RMN (Mosbah *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2004). Ces toxines sont repliées selon un motif ICK différent du motif conventionnel $CS\alpha/\beta$ caractéristique des toxines de scorpions actives sur les canaux sodiques, potassiques et chlorure. Le terme " Knot Cystine " ou nœud de cystine consiste en un anneau formé par deux ponts disulfures ayant leurs chaînes peptidiques traversées par un troisième pont disulfure. Ce

motif se retrouve dans plusieurs structures de peptides riches en cystéine (Chiche *et al.*, 1989 ; Lancelin *et al.*, 1991 ; Nilges *et al.*, 1991 ; Norton and Pallaghy, 1998). Toutes ces molécules partagent le même schéma d'appariement des ponts disulfures : C1-C4/C2-C5/C3-C6 (les Cystéines 1 à 6 sont numérotées dans l'ordre croissant de N-terminal à C-terminal), C3-C6 étant le pont de l'anneau croisé. L'élément structural secondaire prédominant dans ces toxines sont les feuillets à deux ou trois brins liés au nœud de Cystine (**Figure 2**).

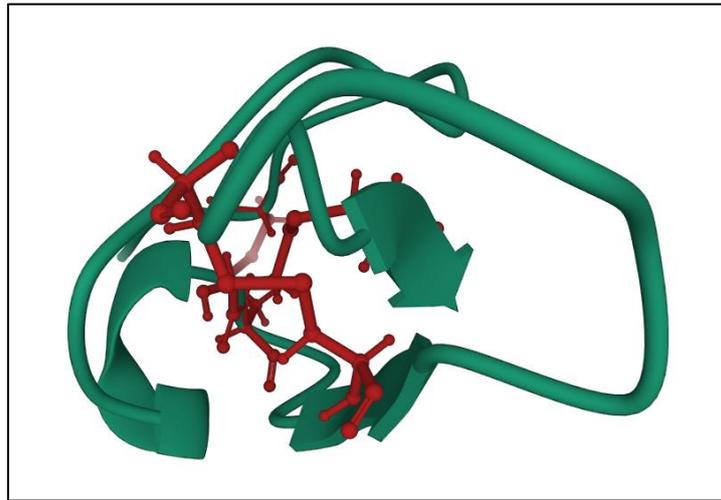


Figure 2 : Représentation schématique en ruban de la toxine Maurocalcine (PDB : 1C6W)

Les feuillets sont représentés en vert, les ponts disulfures formant l'anneau sont représentés en rouge.

Une autre famille de toxines ciblant les canaux calciques a été identifiée à partir du venin de scorpion de l'espèce *Parabuthus*. Il s'agit de la Kurtoxine et des peptides qui lui sont semblables. Structuralement ils sont composés de 63 acides aminés et ils peuvent se lier avec une grande affinité aux canaux calciques voltage-dépendants de type T (Cav3.x) (Chuang *et al.*, 1998). Ces toxines interagissent également avec les canaux Cav de type L, N et P (Sidach and Mintz, 2002) ainsi qu'avec le canal Nav1.6 (Zhu *et al.*, 2009) dans les neurones centraux et périphériques.

4.4. Les toxines de scorpions agissant sur les canaux chlorure (CITxs)

Isolée à partir du venin du scorpion *Leirus quikestriatus*, la Chlorotoxine (CITx) est la première toxine identifiée capable de bloquer les canaux chlorure (DeBin *et al.*, 1993). Il s'agit d'un court peptide de 36 résidus d'acides aminés (Huys *et al.*, 2004) réticulés par quatre ponts disulfures. La CITx a été initialement utilisée comme outil pharmacologique pour caractériser

les canaux chlorure. D'autres peptides similaires à la ClTx ont été identifiés par la suite comme le BmK-CT (ou Bm-12), purifié à partir du venin de scorpion *Buthus martenzii* Karsch (ElFessi-Magouri *et al.*, 2015). L'ARNm d'un autre peptide de type ClTx a été trouvé dans le même venin, appelé rBmK-CTa (ou Bm-12b) (Goudet *et al.*, 2002). Génétiquement, ces peptides ont montré une identité de séquence de 66% avec la ClTx. Postérieurement, un autre peptide nommé GaTx1 de 3,7 kDa provenant du même venin de scorpion est également actif sur les canaux chlorure (Fuller *et al.*, 2007). Il a été rapporté que les deux peptides ClTx et BmK-CT sont capables de bloquer les canaux chlorure de faible conductance (DeBin *et al.*, 1993 ; Lan *et al.*, 1999 ; Goudet *et al.*, 2002 ; Huys *et al.*, 2004 ; Fuller *et al.*, 2007), alors que GaTx1 est validé comme un bloqueur hautement spécifique pour le canal chlorure du régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR), malgré sa similarité de séquence étroite avec ClTx (75%) (Fuller *et al.*, 2007).

5. Utilisation de peptides de scorpions pour des intérêts thérapeutiques

Etant la cible principale des peptides de scorpion, les canaux ioniques représente le lien direct par lequel ces peptides agissent au niveau cellulaire (Srairi-Abid *et al.*, 2019).

L'activité des canaux ioniques au niveau de la membrane plasmique est étroitement régulée par leurs mécanismes de déclenchement intrinsèques, qui sont à leur tour contrôlés par la présence de facteurs physiques ou chimiques endogènes ou exogènes spécifiques. Lorsqu'ils sont ouverts, les canaux ioniques laissent passer sélectivement certaines ions selon leur gradient électrochimique, ce qui affecte des caractéristiques cellulaires de base telles que le potentiel de la membrane en raison de la génération d'un courant ionique transmembranaire, le volume cellulaire en raison du mouvement transmembranaire couplé de l'eau pour compenser la modification de la tonicité intracellulaire et l'état des voies de signalisation intracellulaires en raison de changements dans l'interaction entre les effecteurs ioniques et les molécules vectrices. En fonction du nombre total de canaux ioniques par cellule et de la densité de leur distribution sur la membrane de la surface cellulaire, les flux d'ions associés à leur activation peuvent produire des changements globaux ou locaux, limités dans l'espace, de ces caractéristiques (Prevarskaya *et al.*, 2018).

Les changements ordonnés du potentiel membranaire, du volume cellulaire et de la signalisation intracellulaire du Ca^{2+} , Na^+ , K^+ ou le Cl^- s'accompagnent et déterminent de manière critique la progression normale des processus clés du destin des cellules, tels que la prolifération, la

différenciation, l'apoptose et la motilité (Bates *et al.*, 2015). Toute perturbation de ces changements ordonnés résultant d'un dysfonctionnement d'un ou de plusieurs canaux ioniques altérerait gravement la prolifération, la différenciation, l'apoptose et/ou la motilité des cellules et favoriserait le développement d'une ou de plusieurs channelopathies sous la forme de certaines caractéristiques du cancer (Prevarskaya *et al.*, 2018).

Le venin de scorpion a été utilisé en médecine traditionnelle dans les cultures anciennes (Gomes *et al.*, 2010 ; Ortiz *et al.*, 2015 ; Bechohra *et al.*, 2016). Les espèces médicalement importantes appartiennent aux genres *Buthus*, *Mesobuthus*, *Parabuthus*, *Androctonus*, *Tityus*, *Leiurus*, et *Centruroides* de la famille des Buthidae (Sadeghian, 2003 ; Chippaux and Goyffon, 2008).

Au cours des années, les venins ont montré un grand potentiel d'application pour le traitement de nombreuses maladies, notamment le cancer (Heinen and da Veiga, 2011 ; Diaz-Garcia *et al.*, 2013). Grâce aux nouvelles méthodologies de fractionnement, les composants des venins de scorpions ont pu être caractérisés et les rôles importants de nombreux peptides et toxines de scorpion ont été définis. Actuellement les toxines de scorpions sont utilisées comme des outils précieux pour le développement de médicaments thérapeutiques contre les maladies cardiovasculaires (Hmed *et al.*, 2013), l'épilepsie (Wang *et al.*, 2001), les maladies auto-immunes (Varga *et al.*, 2012), le cancer du poumon (Jahchan *et al.*, 2013 ; Bechohra *et al.*, 2016), le cancer de la bouche (Tong-ngam *et al.*, 2015), le cancer du cerveau (Dardevet *et al.*, 2015), le cancer du rein (Scholl *et al.*, 2013), le cancer de la prostate (Nakajima *et al.*, 2009), le cancer du sein (Al-Asmari *et al.*, 2016a). D'autres effets visant les processus cellulaires sont aussi observés sur des lignées cellulaires de leucémie humaine (Heinen and da Veiga, 2011 ; Ding *et al.*, 2014), de gliome (Cheng *et al.*, 2014), de neuroblastome (Dardevet *et al.*, 2015) et même sur le développement et la multiplication du VIH (El-Bitar *et al.*, 2015 ; Zabihollahi *et al.*, 2016).

5.1. Toxines de scorpions ciblant les canaux sodiques dans le cancer

Plusieurs toxines spécifiques des canaux sodiques sont impliquées dans les phénomènes de développement tumoral. En effet, il a été démontré que le peptide Cn2 provenant du venin de scorpion *Centruroides noxius* diminue la prolifération cellulaire en induisant un arrêt du cycle cellulaire et une apoptose précoce des cellules F11 de neuroblastome de souris (Escalona *et al.*, 2014).

Les formes recombinantes de peptides analgésique et antitumorale rBmK AGAP et BmK AGAP-SYPU2, provenant du venin du scorpion *Buthus martensii karsch*, ont montré une activité antitumorale *in-vivo* sur la lignée S180 comme modèles cellulaires de fibrosarcome de souris (Liu *et al.*, 2002 ; Shao *et al.*, 2014). D'autres part, la rBmK AGAP a inhibé la prolifération des cellules cancéreuses du côlon humain SW480 en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et l'apoptose cellulaire via la régulation de l'expression de p27, Bax et PTEN ainsi que la diminution du niveau de Bcl2 et la phosphorylation de PI3K et de Akt (Gu *et al.*, 2013). Cette toxine recombinante a également inhibé la prolifération des cellules SHG44 par l'arrêt du cycle cellulaire. D'autre études ont montré que la rBmK AGAP semble également affecter le comportement des cellules métastatiques. En effet, elle inhibe la migration des cellules SHG44 en induisant l'inactivation des kinases AKT, p-38, Erk1/2 et c-Jun et en diminuant les niveaux d'expression des protéines VEGF et MMP-9 (Liu *et al.*, 2009 ; Zhao *et al.*, 2011). Une étude récente a montré que la rBmK AGAP inhibait la transition épithélio-mésenchymateuse, la migration et l'invasion des cellules tumorales mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 *in-vitro* et *in-vivo* en régulant à la baisse le médiateur inflammatoire PTX3, surexprimé dans le cancer du sein, via les voies de signalisation NF- κ B et Wnt/ β -caténine (Kampo *et al.*, 2019). Une analyse électrophysiologique avec les canaux Nav a révélé que la rBmK AGAP a inhibé les courants des canaux Nav1.8 et a déplacé le seuil d'activation et d'inactivation voltage-dépendant vers des valeurs plus négatives. Elle a également réduit les courants des canaux Nav1.9, mais n'a pas eu d'effet significatif sur les cinétiques d'activation et d'inactivation (Li and Kuemmerle, 2016). D'autre part, il a été démontré que la rBmK AGAP affecte le courant Na⁺ en inhibant l'expression de l'ARNm de Nav1.5, ce qui entraîne une régulation négative de l'activation du canal. Les activités du canal Nav1.5 ainsi que de l'isoforme Nav1.7 se sont avérées être particulièrement impliquées dans les processus de migration et d'invasion des cellules cancéreuses (Mycielska *et al.*, 2003 ; Roger *et al.*, 2003 ; Diss *et al.*, 2005 ; Fraser *et al.*, 2005 ; Onganer and Djamgoz, 2005).

Les travaux de Fraser *et al.* (2000) ont montré que l'application de la Tétridotoxine (TTX) à 6 μ M bloque complètement l'activité des canaux Nav exprimés dans la lignée cellulaire du cancer de la prostate fortement métastatique MAT-LyLu. Cependant, ce blocage n'a eu aucun effet sur la prolifération des cellules MAT-LyLu ni des cellules de la lignée cellulaire AT-2 de cancer prostatique faiblement métastatique de rat. En revanche, la Vératridine (10-50 μ M), une molécule qui ralentit l'inactivation des canaux Nav, ce qui conduit à une activation persistante

de ces canaux, réduisait significativement (jusqu'à 30%), la prolifération des deux lignées cellulaires (Black and Waxman, 2013).

Au regard de plusieurs études (Fraser *et al.*, 2000 ; Schiavon *et al.*, 2006 ; Gu *et al.*, 2013 ; Kampo *et al.*, 2019) mettant en évidence les différents effets des toxines de scorpions qui ciblent les canaux sodiques, sur l'évolution des cellules cancéreuses, l'hypothèse que la prolifération des cellules tumorales et/ou la mort cellulaire sont étroitement liées au flux de Na^+ suite à l'ouverture des canaux Nav , a été établie et deux scénarios ont été proposés (Srairi-Abid *et al.*, 2019). Le premier stipule qu'une fois le peptide de scorpion a interagi avec le canal Nav , la dépolarisation membranaire est maintenue suite au flux continu d'ions Na^+ . Cet événement empêche le retour à la repolarisation dans la phase G0/G1 notamment dans les cellules excitables et quelques lignée cellulaire (Lansu and Gentile, 2013), altérant ainsi les points de contrôle clés du cycle cellulaire (Marino *et al.*, 1994 ; Rao *et al.*, 2015) et par conséquent la prolifération cellulaire (**Figure 3**).

Le deuxième scénario suggère que les concentrations intracellulaires élevées de Na^+ jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la taille des cellules et la mort cellulaire apoptotique (Banasiak *et al.*, 2004). Plusieurs travaux montrent que l'effet des peptides de scorpions sur les Nav pourrait impliquer un mécanisme d'acidification du cytoplasme cellulaire similaire à celui de la Vératridine (Erecinska and Dagani, 1990). En effet, il est connu que les Nav régulent les concentrations intracellulaires de H^+ (Gaete *et al.*, 1991 ; Michael *et al.*, 2007). Bien qu'il soit encore peu exploré, il a été suggéré toutefois que ce mécanisme est étroitement lié à la glycolyse (Srairi-Abid *et al.*, 2019). En outre, il a été démontré que l'activité de la Vératridine est corrélée à une augmentation de la respiration cellulaire et la production de lactate dans la cellule (Erecinska and Dagani, 1990). Afin de rétablir le potentiel de repos, la cellule fait intervenir la pompe Na^+/K^+ ATPase pour retrouver les concentrations physiologiques de Na^+ et de K^+ dans le cytoplasme. Ces protéines membranaires fonctionnent d'une façon active et ont besoin d'ATP fourni par les voies de la glycolyse aérobie et anaérobie, ce qui induit en retour une élévation de la concentration intracellulaire de H^+ .

Par conséquent, l'activation du canal conduit à l'acidification de l'intérieur de la cellule qui à son tour active les échangeurs Na^+/H^+ . La concentration de Na^+ va donc augmenter dans le cytoplasme et un déséquilibre des concentrations en ions K^+ , Ca^{2+} et Na^+ sera créé. L'effet de cette dérégulation pourrait activer la voie des caspases conduisant à l'apoptose cellulaire (**Figure 3**) (Park *et al.*, 1999 ; Koike *et al.*, 2000). Cependant, il n'existe toujours pas de preuves solides qui montrent l'implication de la voie d'entrée du Na^+ dans l'activation des caspases

(Bortner and Cidlowski, 2003 ; Jordan *et al.*, 2003 ; Banasiak *et al.*, 2004 ; Kondratskyi *et al.*, 2015).

Ainsi, les peptides de scorpions agissent en perturbant des événements cellulaires impliqués dans l'homéostasie de la cellule. Néanmoins, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour élucider et clarifier plus précisément le mécanisme d'action de ces peptides. Jusqu'à présent, seuls quelques toxines de type NaScTx ont été testées sur des lignées tumorales telles que les toxines Cn2, rBmK AGAP, BmK AGAP-SYPU2, alors que de nombreux autres NaScTx pourraient être des candidats intéressants pour des applications en thérapie anticancéreuse.

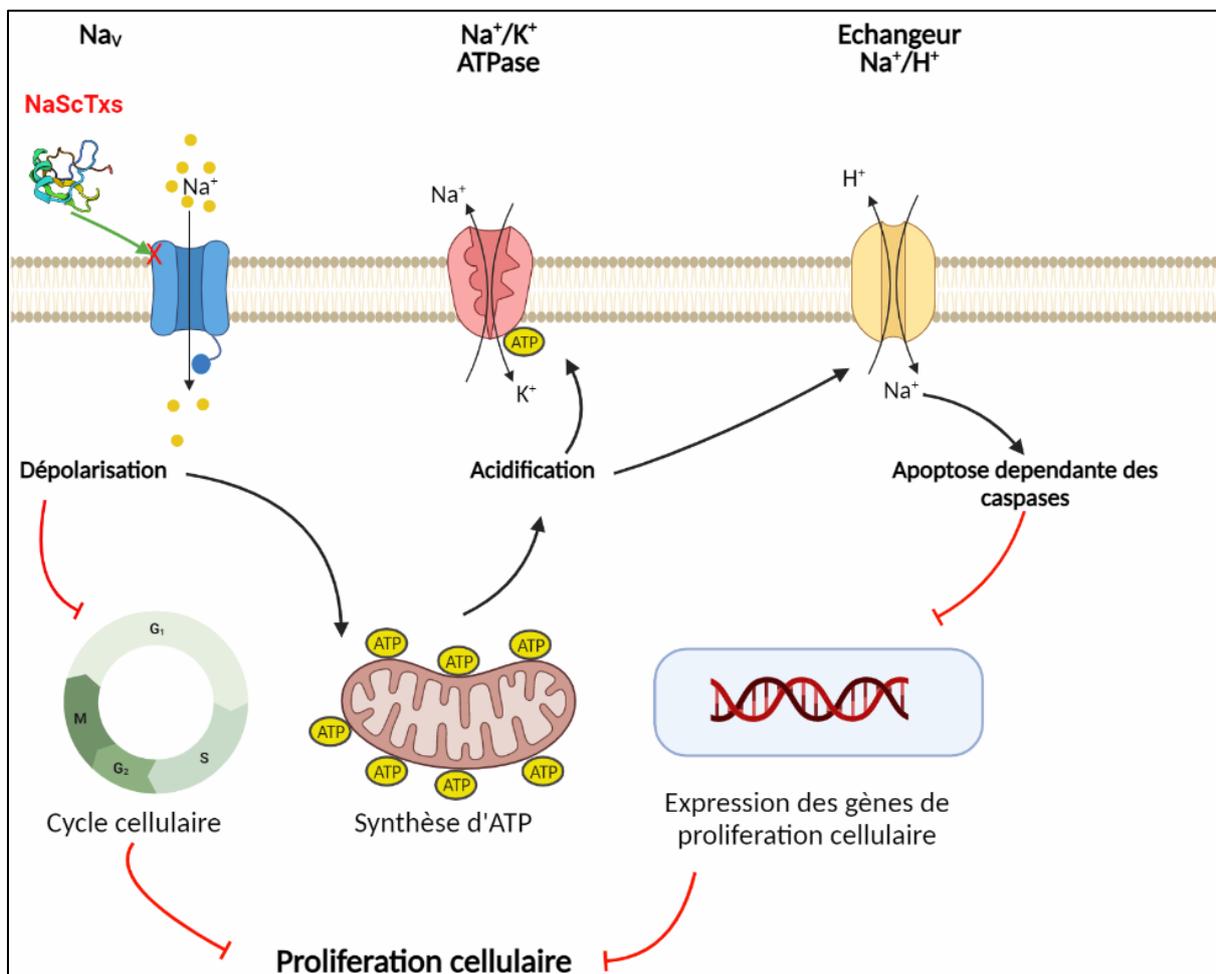


Figure 3 : Modulation de la prolifération cellulaire et l'apoptose par les NaScTx (Schéma réadapté à partir de l'article (Srairi-Abid *et al.*, 2019))

5.2. Toxines de scorpions ciblant les canaux potassiques dans le cancer

De nombreuses toxines de scorpions ciblant plusieurs types et isoformes de canaux potassiques sont révélées capables d'inhiber différents processus du cancer. Plus intéressant encore, certaines d'entre elles ont permis d'élucider le rôle fonctionnel des canaux potassiques dans les étapes de la progression néoplasique de différentes lignées cellulaires cancéreuses.

KAaH1 et KAaH2 sont deux peptides homologues issus du venin de scorpion *Androctonus australis Hector* (Srairi-Abid *et al.*, 2005) qui bloquent différemment les sous-types $K_v1.1$ et $K_v1.3$ du canal potassique voltage-dépendant. Ces peptides modulent aussi les processus cellulaires dans trois lignées cellulaires cancéreuses. Le KAaH1, actif sur les sous-types $K_v1.1$ et $K_v1.3$, est capable d'inhiber l'adhésion et la migration des cellules de glioblastome (U87), de cancer du sein (MDA-MB-231), et de l'adénocarcinome du côlon (LS174) (Aissaoui *et al.*, 2018b). Le KAaH2 qui cible le canal $K_v1.1$, inhibe la prolifération des cellules U87 via la voie de signalisation EGFR (Aissaoui *et al.*, 2018b). Cet effet antiprolifératif de KAaH2, pourrait être expliqué par son interaction directe avec l'EGFR ou via un canal potassique autre que les canaux $K_v1.1$ et $K_v1.3$ (Aissaoui *et al.*, 2018b). C'est le cas du canal $K_v11.1$, considéré comme un candidat potentiel pour une thérapie anticancéreuse puisque qu'il est capable de former un complexe multimérique avec l'EGFR (Wu *et al.*, 2012). A l'échelle structurale, cette interaction entre $K_v11.1$ et EGFR est basée sur des réactions de phosphorylation/déphosphorylation au niveau du Tyr475 situé sur la boucle intracellulaire S2-S3 du canal (Zhang *et al.*, 2008).

D'autres part, l'effet de KAaH1 sur l'adhésion et la migration des cellules cancéreuses pourrait être dû à la régulation de l'activité des intégrines par les canaux potassiques. En effet, Arcangeli *et al.* ont suggéré l'existence d'une communication entre les intégrines de surface cellulaire et les canaux potassiques (Arcangeli and Becchetti, 2006). C'est le cas du canal $K_v1.3$ qui constitue un complexe macromoléculaire avec la sous-unité $\beta 1$ du récepteur de l'intégrine. L'interaction du canal K_v -intégrine a également été démontrée en utilisant des bloqueurs du canal K_v qui affectent l'interaction du canal $K_v1.3$ avec l'intégrine $\beta 1$ et inhibent l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire médiée par l'intégrine (Artym and Petty, 2002).

D'autre part, la Margatoxine (MgTx), un bloqueur de $K_v1.3$ issu du venin de *Centruroides margaritatus*, est capable d'inhiber de manière significative la prolifération des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain ce qui a réduit le volume de la tumeur chez la souris (Jang *et al.*, 2011). De manière intéressante, l'inhibition de $K_v1.3$ a augmenté le niveau d'expression de $p21^{Waf1/Cip1}$ tout en diminuant l'expression de Cdk4 et de la cycline D3, pour

induire un arrêt du cycle cellulaire en bloquant la transition de la phase G1 à S (Jang *et al.*, 2011). L'effet antitumoral *in-vivo* de la MgTx a également été confirmé dans un modèle de mélanome orthotopique utilisant des cellules B16F10 (Leanza *et al.*, 2012). Bien que différentes études se soient focalisées sur l'implication de Kv1.3 dans la régulation de la prolifération cellulaire, plusieurs autres publications ont suggéré que le mécanisme peut également être extrapolé pour d'autres sous-types de canaux Kv (Urrego *et al.*, 2014).

Comme les canaux Kv, les canaux potassiques activés par le calcium (K_{Ca}) ont été étudiés pour leurs implications dans la modulation des processus tumoraux. En effet, l'Ibériotoxine (IbTx), une toxine de scorpion qui inhibe le canal potassique activé par le calcium à grande conductance (BK_{Ca}), réduit la prolifération des cellules de gliome en bloquant le cycle cellulaire en phase S et en diminuant la synthèse de l'ADN (Weaver *et al.*, 2004). Il est admis que l'équilibre des concentrations de Ca²⁺ entre les compartiments intracellulaire et extracellulaire doit être assuré par la cellule afin de maintenir l'activation des mécanismes de la prolifération cellulaire (Kischel *et al.*, 2019). Les canaux Kv et K_{Ca} sont des acteurs cruciaux dans ce processus en régulant les concentrations d'ions K⁺ intracellulaires de manière à préserver la force électromotrice nécessaire à l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule (Lam and Wulff, 2011). D'autre part, il a également été rapporté que l'Ibériotoxine (IbTx) et la Charybdotoxine (CTx), bloqueurs des canaux K_{Ca}, inhibent la prolifération et la migration des cellules de gliome et de mélanome, respectivement (Schwab *et al.*, 1999 ; Lam and Wulff, 2011). La CTx a inhibé la migration des cellules épithéliales rénales transformées (MDCK-F) en induisant une perturbation du volume cellulaire, des filaments d'actine et du [Ca²⁺]_i (Schwab *et al.*, 1999). Un effet similaire est obtenu avec la migration des cellules microgliales stimulées par l'acide lysophosphatidique (LPA) (Noda *et al.*, 2006).

Tous ces travaux montrent que l'inhibition des canaux potassiques par les KTx du venin de scorpion pourraient cibler différentes voies de signalisations cellulaires ce qui peut impacter drastiquement l'ensemble des processus cellulaires au niveau de cellules cancéreuses. (**Figure 4**). L'effet sur la prolifération cellulaire pourrait être dû à la perturbation des mécanismes liés à l'homéostasie du K⁺ qui dépendent de la régulation du potentiel électrique de membrane. Mais il existe également d'autres voies de signalisations qui sont déclenchées par l'interaction avec le canal potassique impliquant le récepteur EGFR, les intégrines ainsi que les filaments d'actine. Il pourrait y avoir aussi d'autres cibles affectées par l'activité des peptides de scorpions qui pourraient également interagir avec les toxines à l'échelle moléculaire.

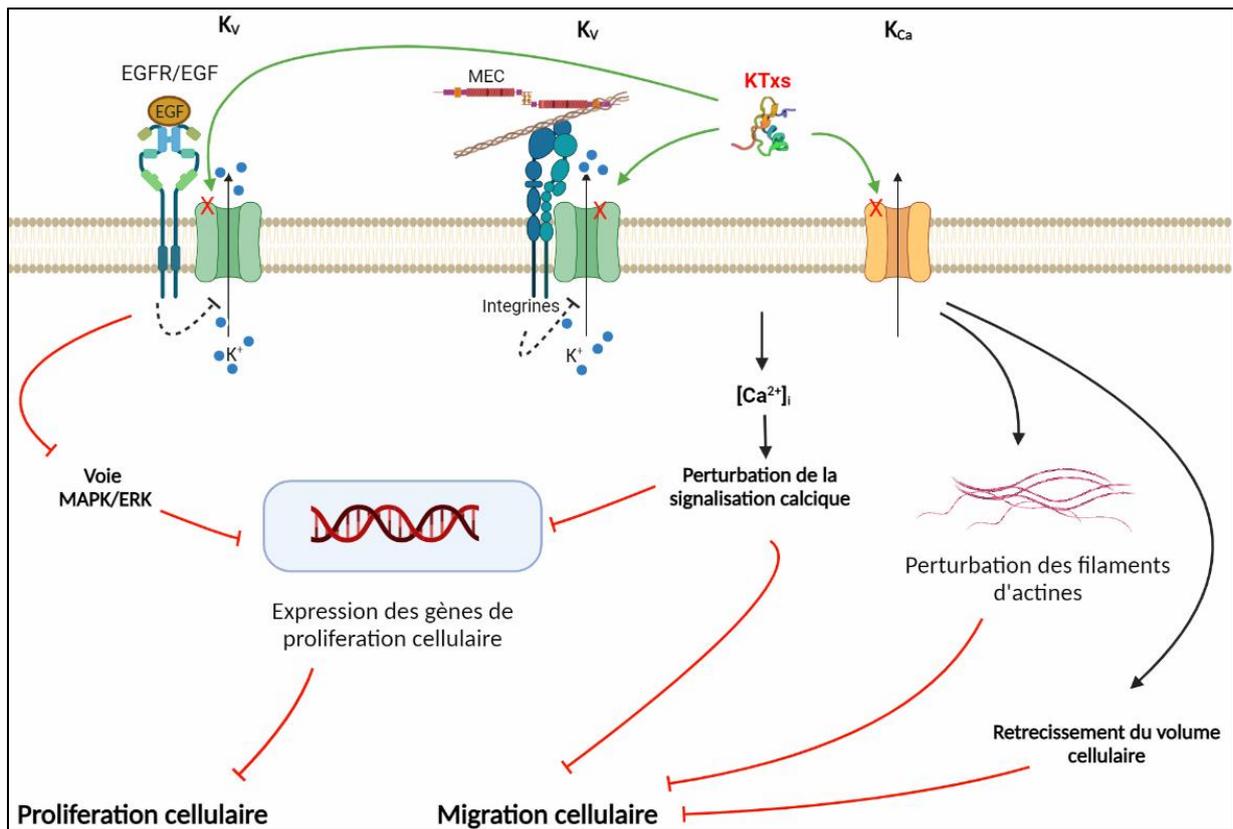


Figure 4 : Modulation de la prolifération et la migration cellulaire par les KTxs (Schéma réadapté à partir de l'article (Srairi-Abid *et al.*, 2019))

5.3. Toxines de scorpions ciblant les canaux chlorure dans le cancer

Dans la même démarche de recherche de peptides anticancéreux et d'une façon plus intéressante certaines toxines ciblant les canaux chlorure ont été caractérisées et les résultats semblent être très prometteurs. Etant le premier exemple de toxines de scorpions à effet antitumoral rapporté dans la littérature, la Chlorotoxine (ClTx) réduit l'expression du canal CLC-3 dans les cellules de gliome et retarde la migration et l'invasion des cellules tumorales *in-vitro* et *in-vivo* (Ullrich *et al.*, 1998 ; Soroceanu *et al.*, 1999). Il a été démontré que cet effet antitumoral est directement lié à la diminution du volume cellulaire (Sontheimer, 2008 ; Restrepo-Angulo *et al.*, 2010) (**Figure 5**). Ainsi, la ClTx est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et se lie aux cellules tumorales malignes du cerveau sans affecter les tissus sains. Des essais *in-vivo* ont déjà montré que la ClTx marquée à l'iode 125 et 131 (Chlorotoxin-¹³¹I/¹²⁵I) a la capacité de se lier spécifiquement aux cellules tumorales, faisant de ce peptide un candidat prometteur dans le traitement par radiothérapie des tumeurs cérébrales post-chirurgicales (Hockaday *et al.*, 2005 ; Mamelak *et al.*, 2006), ainsi que des tumeurs des reins et de l'estomac (Shen and Sali, 2006).

la CITx conjuguée à des nanoparticules a également été utilisée comme vecteur pour charger des médicaments anticancéreux dans la chimiothérapie ou encore dans le cadre de la thérapie génique du gliome (Cohen-Inbar and Zaaroor, 2016). De plus, la CITx favorise l'efficacité et augmente la biodisponibilité de certaines chimiothérapeutiques tels que la Doxorubicine (Xiang *et al.*, 2015) et le Cisplatine (Graf *et al.*, 2012). Depuis 2007, la version synthétique de la CITx a atteint la phase III des essais cliniques, sous le nom de TM-601 (Schilling *et al.*, 2004).

Dans la même démarche, de nombreuses études ont montré l'effet thérapeutique potentiel d'autres toxines de scorpions ciblant le canal chlorure notamment dans le cas des gliomes. Ainsi, il a été démontré que la rBmK-CTa (ou Bm12b) inhibe la croissance des cellules SHG 44 de gliome humain de manière dose-dépendante avec une $IC_{50} = 0,28 \mu M$ (Fu *et al.*, 2007). Dans les mêmes conditions, l' IC_{50} augmente jusqu'à $8 \mu M$, dans les astrocytes normaux, indiquant clairement l'effet spécifique de rBmK-CTa vis à vis des cellules SHG 44 de gliome (Fu *et al.*, 2007). D'une façon similaire, les toxines BmK-CT (Bm12) et Gst BmKCT sont capables de réduire la conductance des courants Cl^- et les métastases des cellules de gliome (Fan *et al.*, 2010). D'autres part, la AaCtx native issue du venin de scorpion *Androctonus australis* a inhibé l'invasion et la migration des cellules de gliome humain U87 avec une $IC_{50} = 125 \mu M$ (Rjeibi *et al.*, 2011). Ce peptide présente 70% de similarité de séquence avec la CITx.

Comme c'est le cas de toutes les autres familles de toxines, les toxines agissant sur les canaux chlorure modulent différemment les processus cellulaires. Cette différence est directement liée au canal ou à la voie de signalisation ciblée. En effet, la CITx et la AaCtx sont actives sur les processus de migration et d'invasion des cellules de gliome alors que la rBmK-CTa inhibe uniquement leur prolifération. A l'échelle structurale, des études de co-localisation réalisées sur l'interaction de la CITx avec les cellules de gliome ont suggéré que le récepteur de la CITx correspond à un complexe protéique impliquant la métalloprotéinase-2 (MMP-2) et le canal chlorure CLC-3 (Deshane *et al.*, 2003). La liaison de la CITx à la surface de la cellule tumorale entraîne l'endocytose de ce complexe (Ullrich *et al.*, 1996) ce qui explique l'action irréversible de ce peptide ainsi que son mécanisme d'action relativement lent (Cuddapah *et al.*, 2014). La MMP-2 est impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire tandis que le canal CLC-3 est impliqué dans le mécanisme de réduction du volume cellulaire (Cuddapah *et al.*, 2014). Ainsi, la MMP-2 et le CLC-3 ont été proposés comme les cibles moléculaires principales des peptides de scorpions ciblant les canaux chlorure (Xu *et al.*, 2016). D'autres études ont montré que CITx interagissait avec l'isoforme MMP-2 et non avec les MMP-1, 3 et 9 (Deshane *et al.*, 2003 ; El-Ghlban *et al.*, 2014). Bien que la co-localisation de MMP-2 et de CLC-3 soit

confirmée (Qin *et al.*, 2014), l'hypothèse qui stipule qu'il existe une interaction physique ou une signalisation croisée entre les deux protéines reste encore à démontrer (**Figure 5**). D'un point de vue fonctionnel, la CITx a une double activité sur la MMP-2. En effet, il a été rapporté que la CITx est capable de réduire l'expression de MMP-2 à la surface des cellules par endocytose et d'inhiber son activité enzymatique (Deshane *et al.*, 2003 ; Lui *et al.*, 2010). Une analyse *in-silico* a suggéré l'implication potentielle d'un mécanisme d'inhibition non-compétitif de la CITx sur la MMP-2. Ce modèle est soutenu par des résultats expérimentaux antérieurs relatifs à l'interaction de CITx avec un complexe supramoléculaire qui inclut MMP-2 parmi d'autres macromolécules en l'occurrence les intégrines (Brooks *et al.*, 1996 ; Othman *et al.*, 2017).

Récemment, la découverte que la MMP-9 est capable de cliver la boucle extracellulaire S5-S6 du domaine II du Nav1.7 pour modifier la signalisation de la douleur a ouvert des nouvelles pistes sur un mécanisme similaire pour réguler la progression du cancer (Remacle *et al.*, 2015). De manière remarquable, deux dérivés de la CITx, nommés la CA4 et la CTX23, se sont avérés capables d'inhiber la prolifération de lignées cellulaires de gliome alors qu'aucun canal cationique n'a été identifié comme l'une de leurs cibles (Xu *et al.*, 2016). Ces peptides sont également efficaces pour bloquer la formation de tubes endothéliaux et réduire l'angiogenèse tumorale *ex-vivo* (Xu *et al.*, 2016).

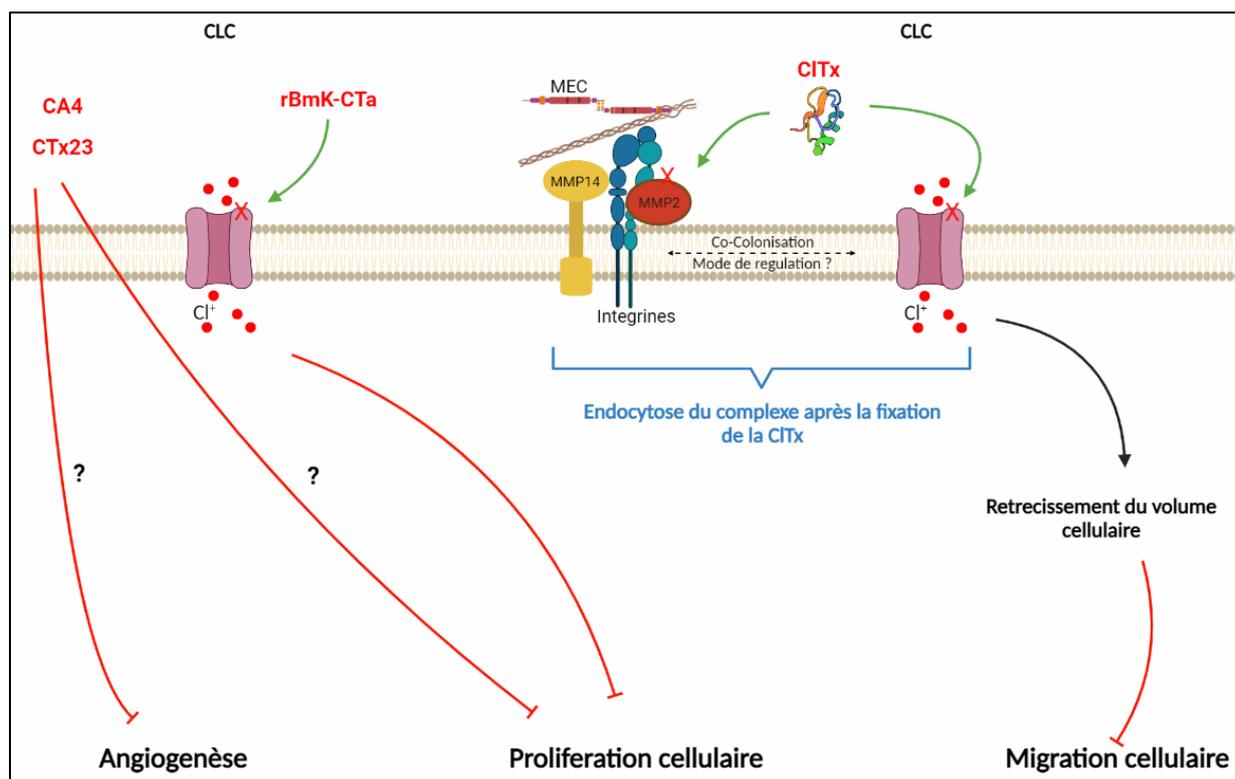


Figure 5 : Modulation des processus tumoraux par les CITxs, exemple de la CITx, rBmK-CTa, CA4 et CTx23 (Schéma réadapté à partir de l'article (Srairi-Abid *et al.*, 2019))

5.4. Toxines de scorpions ciblant les canaux calciques dans le cancer

Le calcium est considéré comme un second messager ubiquitaire qui régule plusieurs processus et fonctions cellulaires, tels que la survie, la prolifération, la migration ou l'apoptose. Au cours des dernières années, les acteurs de la signalisation calcique ont prouvé leurs implications potentielles dans le développement du cancer et aussi vis-à-vis de son traitement (Gautier *et al.*, 2019 ; Kischel *et al.*, 2019). Actuellement, peu de toxines de scorpions ont été identifiées comme modulateurs des canaux calciques dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse, néanmoins, quelques toxines de scorpions ont la possibilité d'interagir activement avec ces protéines. En effet, la Maurocalcine (MCA), l'Imperatoxin A (IpTxA), l'Hemicalcin (HCA) et l'Hadrucalcine (HdCa) issues des venins de scorpions *Scorpio maurus palmatus*, *Pandinus imperator*, *Hemiscorpius lepturus* et *Hadrurus gertschi* respectivement, sont capables de moduler l'activité du canal RyR1 de manière similaire au peptide synthétique de la boucle II-III du canal Cav1.1 (el-Hayek *et al.*, 1995 ; Altafaj *et al.*, 2005 ; Shahbazzadeh *et al.*, 2007 ; Schwartz *et al.*, 2009). Ainsi, l'interaction de ces toxines avec le canal RyR mime les caractéristiques moléculaires de l'interaction de la boucle II-III du Cav1.1 avec le canal RyR et

cela malgré la faible similitude de séquences (qui ne dépasse pas les 18%) et de structures entre les toxines et ce peptide.

L'effet de la MCa et de l'IptxA sur le RyR implique leur pénétration dans la cellule (Esteve *et al.*, 2005 ; Ram *et al.*, 2008 ; Gurrola *et al.*, 2010). Il a été rapporté que le complexe fluorescent MCa-biotine/streptavidine-cyanine 3 était capable de transloquer à travers la membrane plasmique de plusieurs types de cellules sans l'utilisation de l'énergie cellulaire ni de l'implication d'un mécanisme d'endocytose (Esteve *et al.*, 2003 ; Esteve *et al.*, 2005). Ces travaux suggèrent une translocation passive et rapide (1 à 2 minutes) de la MCa. Cette propriété est similaire à celle des peptides pénétrants dans les cellules, qui peuvent se transloquer vers le cytoplasme cellulaire en interagissant avec les phospholipides. La séquence de base conservée « KKCKRR » dans les toxines MCa, HCa et IpTxA semble jouer un rôle important non seulement dans l'activation des canaux RyR1, mais aussi dans l'interaction avec la membrane lipidique (Mabrouk *et al.*, 2007 ; Xiao *et al.*, 2016). La propriété de pénétration cellulaire de MCa a conduit à son utilisation comme vecteur de médicaments pour surmonter la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie et pour augmenter l'effet de ces molécules (Aroui *et al.*, 2009). Il a été montré que MCa permettait de délivrer de manière non perméable de la Doxorubicine, un antibiotique utilisé comme médicament anticancéreux et de surmonter la résistance à la chimiothérapie de la lignée cellulaire du cancer du sein MDA-MB231 (Aroui *et al.*, 2009). De plus, le conjugué platine-Maurocalcine (Pt-1-DMCa) induit l'apoptose des cellules de glioblastome humain en induisant un stress oxydatif intracellulaire et des dommages de l'ADN et conduit à une phosphorylation accrue de p53 et à une déphosphorylation de pAKT et pERK (Aroui *et al.*, 2015 ; Aroui *et al.*, 2016). Bien qu'il ait été démontré que la conjugaison de MCa renforce l'activité antitumorale de certains agents chimiothérapeutiques, aucune étude n'a validé l'effet anticancéreux d'une toxine de cette famille lorsqu'elle est utilisée seule.

D'une façon similaire, d'autres toxines de scorpions ont été rapportées comme pouvant interagir avec les canaux calciques. C'est le cas de la Tetrapandine-2, une toxine issue de venin de *Pandinus imperator* qui montre une activité inhibitrice du canal TRPC3 dans les cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293) (Shalabi *et al.*, 2004). Le même processus se reproduit avec la toxine BmP01 de *Mesobuthus martensii* qui cible le canal TRPV1 (Hakim *et al.*, 2015). Cependant, l'effet anti-tumoral de ces peptides n'a jamais été montré.

Etant donné la diversité des peptides de scorpions, il est évident que certains d'entre eux agissent via des voies de signalisations différentes pour avoir un même effet cellulaire final (**Figure 6**). Il sera alors très pertinent de développer des compositions anti-cancéreuses à base d'un mélange de plusieurs peptides dans le but de cibler plusieurs voies de signalisations.

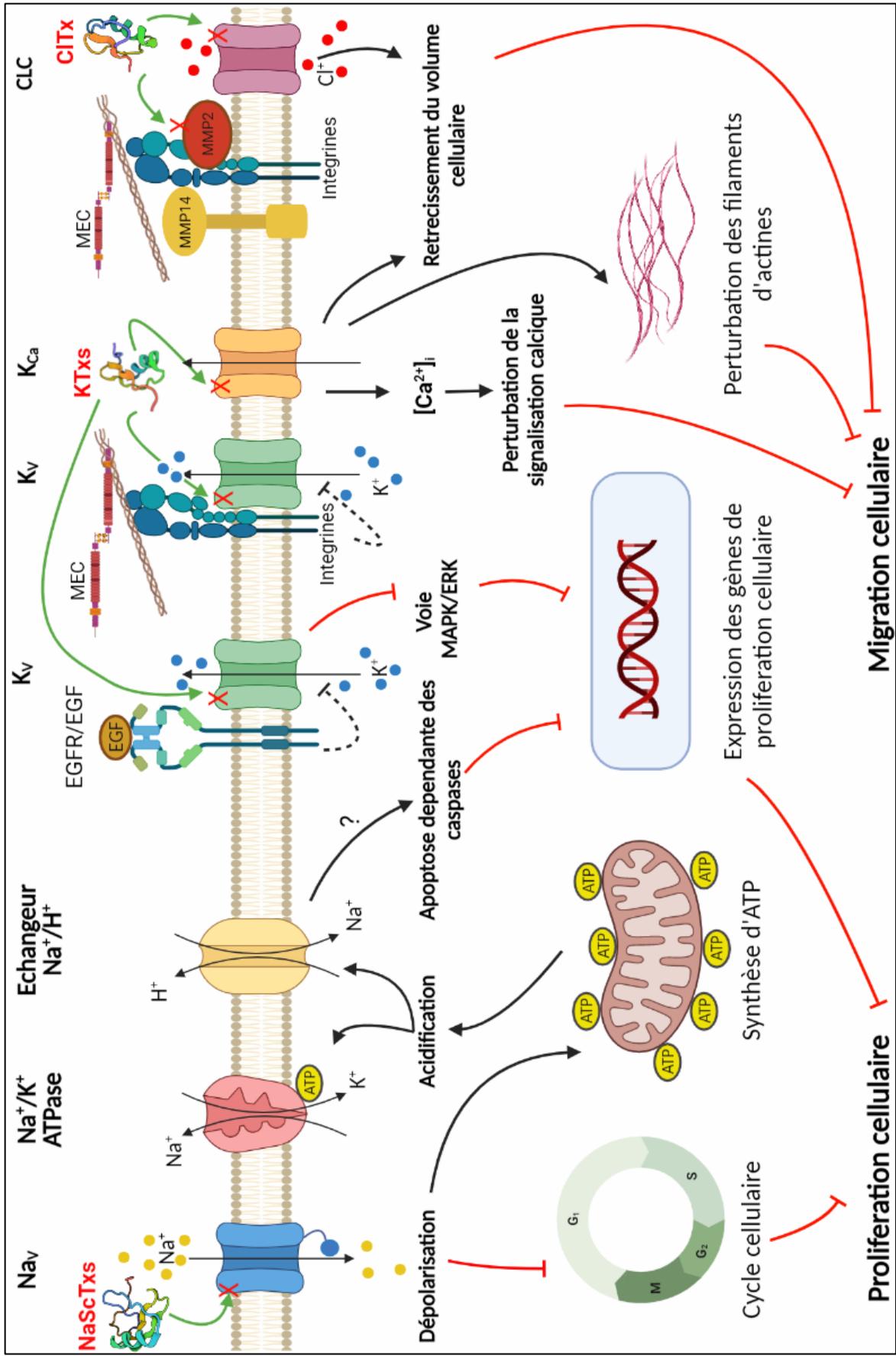


Figure 6 : Modulation des processus cellulaires par les toxines de scorpions

Chapitre 2 : Canaux sodiques et toxines de scorpions

1. Les gènes des canaux Nav

Au cours de l'évolution, le canal sodique à quatre domaines, spécifique des organismes multicellulaires a été le dernier à apparaître parmi les canaux ioniques voltage dépendant. Il est suggéré que les canaux Nav ont évolué par deux séries de duplication de gènes à partir des canaux Nav bactériens ancestraux à un seul domaine, comme le NaChBac présent chez *Bacillus halodurans* (Ren *et al.*, 2001). Les gènes des canaux Nav codant pour des canaux à quatre domaines sont présents dans une grande variété d'espèces de métazoaires, dont la mouche, la sangsue, le calmar, la méduse et tous les vertébrés (Zakon, 2012). Les propriétés biophysiques, la pharmacologie, l'organisation des gènes et même les sites d'épissage des canaux sodiques des invertébrés sont largement similaires à ceux des mammifères, ce qui renforce l'idée que le canal sodique primordial a été établi avant l'évolution des vertébrés.

Les gènes et les protéines des canaux Nav de l'Homme, de la souris et du rat sont les mieux caractérisés. Neuf gènes de Nav apparentés sont présents chez les vertébrés (**Figure 7**) (Goldin *et al.*, 2000 ; Catterall *et al.*, 2005).

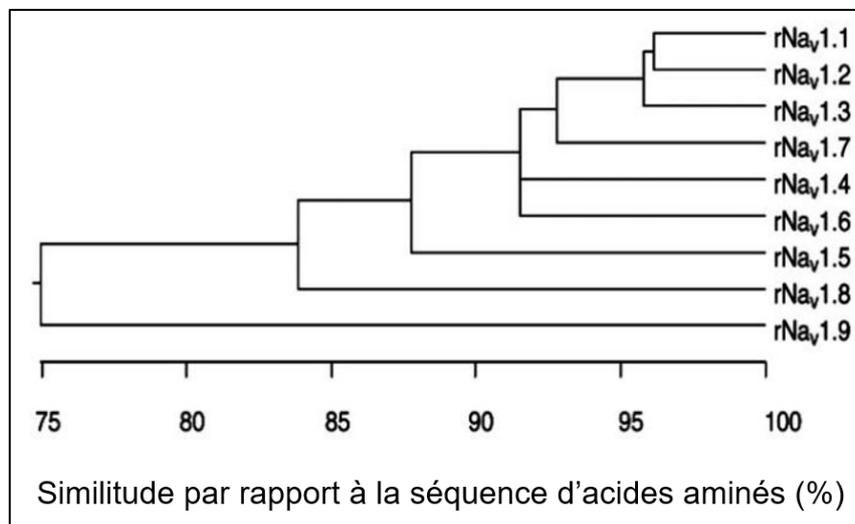


Figure 7 : Arbre phylogénétique des différentes isoformes des canaux Nav (Catterall, 2015)

Les gènes codant pour les canaux sodiques voltage-dépendants Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 et Nav1.7 sont localisés sur le chromosome 2 chez l'Homme et la souris. Ces canaux présentent des similitudes en termes de séquence, de caractéristiques biophysiques, de sensibilité à la

Tétradotoxine (TTX) et de large expression dans les neurones. Un deuxième groupe de gènes codant pour les canaux Nav1.5, Nav1.8 et Nav1.9 est localisé sur le chromosome 3 chez l'Homme et la souris. Bien que leur séquence soit identique à plus de 75 % à celle du groupe de canaux du chromosome 2, ces canaux Nav contiennent tous des substitutions d'acides aminés qui leur confèrent des degrés variables de résistance à la TTX. Dans le canal Nav1.5 qui est le principal isoforme cardiaque, un seul changement d'acide aminé de Phénylalanine en Cystéine dans la région du pore du domaine I est responsable d'une réduction de 200 fois de la sensibilité à la TTX par rapport aux canaux du chromosome 2 (Satin *et al.*, 1992). À la même position dans Nav1.8 et Nav1.9 il y a une Sérine, ce changement entraîne une résistance encore plus grande à la TTX (Sivilotti *et al.*, 1997). Ces deux canaux sont préférentiellement exprimés dans les neurones sensoriels périphériques. Par rapport aux canaux sodiques des chromosomes 2 et 3, le Nav1.4, est exprimé dans les muscles squelettiques et le Nav1.6 est très abondant dans le SNC. Ces deux isoformes présentent une identité de séquence de plus de 85 % et des propriétés fonctionnelles similaires, notamment une sensibilité à la TTX dans la gamme des concentrations des nano-molaires. Le Nav1.4 et Nav1.6 sont situés respectivement sur le chromosome humain 11 (chromosome 17 de la souris) et le chromosome humain 15 (chromosome 12 de la souris). Un dixième canal sodique, Nax, dont le gène est situé près des canaux Nav du chromosome 2, est plus éloigné du point de vue de l'évolution (Goldin *et al.*, 2000). Les différences clés dans les régions fonctionnellement importantes (capteur de tension et la porte d'inactivation) ainsi que l'absence d'expression fonctionnelle des courants sodiques voltage dépendant dans les cellules hétérologues suggèrent que Nax pourrait ne pas fonctionner comme un canal sodique voltage-dépendant. Conformément à cette conclusion, la délétion ciblée du gène Nax chez la souris entraîne des déficits fonctionnels dans la détection des niveaux de sel plasmatique mais pas dans l'excitabilité électrique (Watanabe *et al.*, 2000).

Les sous-unités β sont codées par quatre gènes distincts chez les mammifères (Isom *et al.*, 1992 ; Isom *et al.*, 1995 ; Morgan *et al.*, 2000 ; Yu *et al.*, 2003). Les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$ s'associent de manière non covalente avec les sous-unités α , tandis que $\beta 2$ et $\beta 4$ sont liées de manière covalente par un pont disulfure. Les quatre sous-unités β ont toutes un seul segment transmembranaire, un grand domaine extracellulaire N-terminal et un petit domaine C-terminal intracellulaire. L'importance des fonctions des sous-unités β est soulignée par les effets importants de la délétion des gènes codant pour Nav $\beta 1$ et Nav $\beta 2$, qui aboutit à des altérations de la myélinisation et de la conduction axonale, des crises d'épilepsie et une mort prématurée (Chen *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2004).

2. Caractéristiques des sous types des canaux Nav

À l'heure actuelle, neuf sous-types (isoformes) des canaux Nav ont été identifiés. Ils sont distingués en fonction de leur modèle d'expression, de leurs caractéristiques biophysiques et de leur pharmacologie. Pour éliminer la confusion, une nomenclature standardisée basée sur un système numérique pour définir les sous-types a été introduite (Goldin *et al.*, 2000). En raison de leur perméabilité hautement sélective aux ions Na⁺, de leur déclenchement par tension membranaire et de leurs caractéristiques de séquence et de fonctionnement similaires, la convention d'appellation acceptée pour ces sous-unités α est Nav1.1 à 1.9 (Goldin *et al.*, 2000).

Une classification fonctionnelle précoce basée sur la sensibilité au blocage par la tétrodothine a été établie (Narahashi, 1972 ; 1977). Plus précisément, les isoformes Nav qui répondent à de faibles concentrations nanomolaires de la TTX (Nav1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.6 et 1.7) sont caractérisées comme sensibles à la TTX (TTX-S), tandis que celles qui nécessitent des concentrations micromolaires de la TTX pour une inhibition significative (Nav1.5, 1.8, et 1.9) sont classées comme résistantes à la TTX (TTX-R) (Kostyuk *et al.*, 1981 ; Roy and Narahashi, 1992).

Les isoformes de Nav sont présents au niveau des cellules excitables et non excitables dans des populations distinctes et dans différents tissus, où ils jouent des rôles essentiels dans la physiologie cellulaire chez les mammifères. Dans les cellules non excitables telles que les astrocytes (Barres *et al.*, 1988), les microglies (Black *et al.*, 2009), les cellules β des îlots de Langerhans (Eberhardson and Grapengiesser, 1999), les gliales de Müller (O'Brien *et al.*, 2008), les ostéoblastes (Black *et al.*, 1995), les cellules de Schwann (Chiu *et al.*, 1984), les cellules cancéreuses (Diss *et al.*, 2001 ; Brackenbury and Djamgoz, 2006), les macrophages (Carrithers *et al.*, 2009), les cellules dendritiques (Zsiros *et al.*, 2009) et les kératinocytes (Zhao *et al.*, 2008), les Nav jouent différents rôles au niveau fonctionnel mais aussi dans la migration, la prolifération (Yang *et al.*, 2012) et les métastases des cellules (Prevarskaya *et al.*, 2018). En revanche, dans les cellules excitables, les Nav sont essentiels pour réguler l'excitabilité et le déclenchement des potentiels d'action. Par conséquent, les mutations de gain et de perte de fonction dans les isoformes des canaux Nav sont associées à un certain nombre de maladies ou "canalopathies", notamment l'épilepsie, la migraine, la paralysie périodique, les arythmies cardiaques, l'altération de la sensibilité à la douleur ainsi que le développement de certains cancers (Israel *et al.*, 2017 ; Prevarskaya *et al.*, 2018).

- **Localisation et pathologies associées au canal Nav1.1**

Le canal Nav1.1, connu aussi sous le nom de canal cérébral de type I est codé par le gène SCN1A. Ce canal est fortement exprimé dans tout le système nerveux central et périphérique, y compris dans les neurones ganglionnaires de la racine dorsale, principalement de grande taille d'où proviennent les fibres périphériques myélinisées. Dans le système nerveux central, le Nav1.1 est exprimé à la fois dans les corps cellulaires et les projections des cellules ganglionnaires de la rétine, des cellules granulaires dentées, des cellules de Purkinje du cervelet et des cellules pyramidales de l'hippocampe (2007). Le canal Nav1.1 est également exprimé dans les neurones de la moelle épinière, y compris 80 % des motoneurones. Notamment, le Nav1.1 est également fortement exprimé dans les cellules qui expriment les récepteurs GABA de type A inhibiteurs, provoquant une hyperexcitabilité globale (Cheah *et al.*, 2012). Par conséquent, les canalopathies du canal Nav1.1 conduisent à des crises épileptiques, qui vont d'un spectre d'épilepsie fébrile familiale légère avec des mutations de perte de fonction partielle à des conditions épileptiques dévastatrices telles que le syndrome de Dravet ou l'épilepsie généralisée avec des crises fébriles avec des phénotypes plus graves (Escayg *et al.*, 2000 ; Claes *et al.*, 2001 ; Mantegazza *et al.*, 2005).

- **Localisation et pathologies associées au canal Nav1.2**

Le canal Nav1.2, précédemment connu sous le nom de canal cérébral de type II, est l'isoforme des canaux Nav le plus exprimé dans le cerveau. Il se trouve principalement dans les axones des neurones du cortex, du thalamus, du pallidus global, de l'hippocampe et du Purkinje cérébelleux, ainsi que dans les cellules granuleuses (Westenbroek *et al.*, 1989). Au cours du développement, le canal Nav1.2 est progressivement remplacé par canal Nav1.6 dans les neurones myélinisés et en particulier au niveau des nœuds de Ranvier. L'expression du canal Nav1.2 chez l'adulte est observée principalement dans les neurones non myélinisés (Boiko *et al.*, 2001). Comme pour canal Nav1.1, les mutations du canal Nav1.2 sont associées aux crises épileptiques. Toutefois, la corrélation entre les effets fonctionnels sur le déclenchement du canal et les phénotypes cliniques sont moins décrit. (Heron *et al.*, 2002 ; Misra *et al.*, 2008).

- **Localisation et pathologies associées au canal Nav1.3**

Le canal Nav1.3 est présent à des niveaux élevés dans les neurones sensoriels primaires embryonnaires des rongeurs, mais seulement à des niveaux faibles chez les adultes (Waxman *et al.*, 1994). Il est intéressant de noter que l'expression du canal Nav1.3 revient dans les neurones sensoriels primaires adultes après une axotomie, ce qui suggère que le canal contribue à la pathogenèse de la douleur neuropathique (Waxman *et al.*, 1994 ; Berta *et al.*, 2008). Le « knockdown » du canal Nav1.3 par un oligodéoxynucléotide anti-sens, atténue l'allodynie mécanique dans le modèle de lésion constrictive chronique (LCC) mais pas dans le modèle d'allodynie mécanique induite (Hains *et al.*, 2004 ; Lindia *et al.*, 2005).

- **Localisation et pathologies associées au canal Nav1.4**

Le canal Nav1.4 est fortement présent dans le muscle squelettique, représentant plus de 90% des canaux Nav dans le tissu musculaire adulte et joue un rôle clé pour l'initiation et la propagation des potentiels d'action qui régulent la contractilité du muscle squelettique. Le canal Nav1.4, codé par le gène SCN4A, est le médiateur des potentiels d'action au niveau du sarcolemme et contribue également à la propagation des dépolarisations tout au long des membranes des tubules T (Simkin and Bendahhou, 2011). Conformément à son rôle physiologique important dans la contraction des muscles squelettiques, les mutations au niveau du canal Nav1.4 sont associées à au moins cinq canalopathies héréditaires, notamment la paralysie périodique hyperkaliémique, la paralysie périodique hypokaliémique, la paramyotonie congénitale, la myotonie aggravée par le potassium et le syndrome myasthénique congénital (Jurkat-Rott *et al.*, 2010).

- **Localisation et pathologies associées au canal Nav1.5**

Le canal Nav1.5, codé par le gène SCN5A est typiquement considéré comme un isoforme spécifique au cœur et représente la majorité des canaux dans les cardiomyocytes adultes. Conformément à son rôle clé dans la conduction de surface et la transmission intermyocytaire, le canal Nav1.5 est exprimé à la surface cellulaire avec en particulier une expression de haute densité au niveau des disques intercalaires, mais pas dans le système tubulaire transversal (Westenbroek *et al.*, 2013). L'expression du canal Nav1.5 est intimement impliqué dans la conduction du potentiel d'action cardiaque et par conséquent, les mutations sont associées à des

arythmies cardiaques, notamment le syndrome du QT long de type 3, le syndrome de Brugada, la cardiomyopathie dilatée et le syndrome du nœud sinusal (Liu *et al.*, 2016). Toutes ces canalopathies sont attribuables aux effets variés des caractéristiques biophysiques des canaux Nav1.5 mutants, qui peuvent entraîner une altération de la vitesse de conduction, de la propagation des impulsions et de la durée du potentiel d'action. Cependant, comme les comorbidités et des facteurs tels que l'âge, le sexe et la température peuvent influencer les symptômes cliniques, les associations génotype-phénotype ne sont pas toujours claires (Israel *et al.*, 2017).

- **Localisation et pathologies associées au canal Nav1.6**

L'isoforme Nav1.6 codé par le gène SCN8A a été découvert initialement dans les systèmes nerveux central et périphérique du rat où il est largement exprimé dans différents types de cellules, notamment les cellules de Purkinje, les motoneurones, les neurones pyramidaux et les neurones à granules, ainsi que dans les cellules gliales et les cellules de Schwann (Schaller *et al.*, 1995). Le canal Nav1.6 est fortement localisé au niveau des nœuds de Ranvier (les espaces entre la gaine de myéline qui permettent la conduction saltatoire) (Catterall, 2000). Par conséquent, dans le système nerveux périphérique, le plus haut niveau d'expression des canaux Nav1.6 se trouve dans les fibres A myélinisées (Fukuoka *et al.*, 2008), bien que des preuves émergentes indiquent que Nav1.6 est également exprimé dans les fibres non myélinisées (Black *et al.*, 2002). Plusieurs pathologies humaines associées à des mutations de Nav1.6 ont été décrites, telles qu'une atrophie cérébelleuse, une ataxie, une déficience intellectuelle, une dyskinésie, une encéphalopathie épileptique, ainsi qu'une névralgie du trijumeau (Trudeau *et al.*, 2006 ; Veeramah *et al.*, 2012 ; Gardella *et al.*, 2016 ; Tanaka *et al.*, 2016). Chez la souris, un variant d'épissage du canal Nav1.6 naturel conduisant à l'expression d'une protéine non fonctionnelle entraîne un trouble neurologique connu sous le nom de " maladie de la plaque motrice " (Burgess *et al.*, 1995). Ces travaux ont permis d'obtenir des informations cruciales sur le rôle physiologique du canal Nav1.6. En effet, le phénotype de ces animaux est caractérisé par une ataxie cérébelleuse et une atrophie musculaire due à la perte de l'innervation excitatrice du muscle conduisant à la mort juvénile (Kohrman *et al.*, 1995), ce qui a notamment mis en évidence la contribution importante du canal Nav1.6 dans le maintien des courants de résurgence des neurones de Purkinje (Raman *et al.*, 1997).

- **Localisation et pathologies associées au canal Nav1.7**

Le canal Nav1.7 codé par le gène SCN9A est exprimé préférentiellement dans le système nerveux périphérique, spécifiquement dans les ganglions sympathiques et dans les petits et grands neurones sensoriels (Sangameswaran *et al.*, 1997 ; Toledo-Aral *et al.*, 1997). Les données génétiques humaines fournissent des preuves irréfutables du rôle du canal Nav1.7 dans la douleur. Des mutations de perte de fonction de SCN9A, le gène codant pour Nav1.7, ont été identifiées comme la cause de l'insensibilité congénitale à la douleur, une condition rare caractérisée par l'incapacité de ressentir la douleur (Cox *et al.*, 2006 ; Goldberg *et al.*, 2007). En revanche, les mutations de gain de fonction de SCN9A sont à l'origine de deux troubles héréditaires de la douleur, l'érythromélgie héréditaire et le trouble paroxystique de la douleur extrême, qui sont associés à des rougeurs, des gonflements et des douleurs brûlantes (Yang *et al.*, 2004 ; Fertleman *et al.*, 2006). Par conséquent, les inhibiteurs sélectifs du sous-type Nav1.7 sont très recherchés comme analgésiques particulièrement prometteurs.

- **Localisation et pathologies associées au canal Nav1.8**

Le canal Nav1.8 caractérisé comme TTX-R et codé par le gène SCN10A est très similaire à l'isoforme Nav1.7 d'un point de vue génétique et physiologique. Il est principalement exprimé sur de petits neurones sensoriels périphériques non myélinisés, dont la plupart sont des nocicepteurs (Akopian *et al.*, 1996 ; Djouhri *et al.*, 2003). Le canal Nav1.8 joue un rôle important dans la douleur et la nociception. Ces dernières années, un certain nombre de mutations de gain de fonction du canal Nav1.8 conduisant à une neuropathie douloureuse des petites fibres ont été décrites (Han *et al.*, 2014 ; Dabby *et al.*, 2016). En conséquence, les inhibiteurs sélectifs de Nav1.8 sont étudiés en tant qu'analgésiques.

- **Localisation et pathologies associées au canal Nav1.9**

L'isoforme Nav1.9 codé par le gène SCN11A est un autre isoforme spécifique des neurones sensoriels. Il est parmi les isoformes de Nav les moins étudiés, en partie parce que les difficultés liées à l'expression hétérologue ont limité les études dans les lignées cellulaires de surexpression (Goral *et al.*, 2015). Le Nav1.9 est caractérisé par des propriétés biophysiques uniques, notamment une inactivation ultra lente (>100 ms) par rapport aux autres canaux Nav (<5 ms) et une activation à des potentiels de membrane hyperpolarisés (Dib-Hajj *et al.*, 2013). Le

courant persistant qui en résulte, bien que trop lent pour contribuer significativement à la montée d'un potentiel d'action, module l'excitabilité membranaire et régule ainsi le tir neuronal. Malgré l'absence d'inhibiteurs sélectifs du Nav1.9, des études génétiques fournissent des preuves d'un rôle clair dans la nociception où des comportements douloureux altérés ayant été signalés chez des souris délétées du gène de Nav1.9 ainsi que chez des humains présentant des mutations avec ou sans perte de fonction (Leo *et al.*, 2010 ; Huang *et al.*, 2014).

3. La structure des canaux Nav

Les canaux Nav sont composés d'une sous-unité α d'un poids moléculaire d'environ 260 kDa et d'une ou plusieurs sous-unités β accessoires plus petites d'un poids moléculaire de 33 à 37 kDa. Structuralement, la sous-unité $\beta 1$ se fixe sur les sous-unités α et $\beta 2$ par des liaisons non-covalentes tandis que la liaison entre les sous-unités $\beta 2$ et α se fait grâce à des liaisons disulfures. Les sous-unités β ont pour rôle principal la stabilisation du canal et cela grâce à leurs domaines extracellulaires sous forme d'un pli de type immunoglobuline, similaire à de nombreuses molécules d'adhésion cellulaire. Elles confèrent aux canaux Nav la possibilité d'interagir avec les protéines de la matrice extracellulaire, les molécules d'adhésion ainsi qu'avec des protéines régulatrices intracellulaires comme les protéines kinases et les phosphoprotéines phosphatases. Fonctionnellement, la co-expression des sous-unités β et α modifie la cinétique et la dépendance au voltage de l'activation et de l'inactivation du canal (Isom *et al.*, 1995 ; Srinivasan *et al.*, 1998 ; Morgan *et al.*, 2000 ; Yu *et al.*, 2003 ; Davis *et al.*, 2004 ; Brackenbury and Isom, 2011).

La sous-unité α est formée de quatre domaines homologues nommés de DI à DIV, chaque domaine contient six segments transmembranaires α -hélicoïdaux (S1-S6) (Noda *et al.*, 1984). Les segments transmembranaires sont reliés par de petites boucles intracellulaires et extracellulaires. D'autres boucles intracellulaires inter-domaine (ID) plus grandes relient les domaines homologues de la sous-unité (**Figure 8A**) (Yu and Catterall, 2003). Cette sous-unité est très importante dans la fonction du canal, notamment la sensibilité au voltage et la sélectivité ionique. Il a été démontré que les segments transmembranaires S4 de la sous-unité α sont chargés très positivement et jouent le rôle des « senseurs » de voltage dans les Nav, comme dans d'autres canaux ioniques voltage-dépendants (**Figure 8A**) (Noda *et al.*, 1984). Cette charge positive est conférée grâce à des résidus Arginine et Lysine chargés positivement à toutes les trois positions d'acides aminés. A l'état de repos les charges positives du segment S4 sont

neutralisées par l'interaction avec les charges négatives présentes dans les autres segments du même domaine. La conformation et la stabilité des segments S1-S4 est essentiellement assurée par les interactions des charges. La perturbation de la stabilité des charges dans cette région entraîne une modification de leur conformation (Vargas *et al.*, 2012). Par conséquent, les segments S1-S4 représentent le domaine sensible au voltage (VSD).

En plus de son rôle voltage-dépendant, la sous-unité α assure la sélectivité du canal, un autre déterminant structural critique de la fonction normale des canaux Nav. L'extrémité extracellulaire du pore est formée par des régions P hautement conservées entre les segments transmembranaires S5 et S6 des quatre domaines (DI-DIV) nommés aussi domaines du pore (DP) (Guy and Seetharamulu, 1986 ; Striessnig *et al.*, 1990 ; Terlau *et al.*, 1991). Les résidus d'acides aminés des anneaux extérieurs (EEDD : E403, E758, D1241, D1532) et intérieurs (DEKA : D400, E755, K1237, A1529) dans les régions P servent de filtre de sélectivité des ions (Terlau *et al.*, 1991).

En conformation 3D, le pore central des Nav est formé par les quatre régions P entourées par les quatre segments sensibles au voltage S4 formant un carré (**Figure 8B**). Les quatre domaines homologues sont organisés de manière à ce que chaque segment S4 interagisse le plus étroitement avec la boucle P du domaine voisin. Les quatre segments S6 se rejoignent à leurs extrémités intracellulaires pour former la porte d'activation (Payandeh *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2012 ; Shaya *et al.*, 2014).

En raison de son rôle crucial, la région du pore du canal est hautement conservée. Des études utilisant la mutagenèse dirigée dans les régions P formant le pore ont montré que ces mutations produisent une diminution marquée de la conductance des ions Na⁺ (Tomaselli *et al.*, 1995 ; Vilin and Ruben, 2001).

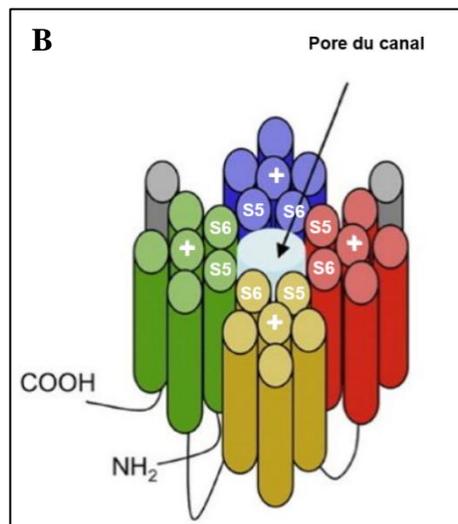
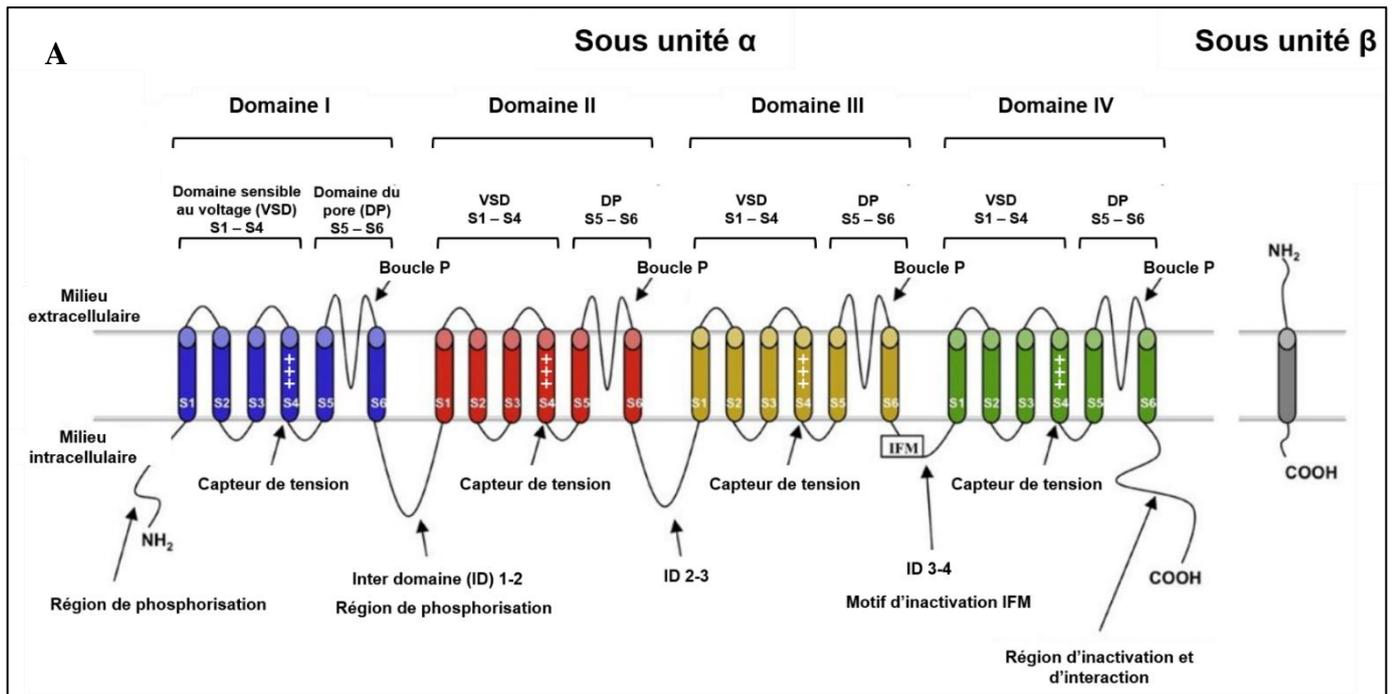


Figure 8 : Représentation schématique du canal Nav (Detta *et al.*, 2015)

4. Mode de fonction des canaux Nav

Le mode de fonctionnement des canaux Nav chez les eucaryotes passe par trois états distincts. L'état fermé (canal au repos), ouvert (canal activé) et inactivé (ouvert mais ne laisse pas passer les ions Na⁺). À l'état fermé et inactivé, les canaux sont imperméables aux ions Na⁺. Cependant la conduction ionique des Nav n'est possible qu'à l'état ouvert. Dans un modèle simplifié de Nav, la dépolarisation de la membrane provoque la transition du canal de l'état de repos (fermé) à l'état ouvert, permettant un flux d'ions Na⁺ du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire (Catterall, 2000). Après la dépolarisation et le flux d'ions qui s'ensuit, l'inactivation du canal arrête la conductance ionique, une condition préalable nécessaire au retour du potentiel de la membrane au niveau de repos (**Figure 9A et B**). Il est important de noter que certains peptides de venin de scorpion peuvent non seulement moduler la perméabilité ionique, mais aussi affecter la transition des canaux Nav entre ces états, ce qui entraîne divers effets fonctionnels, comme nous allons l'expliquer ultérieurement.

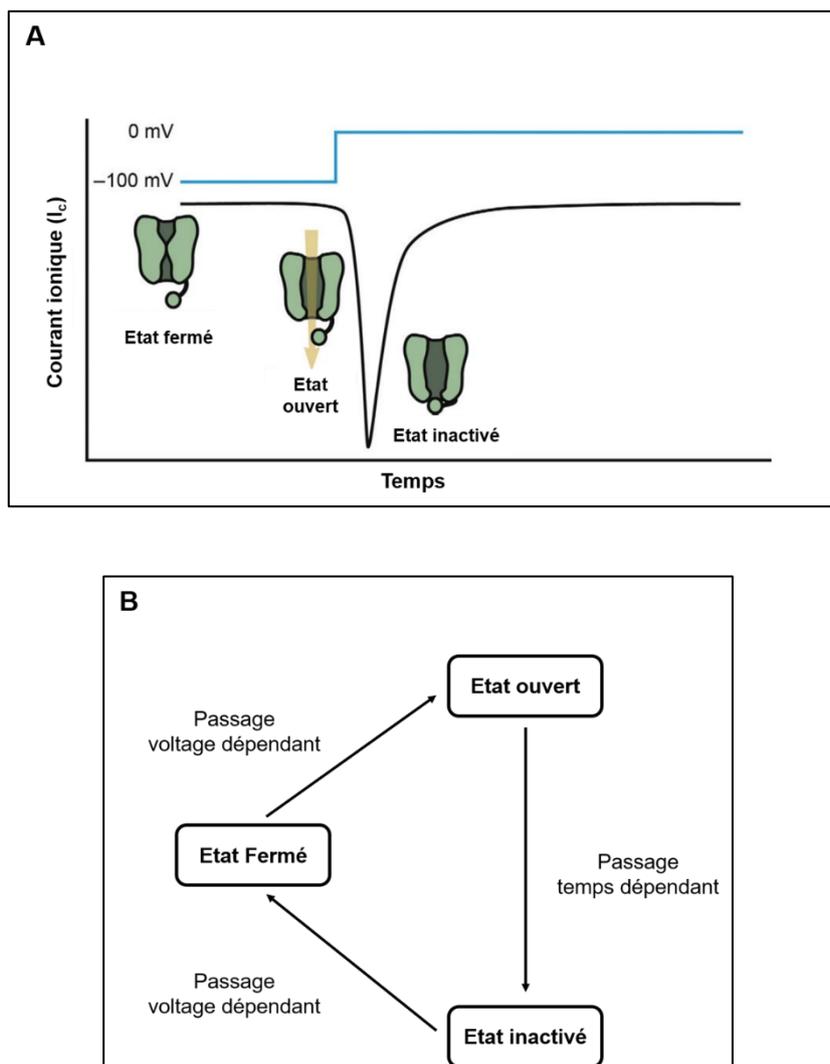


Figure 9 : Schéma fonctionnel des canaux Nav (A : source,(Israel *et al.*, 2017))

4.1. Activation des canaux Nav

L'activation voltage-dépendante des canaux Nav dépend essentiellement des segments transmembranaires S4 au niveau des domaines I à IV, qui contiennent chacun un motif répété constitué de résidus d'acides aminés chargés positivement et uniformément séparés par des acides aminés non polaires (Noda *et al.*, 1984 ; Catterall, 1986 ; Guy and Seetharamulu, 1986 ; Stuhmer *et al.*, 1989). Pendant la dépolarisation de la membrane, ces segments se déplacent vers la surface extracellulaire car les interactions neutralisantes de paires d'ions entre les charges positives du segment S4 et les charges négatives des régions transmembranaires adjacentes sont libérées (DeCaen *et al.*, 2008 ; DeCaen *et al.*, 2009). Le réarrangement conformationnel qui en résulte conduit à l'ouverture du pore via le mouvement des segments S5 et S6 et au flux d'ions

Na⁺. Ainsi, la neutralisation des charges positives dans les segments transmembranaires S4 des quatre domaines entraîne une altération du déclenchement de l'ouverture du canal (Stuhmer *et al.*, 1989 ; Kontis *et al.*, 1997).

4.2. Inactivation rapide des canaux Nav

Le processus d'inactivation est un passage dépendant du temps qui se manifeste entre l'état ouvert et l'état fermé et qui a pour but de favoriser la repolarisation de la membrane afin d'établir l'état de repos et assurer la disponibilité des canaux sodiques pour un nouveau stimulus (Ahern, 2013) (**Figure 9B**). L'inactivation rapide est le résultat de l'occlusion du pore par le motif d'inactivation cytosolique, constitué par un groupe de résidus hydrophobes, Isoleucine, Phénylalanine et Méthionine (IFM) dans la boucle intracellulaire reliant les domaines III et IV (Armstrong and Bezanilla, 1973 ; Goldin, 2003). Pendant le processus d'activation, le mouvement des capteurs de tension, en particulier du domaine IV, expose le site hydrophobe entre le segment S3 et S4. La liaison du motif IFM à ce site conduit à un blocage physique du mouvement des ions dans la cellule (Armstrong and Bezanilla, 1973) (**Figure 9A**). Comme les capteurs de tension des domaines I-III répondent plus rapidement à la dépolarisation de la membrane que le capteur de tension du domaine IV (Chanda and Bezanilla, 2002), l'inactivation se produit généralement après l'activation du canal. Par conséquent, le processus d'inactivation est intimement lié à l'activation du canal suite au mouvement du capteur de tension S4 du domaine IV.

Cependant, comme seulement le mouvement de deux segments S4 peut être suffisant pour qu'une liaison partielle du motif IFM puisse se faire (Armstrong, 2006), il est possible pour les canaux Nav de passer directement de l'état fermé (souvent appelé pré-ouvert dans ce cas) à l'état inactivé (Bähring and Covarrubias, 2011). Ceci a été observé dans des conditions expérimentales qui favorisent cinétiquement le développement de l'inactivation. De cette façon, le canal n'a pas besoin de s'ouvrir complètement avant d'être bloqué par la particule d'inactivation, ce qui conduit à un blocage du canal sous un état fermé. Il est intéressant de mentionner l'existence d'un autre type d'inactivation des canaux Nav qui est l'inactivation lente. Il s'agit d'un type distinct d'inactivation qui n'implique pas de mouvement du motif IFM d'inactivation. Ce type d'inactivation est caractéristique des canaux sodiques bactériens NaChBac (Ren *et al.*, 2001). Ces canaux sont formés d'une sous unité α qui contient un seul domaine complet (VSD et DP). L'absence du motif IFM fait que ces canaux sont incapables

d'établir une inactivation rapide pour revenir à l'état de repos (Ren *et al.*, 2001). Il est aussi important de mentionner que les canaux Nav des eucaryotes peuvent avoir une inactivation lente dans certaines conditions. En effet, lors des dépolarisations prolongées ou à haute fréquence, une inactivation lente peut se produire sur des échelles de temps, régulant ainsi l'excitabilité cellulaire en réduisant le nombre de canaux Nav disponibles pour l'activation. Contrairement à l'inactivation rapide, les canaux qui sont dans un état d'inactivation lente ont besoin de périodes de temps plus longues (100 ms à 10 s) pour se rétablir (Vilin and Ruben, 2001 ; Silva, 2014). L'inactivation lente encode la mémoire moléculaire de l'excitation précédente et contribue à l'adaptation du canal (Vilin and Ruben, 2001 ; Silva, 2014). Il est suggéré que l'inactivation lente résulte d'un changement de conformation du canal, très probablement associé à la région S4 du domaine IV et aux segments S6 qui forment le pore, ce qui fait que le pore n'est pas entièrement bloqué (Goldin, 2003 ; Payandeh *et al.*, 2012 ; Silva, 2014).

L'inactivation lente est cliniquement pertinente car les médicaments anesthésiques locaux, anti-arythmiques et anti-épileptiques ont une plus grande affinité pour les canaux Nav inactivés lentement (Vilin and Ruben, 2001 ; Silva, 2014). Des défauts subtils dans l'inactivation lente peuvent provoquer des maladies, notamment des mutations associées à la paralysie périodique et aux syndromes de Brugada (Vilin and Ruben, 2001).

5. Sites de fixation des neurotoxines sur les canaux Nav

Les neurotoxines agissent sur les canaux Nav en ciblant six sites de fixation différents qui se distinguent non seulement par la localisation du site de liaison de la toxine, mais aussi par les résultats de l'action de ces derniers (**Figure 10**). Outre que les 6 sites de fixation des neurotoxines, il existe deux autres sites de fixation des agents chimiques. Le premier étant le site de liaison des pyréthroïdes nommé aussi site 7 où certains agents insecticides comme le DDT et les pyréthroïdes peuvent se lier (Tan *et al.*, 2005). Le deuxième étant le site des anesthésiques locaux (AL) tels que les anticonvulsivants et les antiarythmiques (Ragsdale *et al.*, 1994). En règle générale l'interaction entre les neurotoxines et les canaux Nav peut se produire de deux manières différentes, soit par un blocage du pore lorsque la toxine obstrue physiquement le pore et inhibe ainsi la conductance des ions Na⁺, soit par une modification de la tension, ce qui entraîne une altération de la cinétique d'ouverture et de la dépendance du voltage des canaux. Les toxines qui se fixent sur le site 1 telles que la TTX et STX sont des

bloqueurs de pore. Leur liaison aboutit à la formation d'un bouchon dans la partie externe du pore (Terlau *et al.*, 1991). Pour les toxines de site 2 comme la Batrachotoxine et la Grayanotoxine, leur fixation empêche le mécanisme de l'inactivation et active donc le canal de manière persistante (Linford *et al.*, 1998). Les α -toxines de scorpion et les toxines d'anémone de mer sont des exemples typiques de toxines de site 3, qui une fois fixées, elles ralentissent l'inactivation rapide des canaux Na_v (Wang *et al.*, 2011). Les β -toxines de scorpion et des araignées se lient au site 4 et déplacent la dépendance en tension de l'activation vers des potentiels plus hyperpolarisés (Cestele *et al.*, 1998 ; Cohen *et al.*, 2007). Les neurotoxines du site 5, comme les Brevetoxines et les Ciguatoxines, présentent plusieurs effets sur le fonctionnement des Na_v , tels que l'inhibition de l'activation et un déplacement hyperpolarisant de la dépendance en tension de l'activation (Trainer *et al.*, 1994 ; Strachan *et al.*, 1999). Enfin, les δ -onotoxines agissent sur le site 6 et provoquent des effets similaires aux toxines du site 3 en ralentissant ou en inhibant l'inactivation (Benoit, 1998). Bien que leur origine puisse être différente, deux types de neurotoxines peuvent avoir le même effet (la liaison des μ -conotoxines et/ou du TTX entraîne le blocage de la conductance Na^+).

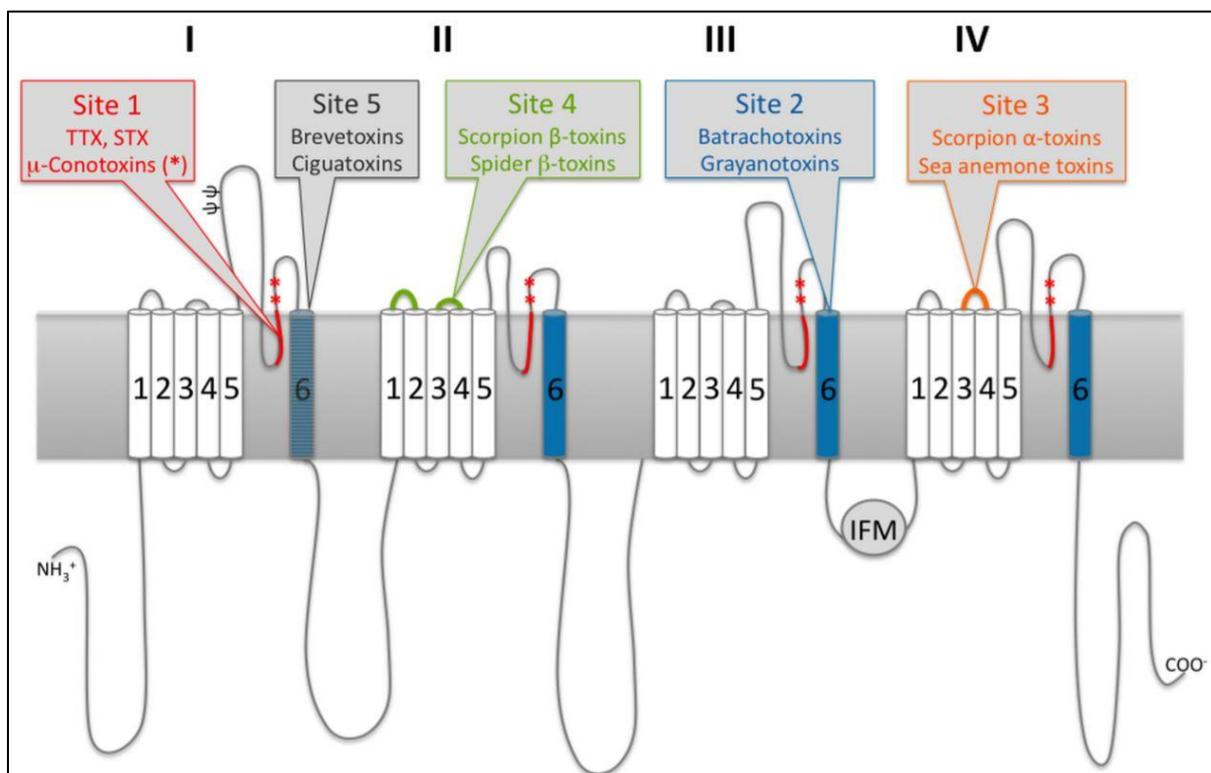


Figure 10 : Représentation schématique de la sous-unité α fonctionnelle des canaux Nav et identification des zones connues de liaison des neurotoxines (Stevens *et al.*, 2011)

- **Le site de fixation 3**

Les neurotoxines se liant au site 3 comprennent des membres de différents phyla du règne Animalia, parmi lesquels les principaux acteurs sont les toxines des scorpions, des anémones de mer et des araignées. Historiquement, le site de liaison 3 a été déterminé pour la première fois par des études de radio-marquage et de mutagenèse réalisées avec des α -toxines de scorpion et d'anémone de mer (Tejedor and Catterall, 1988 ; Rogers *et al.*, 1996). En 1989, les travaux de Thomsen et Catterall ont rapporté pour la première fois que les boucles extracellulaires entre S5 et S6 des domaines I et IV du Nav sont impliquées dans la liaison des neurotoxines du site 3 (Thomsen et Catterall, 1989). Plus tard, il s'est avéré que les résidus de la boucle extracellulaire entre les segments S3 et S4 du domaine IV étaient ceux qui sont impliqués dans la liaison des neurotoxines du site 3 (Rogers *et al.*, 1996). Fonctionnellement, des études de marquage par fluorescence ont indiqué que les neurotoxines du site 3 stabilisent le capteur de tension S4 du domaine IV inhibant ainsi son mouvement (Campos et al., 2008). Comme le segment S4 du domaine IV est connu pour être impliqué dans le couplage voltage-dépendant entre l'activation et l'inactivation rapide (Chahine et al., 1994 ; Sheets et Hanck, 1995), il est logique que la liaison des neurotoxines à ce site provoque une altération de l'inactivation rapide. L'inactivation peut être ralentie ou même complètement inhibée et ce en association avec un léger décalage hyperpolarisant de l'activation.

6. Pharmacologie des peptides de scorpions agissant sur les canaux Nav

La contribution critique des canaux Nav à l'excitabilité cellulaire et leur implication dans de nombreux processus physiologiques essentiels, notamment les fonctions neuromusculaires et cardiaques leur rendent une cible de nombreuses espèces venimeuses, notamment les scorpions, les escargots coniques, les araignées, les anémones et les serpents. Grace à leur petite taille par rapport au canal, les peptides de venin ont la possibilité d'interagir très sélectivement avec quelques et/ou plusieurs résidus du canal Nav. Comme il est abordé dans la section précédente, ces peptides exercent divers effets sur la fonction du canal Nav, tels que des effets inhibiteurs médiés par l'occlusion physique du pore ou par l'altération du mouvement des capteurs de tension, ainsi que des effets excitateurs résultant d'une activation accrue ou d'une inactivation

altérée (Terlau *et al.*, 1991 ; Cohen *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2011 ; Logan *et al.*, 2016). Selon leurs caractéristiques structurales, les peptides de scorpions modulent différemment la pharmacologie des canaux Nav.

Les effets physiologiques qui résultent de cette modulation se traduisent rapidement à l'échelle phénotypique par un comportement handicapant ce qui confère à ces animaux venimeux un avantage défensif et prédateur essentiel. Bien que des connaissances importantes sur les rôles et le fonctionnement des canaux Nav ont été obtenues à partir de mutations de gain ou perte de fonction et de canalopathies héréditaires, la valeur des peptides de venin comme outils pharmacologiques hautement sélectifs pour les différents sous-types des canaux Nav est particulièrement importante pour les isoformes où la délétion globale du gène entraîne une mort prématurée comme le Nav1.1, Nav1.2, Nav1.4, Nav1.5 et Nav1.6 (Burgess *et al.*, 1995 ; Planells-Cases *et al.*, 2000 ; Papadatos *et al.*, 2002 ; Cheah *et al.*, 2012).

L'étude des effets physiologiques de ces peptides sur l'activité des canaux Nav est indispensable pour mieux comprendre la relation structure-fonction des canaux et aussi pour trouver des pistes afin de lutter contre plusieurs canalopathies.

6.1. Effets physiologiques sur les canaux Nav suite à la fixation des α -toxines de scorpion

Les α -toxines de scorpion agissent en général sur le site 3 qui implique des résidus dans le capteur de tension du domaine IV et affectent principalement l'inactivation (**Figure 10**). Dans le cas d'un fonctionnement normal d'un canal Nav, le mouvement vers l'intérieur du capteur de tension S4 du domaine IV est essentiel pour passer de l'état inactivé à l'état fermé (Clairfeuille *et al.*, 2019). La fixation des α -toxines de scorpion sur le site 3 bloque ce mouvement et immobilise le segment S4 du domaine IV dans une position extérieure (ouverte) ce qui stabilise une configuration ouverte du canal Nav. A partir de cette conformation, l'inactivation ne peut se faire que lentement suite à la liaison du motif IFM, ce qui prolonge significativement la phase d'inactivation des canaux Nav (**Figure 11**). Les études structurales de l'interaction des α -toxines de scorpion avec le site 3 des canaux Nav montrent que la liaison de ces toxines est voltage-dépendante et nécessite que le canal soit dans une conformation primo-inactivée au minimum pour qu'il y aura une liaison avec le S4 du domaine IV. Cette liaison peut être déplacée par de fortes dépolarisations ainsi que par des mutations de résidus dans les liaisons S1-S2 et S3-S4 du domaine IV et la boucle S5-S6 du domaine I (Wang *et al.*,

2011 ; Clairfeuille *et al.*, 2019 ; Jiang *et al.*, 2021). Physiologiquement, la liaison des α -toxines de scorpion aboutit à la formation des courants persistants et non inactivants qui prolongent les potentiels d'action et altèrent l'activité neuronale coordonnée, provoquant ainsi une paralysie spastique (Israel *et al.*, 2017).

Comme il est abordé dans la section 4.1 du chapitre précédent, la classification des toxines de scorpions par leurs effets physiologiques sur les canaux reste encore controversée et compliquée. En plus de leurs actions sur la phase d'inactivation, certaines α -toxines de scorpion adoptent des effets caractéristiques des β -toxines de scorpion notamment vis-à-vis de changement des seuils de tensions d'ouverture du canal. Le double effet de ces toxines est souvent canal et/ou dose dépendant(e). En effet, il a été rapporté que la toxine OD1 du scorpion jaune iranien *Odonthobuthus doriae* présente des effets prédominants sur l'inactivation au niveau du canal Nav1.7, ce qui correspond à sa classification en tant que α -toxine de scorpion, néanmoins elle affecte également le seuil de tension d'activation des canaux Nav1.4, Nav1.6 et Nav1.7 à des concentrations plus élevées (Durek *et al.*, 2013 ; Deuis *et al.*, 2016). Pharmacologiquement, la haute sélectivité de l'OD1 pour le canal Nav1.7 a été utilisée pour établir un test d'engagement de cible *in-vivo* afin de développer des inhibiteurs analgésiques spécifiques des canaux Nav1.7 (Deuis *et al.*, 2016).

Les effets physiologiques des α -toxines de scorpion peuvent se différencier par rapport à la nature de leurs cibles, notamment, les canaux Nav des mammifères et des insectes. Il a été rapporté que les α -toxines de scorpion de l'ancien monde telles que AahII et Lqh2, agissent uniquement sur les canaux Nav des mammifères. D'autres α -toxines telles que la Lqh α IT et la LqqIII sont principalement actives sur les isoformes Nav des insectes mais pas sur ceux des mammifères. Néanmoins il existe un troisième type d' α -toxines de scorpion qui combine toutes les isoformes des canaux Nav. Les α -toxines de scorpion de ce type telles que la BmKM1 et la LqhIII présentent une activité sur les canaux des insectes et des mammifères (Bosmans and Tytgat, 2007). Il est intéressant de noter que la plupart des premières études pharmacologiques réalisées sur les α -toxines de scorpion ont été faites à l'aide de préparations cérébrales de rongeurs. Ces travaux ont évalué les effets des α -toxines de scorpion après injection intracérébroventriculaire chez les rongeurs et peu d'études ont évalué systématiquement les effets sur les isoformes Nav d'insectes et de mammifères exprimées de manière hétérologue (Israel *et al.*, 2017). A nos jours, ces classifications fonctionnelles sont remises en question par les observations selon lesquelles certaines toxines, telles que LqhVI et LqhVII, retardent

l'inactivation des canaux musculaires rNav1.4 et hNav1.5 mais pas des canaux neuronaux rNav1.2A exprimés dans des ovocytes de *Xenopus* (Hamon *et al.*, 2002).

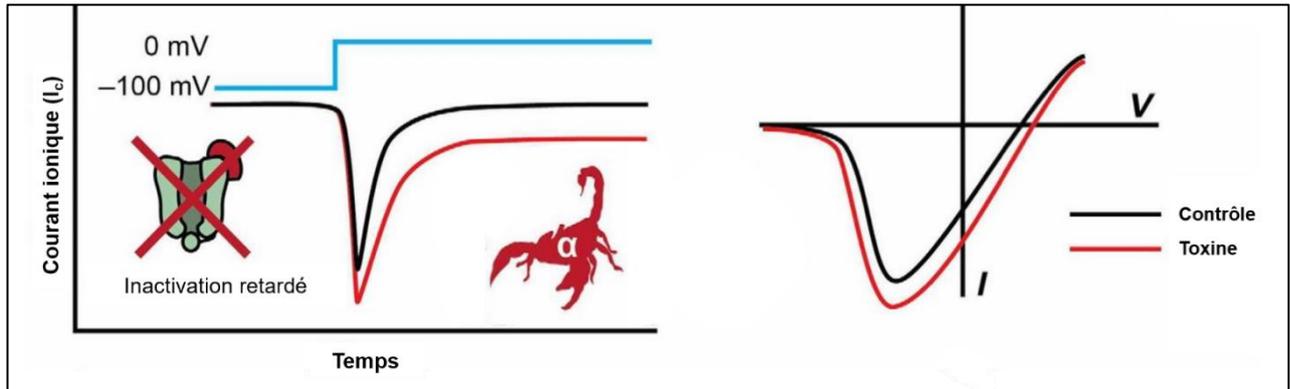


Figure 11 : Représentation schématique de l'effet des α -toxines de scorpion sur les propriétés biophysiques des canaux Nav (Israel *et al.*, 2017)

6.2. Effet physiologique sur les canaux Nav suite à la fixation des β -toxines de scorpion

La famille des β -toxines de scorpion se lie au site 4 des canaux Nav. Structuralement, ce site est formé par les boucles extracellulaires S1-S2 et S3-S4 du domaine II et la liaison S5-S6 du domaine III (**Figure 10**) (Cohen *et al.*, 2007 ; Pedraza Escalona and Possani, 2013 ; Quintero-Hernandez *et al.*, 2013). La liaison de certaines β -toxines de scorpion fait que le capteur de tension du domaine II reste piégé en position activée, augmentant ainsi la probabilité d'ouverture du canal (Campos *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2011). Électrophysiologiquement, ceci se manifeste par un décalage du seuil de tension d'activation des canaux Nav vers des valeurs plus négatives. Il est intéressant de noter qu'une pré-impulsion dépolarisante est nécessaire pour observer le décalage hyperpolarisant qui résulte de l'action des β -toxines de scorpion sur l'activation du canal. Le modèle de piégeage du capteur de tension du domaine II a été développé en utilisant C_{ss}-IV, une β -toxine de scorpion qui nécessite une pré-impulsion dépolarisante pour observer les effets sur l'ouverture des canaux. Ce modèle décrit la liaison des β -toxines de scorpion au site 4 suite à une activation précédente du canal (translation du segment S4 du domaine II à l'extérieur). Grâce à son interaction de haute affinité avec ce dernier, la fixation de cette β -toxine de scorpion empêche le retour du segment S4 du domaine II vers l'intérieur lors de la désactivation et ainsi son "piégeage" à l'état activé. Cette configuration garde le canal Nav dans un état pré-ouvert et cela même en étant en état de repos

(Cestele *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2011). La résultante de tout cela, conduit à l'augmentation de l'activation du canal et à la répétition des potentiels d'action. De manière intéressante, des expériences avec la Ts1, une β -toxine de scorpion qui provoque le décalage du seuil de tension d'activation des canaux Nav vers des valeurs plus négatives du canal pré-impulsionnel, ont confirmé que les β -toxines de scorpion immobilisent le capteur de tension du domaine II ce qui facilite l'activation allostérique des capteurs de tension restants des domaines I, III et IV (Campos *et al.*, 2007) (**Figure 12**).

Comme pour les α -toxines de scorpion, les β -toxines de scorpion peuvent agir différemment envers les différentes isoformes des canaux Nav que ce soit des mammifères ou des insectes. En effet, il a été rapporté que la β -toxine de scorpion Tf2 provoque un décalage du seuil de tension d'activation du canal Nav1.3 vers des valeurs plus négatives et cela sans passer par une étape de pré-impulsion tandis que la Cn2, une β -toxine de scorpion purifiée à partir du venin brut de *Centruroides noxius* (Pintar *et al.*, 1999), provoque des effets similaires sur le canal Nav1.6 mais seulement après une activation pré-impulsionnelle (Schiavon *et al.*, 2006). Les travaux d'investigation de cette dernière ont contribué à élucider le rôle du canal Nav1.6 dans la fonction des neurones sensoriels, notamment en ce qui concerne le développement de l'allodynie au froid induite par l'oxaliplatine (Deuis *et al.*, 2013).

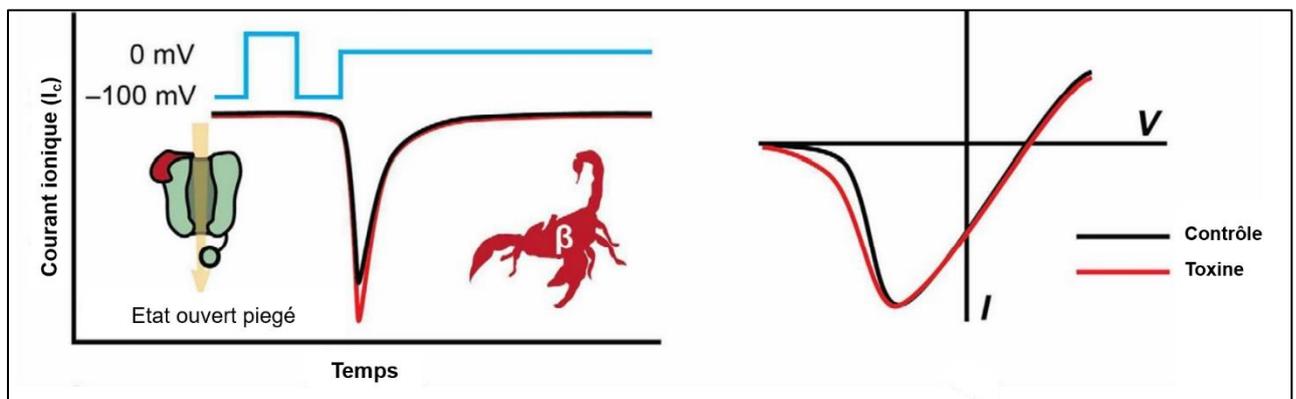


Figure 12 : Représentation schématique de l'effet des β -toxines de scorpion sur les propriétés biophysiques des canaux Nav (Israel *et al.*, 2017)

Chapitre 3 : Immunothérapie et antitoxines de scorpions

1. Historique et limite de l'immunothérapie contre l'envenimation scorpionique

Dès le début de l'Histoire, la course pour la protection contre l'envenimation scorpionique a été parmi les préoccupations principales de l'humanité. Au cours des années et avec le développement des méthodes de recherches, plusieurs pistes ont été investiguées. L'immunothérapie constitue une approche prometteuse, surtout à la lumière de son efficacité bien documentée contre l'envenimation des serpents (Maduwage *et al.*, 2015). De ce fait, les recherches menées sur l'immunothérapie contre l'envenimation scorpionique ont été calquées sur celles des serpents. Cela a permis de gagner du temps, mais deux différences majeures entre les deux types d'envenimations expliquent les difficultés actuelles pour une utilisation potentielle de l'immunothérapie dans l'envenimation scorpioniques.

La première différence appartient au domaine de la toxicocinétique. En effet, il existe un décalage important entre la cinétique de distribution du venin de scorpion et celle de l'anti-venin conventionnel. Ce problème a été moins posé dans le cadre de l'immunothérapie contre l'envenimation des serpents. Ceci est expliqué par le fait que le venin de scorpion a un poids moléculaire inférieur à celui du venin de serpent, ce qui explique les différences significatives de biodisponibilité (passage du tissu sous-cutané vers le sang) et du temps d'élimination (Ismail and Abd-Elsalam, 1988 ; Bawaskar and Bawaskar, 2012). C'est le cas du venin du scorpion *Leiurus quinquestriatus* qui est caractérisé par une distribution du compartiment sanguin aux tissus beaucoup plus rapide que toutes les fractions d'immunoglobulines évaluées (IgG, F(ab), ou même F(ab')₂) (Ismail and Abd-Elsalam, 1988 ; Murthy, 2014). Par rapport à toutes ces fractions d'immunoglobulines, le venin de scorpion présente également un niveau d'accumulation dans les tissus beaucoup plus élevé et une vitesse plus rapide pour atteindre sa concentration maximale.

La deuxième différence représente l'obstacle le plus sérieux pour l'utilisation de l'immunothérapie comme approche de traitement de l'envenimation sévère par les scorpions et concerne la physiopathologie de l'envenimation elle-même. En effet, contrairement à l'envenimation par les serpents, la majorité des conséquences physiopathologiques de l'envenimation par les scorpions, en particulier celles qui expliquent sa létalité, sont médiées par des neurohormones, principalement des catécholamines (Hantson, 2019).

Les neurotoxines sont les principaux constituants létaux des venins de scorpions et elles sont représentées en quantité relativement faible (environ 3 à 10 % de la masse du venin brut). De plus, en raison de leur petite taille, ces dernières ne provoquent pas une forte réaction immunogène. Ainsi, elles n'induisent pas toujours la production de molécules d'anticorps de haute qualité et en quantité suffisante.

Cependant, malgré les difficultés de l'utilisation de l'immunothérapie contre l'envenimation scorpionique, cette dernière reste la meilleure piste à explorer. Dans cette logique, plusieurs études ont été conçues afin de mieux comprendre le mode d'action du venin ainsi que de mieux caractériser structurellement et immunologiquement ses molécules effectrices. Etant donné que les membres de la famille des α -toxines du venin de scorpion sont les principaux acteurs de l'envenimation via la modulation des canaux ioniques (Restano-Cassulini *et al.*, 2017), l'approche de l'immunothérapie contre l'envenimation scorpionique vise principalement ces molécules.

2. Cartographie des épitopes des toxines d'*Androctonus*

2.1. Premières tentatives de caractérisation des sites antigéniques des toxines

Le nombre de sites antigéniques sur les α -toxines de scorpion a été déterminé en utilisant les toxines I et II d'*Androctonus australis Hector* (AahI et AahII) (**Figure 13**) (El Ayeb *et al.*, 1983). Des études structurales ont montré qu'un minimum de quatre fragments d'anticorps F(ab) se liaient simultanément à chaque toxine. Profitant de la perte d'un site antigénique commun entre la AahII et une toxine hautement homologue du même groupe immunologique (Bot III, de *Buthus occitanus tunetanus*), une population d'anticorps dirigée vers un seul site de AahII a été ciblée, purifiée et caractérisée. Ce site se trouve à proximité du pont disulfure Cys12-Cys63, qui relie la partie N-terminale à la partie C-terminal. En effet, d'après la structure 3D aux rayons X de AahII, cette région est entièrement exposée et accessible (Fontecilla-Camps *et al.*, 1988). Il est noté que l'accessibilité et la flexibilité présentent également une forte corrélation (Novotny and Haber, 1986). Ainsi, l'antigénicité de la AahII a été analysée en fonction de l'accessibilité et de la flexibilité de ses segments. Les profils d'hydrophilie de AahII et de 13 autres α -toxines ont suggéré que les sites antigéniques étaient situés dans des régions homologues. Certaines régions hydrophobes conservées de la toxine semblaient manquer de flexibilité, principalement en raison de la réticulation des ponts disulfures et d'un large réseau

de liaisons hydrogène inter-chaînes. Les régions antigéniques de AahII se sont avérées être situées dans des parties exposées de la surface moléculaire représentées par les spires inversées et l'hélice α . Elles correspondent également aux segments de la chaîne polypeptidique qui sont les plus accessibles à une sonde sphérique de grande taille qui imite la fixation d'une molécule d'anticorps. L'étude des relations entre les résidus exposés voisins au sein de la protéine a permis de conclure qu'en dehors des épitopes classiques dépendant de la séquence (épitopes séquentiels), il y a aussi des épitopes antigéniques discontinus connus sous le nom des épitopes conformationnels (Granier *et al.*, 1989). De ce fait, deux objectifs principaux ont alors été fixés, le premier vise à caractériser les épitopes de la toxine et le second consiste au développement d'un antigène le plus performant pour améliorer l'efficacité sérique.



Figure 13 : Représentation schématique en ruban de la toxine AahII (PDB : 1PTX)

2.2. Utilisation de peptides synthétiques pour définir des épitopes conformationnels

Deux peptides, qui imitent deux régions de AahII supposées incluses dans ses sites antigéniques ont été synthétisés chimiquement, purifiés et caractérisés. L'un de ces peptides est situé autour du pont Cys12-Cys63 (El Ayeb *et al.*, 1983), le second se situe au niveau de la séquence 50-59 dans la partie C-terminale (El Ayeb *et al.*, 1984). Les anticorps dirigés contre la AahII native ont reconnu individuellement ces peptides ce qui a confirmé leur implication dans l'antigénicité de la toxine. Des travaux postérieurs ont investigué ces mêmes peptides afin de développer des anticorps plus spécifiques. Pour ce faire, ces peptides ont été couplés aux billes de Sépharose puis utilisés comme matrice en chromatographie d'affinité pour purifier les anticorps totaux anti-AahII native. Les anticorps sélectionnés ont été capables de se lier à la AahII marquée à l'iode 125 (^{125}I) (Granier *et al.*, 1984). Ces données ont permis de montrer que la région

entourant le pont disulfure entre Cys12 et Cys63 et la portion de résidus 50-59 constitue très probablement deux sites antigéniques nommés, site 1 et site 2. La chromatographie d'affinité a isolé deux populations d'anticorps qui étaient fonctionnellement indépendantes. Ce résultat n'était pas surprenant vu que les deux régions portant ces deux sites antigéniques ne sont pas proches l'une de l'autre dans l'espace 3D et qu'il n'y a ni encombrement stérique ni effet coopératif entre elles. Le peptide synthétique 50-59, libre ou lié à l'albumine de sérum bovin (BSA), a été utilisé pour produire des anticorps polyclonaux qui peuvent neutraliser les effets de AahII *in-vivo*. Les spécificités antigéniques des anticorps anti-peptides et anti-toxines ont été comparées avec la technique de RIA (Radio-immunoassay) en utilisant ¹²⁵I-AahII en compétition avec des toxines homologues ou chimiquement modifiées. Les anticorps anti-peptides ont montré une meilleure affinité pour la AahII native que pour le peptide 50-59 lui-même lié à la BSA et ont été complètement incapables de reconnaître le peptide libre. Ceci suggère que la restriction de la liberté de conformation du peptide immunisant était nécessaire pour obtenir des anticorps anti-peptide de haute affinité à la fois pour le peptide et la toxine. Dans le peptide 50-59, il a été démontré que la Lys58 est critique pour maintenir la toxicité de AahII mais aussi l'intégrité de la structure 3D (Habersetzer-Rochat and Sampieri, 1976). L'antigénicité d'un autre peptide 19-28, correspondant à une structure hélice α rigide dans le modèle 3D de AahII native a été testée dans différents systèmes de RIA en phase solide. Deux sous-populations d'anticorps anti-AahII ont été purifiées par chromatographie d'affinité, l'une sur Sepharose-peptide 19-28, l'autre sur Sepharose-AahII. La AahII native a été reconnue par les deux sous-populations. Cependant, ces anticorps n'ont lié que faiblement la AahII dénaturée, ce qui suggère qu'ils ont identifié la même surface antigénique que les anticorps anti-toxine. Cette surface, correspondante à l'hélice α , était donc dépendante de la conformation et correspond à un épitope conformationnel de AahII (Bahraoui *et al.*, 1987b). Le peptide 19-28 a également été utilisé comme immunogène sous 3 formes : libre ; lié à la BSA ; lié à une résine de polyacrylamide macroporeuse. Seuls les anticorps contre le peptide lié à la BSA ou à la résine ont été capables de reconnaître la toxine native. Structurellement, il a été montré que la région de l'hélice α restait accessible à ces anticorps lorsque le ¹²⁵I-AahII était lié aux canaux Nav dans les synaptosomes du cerveau de rat (Bahraoui *et al.*, 1987a). Les séquences 19-29 et 28-39 de AahII ont également été synthétisées chimiquement afin d'étudier leurs quatre régions antigéniques. Ces deux peptides ont été choisis en raison de leurs valeurs élevées d'hydrophilie et par conséquent il a été suggéré qu'ils jouaient un rôle dans l'antigénicité de la toxine. Deux sous-populations du pool total d'anticorps dirigés contre la toxine native ont été purifiées par chromatographie d'affinité réalisée sur chaque peptide (Bahraoui *et al.*, 1986a). De cela, Quatre

sites antigéniques de AahII ont été identifiés. Le premier étant au niveau du pont disulfure 12-63 et le second englobe les résidus 50-59. Les anticorps se liant à ces sites sont capables de neutraliser la toxine. Les F(ab)s de la région entourant le pont disulfure 12-63 ont inhibé la liaison de ^{125}I -AahII à son site de liaison au canal Nav. Au contraire, lorsque AahII était déjà liée à son récepteur, ces deux régions antigéniques devenaient inaccessibles à leurs anticorps. D'autre part, les deux autres régions antigéniques de AahII, constituées par l'hélice α (résidus 23-32) et la boucle β (résidus 32-35) sont restées accessibles à leurs anticorps respectifs lorsque la toxine était liée à son récepteur (el Ayeb *et al.*, 1986).

2.3. La méthode Pepsan (Peptide scan)

Toujours dans une démarche de criblage des sites antigéniques de la toxine AahII, un nouveau logiciel a été développé pour la conception de peptides de AahII qui vont être préparés par la méthode de synthèse manuelle par points (Pepsan) (**Figure 14**) (Molina *et al.*, 1996). Afin de cartographier le schéma de réactivité antigénique de AahII, un ensemble de 58 peptides chevauchants a été utilisé. Six régions antigéniques dépendantes de la séquence ont été identifiées (séquences : 1-8, 4-12, 27-35, 39-45, 52-58 et 55-61). Ces régions correspondent soit aux plis entre les feuillets β , soit aux parties étendues de la molécule, comme il est déjà cartographié par les autres méthodes mentionnées ci-dessus. L'extrémité N-terminale de l'AahII s'est avérée fortement réactive avec les anticorps anti-AahII de lapin. Ainsi, un peptide synthétique imitant la séquence 1-8 de AahII a été utilisé pour produire des anticorps qui ont réussi à se lier à la toxine avec une grande affinité. Les mutagenèses dirigées suivant un balayage Alanine sur la séquence 1-7 et les peptides conçus selon le N-terminal des autres toxines d'*Androctonus* ont été analysés avec les anticorps anti-AahII et anti-peptide 1-8. Les résidus cruciaux dans la reconnaissance de la partie N-terminal de AahII étaient : Lys2, Asp3 et Gly4 (Devaux *et al.*, 1993).

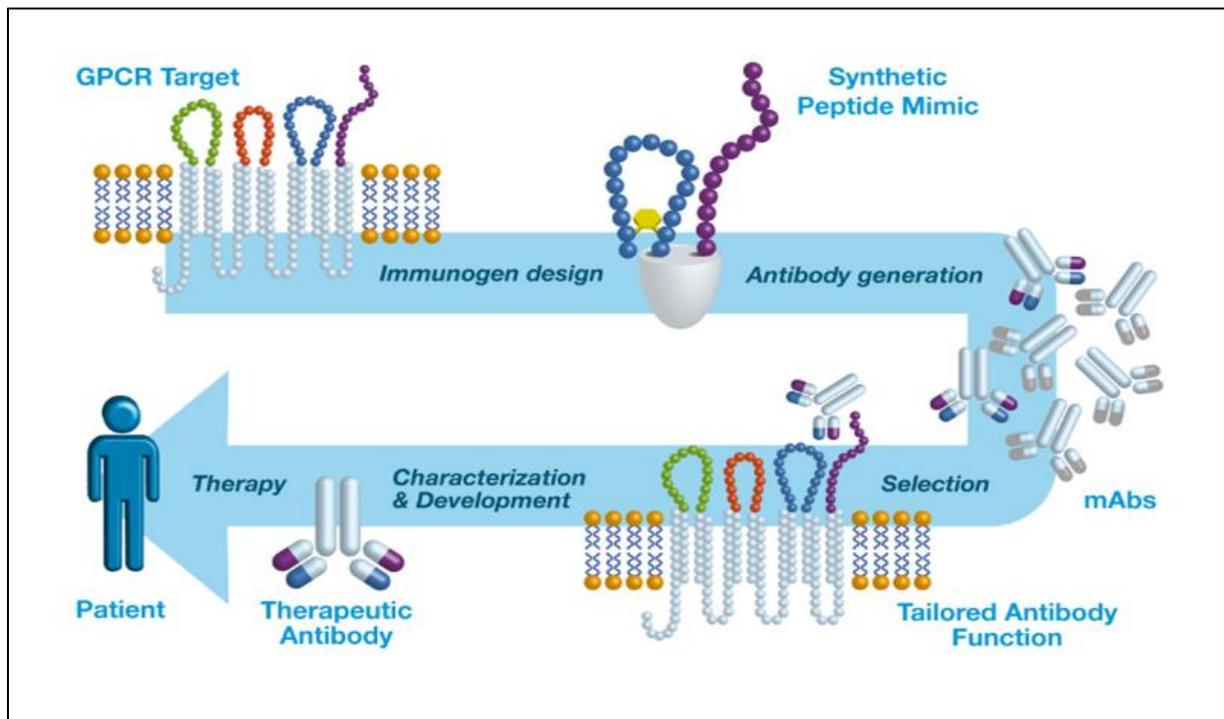


Figure 14 : Principe simplifié de la technique de Pepsan (www.pepscan.com; antibody-discovery)

2.4. Utilisation d'anticorps monoclonaux pour caractériser les épitopes des toxines d'*Androctonus*

Les anticorps monoclonaux (AcMs) ont été utiles pour étudier les propriétés antigéniques des toxines d'*Androctonus* afin de caractériser leurs épitopes en vue de la préparation d'anti-venins (Bahraoui *et al.*, 1988 ; Yahi *et al.*, 1992 ; di Tommaso *et al.*, 2012). Pour obtenir des AcMs, la rate de l'animal est isolée après une série d'injections de rappel par la AahII. Les lymphocytes immortalisés par fusion cellulaire avec des cellules de myélome sont ensuite sélectionnés par rapport à la production d'anticorps de haute affinité. Les hybridomes produisant les anticorps choisis peuvent alors être développés (**Figure 15**), et l'ARNm codant pour les chaînes lourdes et légères est isolé et muté pour améliorer encore l'affinité de l'anticorps (Newcombe and Newcombe, 2007). Plusieurs AcMs ont été générés afin de neutraliser la AahII. Ces études seront abordées ci-après dans la section 3.8.

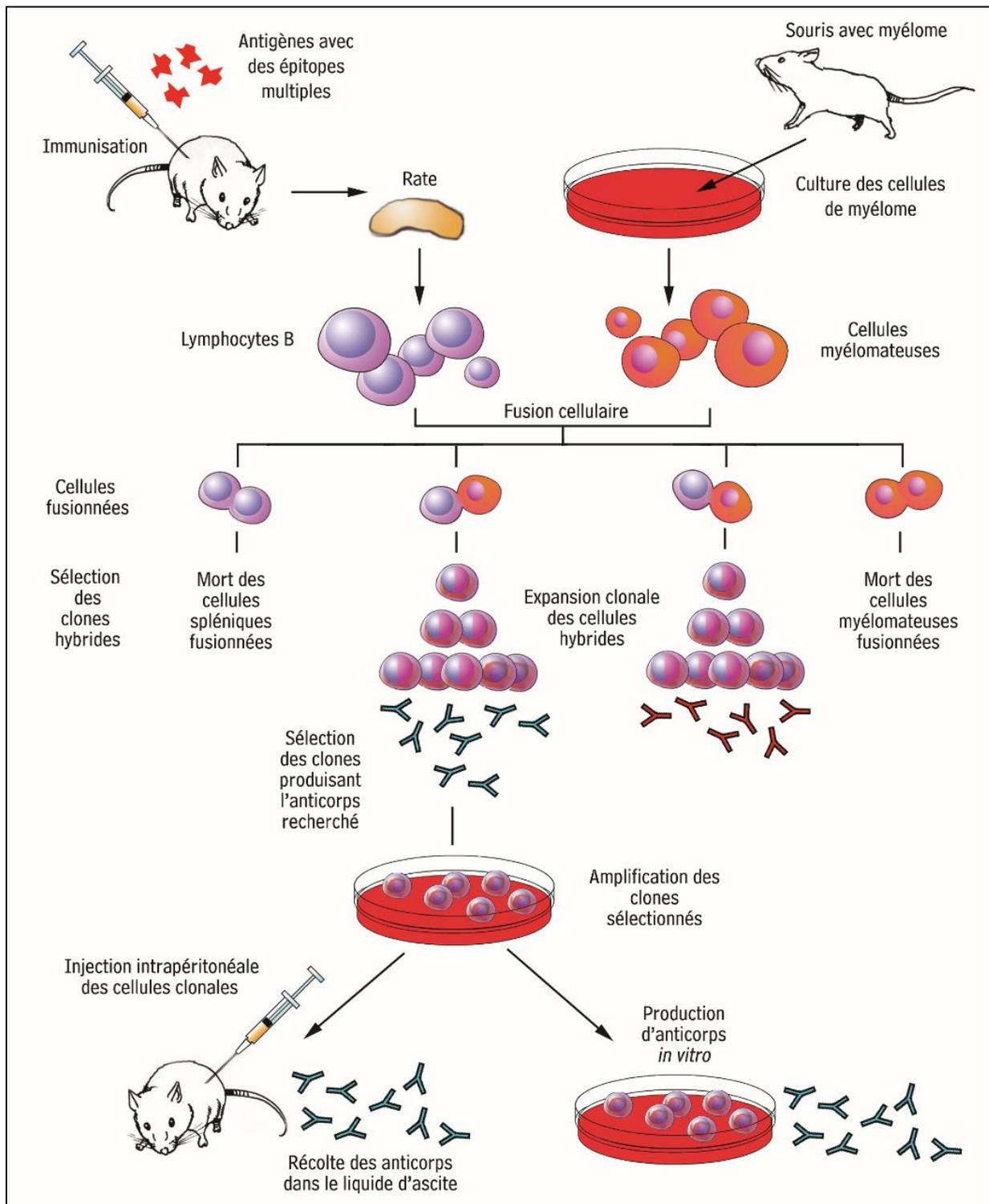


Figure 15 : Principe de production des AcMs (Livre : Immunohématologie, Roselyne L'Italien 2008, Chapitre 2, section 2.6.8, page 53)

3. Les différentes études de recherche visant à améliorer la préparation des anticorps anti-venin

3.1. Désintoxication par modification chimique

Les premières tentatives ont été faites en utilisant quatre espèces différentes des scorpions mexicains de la famille des *Centruroides*. Quatre immunogènes différents (le venin brut ; un extrait obtenu à partir de telson découpé de scorpions qui n'ont pas été traités auparavant ; une fraction toxique obtenue à partir de l'extrait de telson par chromatographie basse pression ; la même fraction toxique traitée avec l'anhydride acétique) ont été injectés à des lapins afin de préparer des anti-venins (Garcia y Perez *et al.*, 1988). Il a été constaté qu'après l'acétylation, les protéines obtenues n'étaient pas toxiques. En revanche, bien que deux fois plus d'immunogène a été injecté aux animaux, les capacités de neutralisation de l'antisérum obtenu avec les fractions toxiques acétylées étaient légèrement plus faibles que celles obtenues avec la fraction non acétylée (Garcia y Perez *et al.*, 1988). L'affaiblissement des capacités de neutralisation de l'antisérum peut être expliqué par la perte de la population des anticorps reconnaissant les épitopes conformationnels suite aux perturbations conformationnelles des sites antigéniques après modification chimique. Cependant, la préparation d'une forme atoxique des antigènes présente des avantages de réduction de la toxicité chez l'animal mais des inconvénients par rapport à la protection contre les effets létaux chez les humains.

3.2. Venin piégé dans des liposomes

Afin de tirer avantage de l'utilisation des fractions atoxiques tout en évitant la perte de performance de neutralisation, l'augmentation d'une réponse immunitaire humorale chez les souris a été assurée par l'utilisation d'une fraction toxique de venin piégée dans des liposomes de cholestérol sphingomyéline non toxiques. Les souris présentant les niveaux les plus élevés d'anticorps circulants d'anti-toxines ont finalement survécu au défi du double de la DL₅₀ de la fraction toxique, qui a tué toutes les souris témoins non-immunisées. Cette protection *in vivo* s'est toutefois révélée limitée tant dans sa durée que dans son efficacité contre des quantités plus élevées de toxine (Chavez-Olortegui *et al.*, 1991).

3.3. Utilisation de peptides synthétiques ou de la AahII synthétiques pour générer des anticorps neutralisants

Etant donné la toxicité élevée de la toxine AahII, la possibilité de produire des anticorps réagissant à la toxine par immunisation avec des peptides courts a été évaluée. La séquence 50 à 59 de AahII a été choisie en fonction des résultats qui montrent bien son implication à l'antigénicité de la toxine. Ce peptide synthétique a été investigué et utilisé sous différentes formes (libre ; polymérisé linéairement ; couplé avec du KLH (Keyhole limpet hemocyanin) ; couplé avec un activateur de lymphocytes B de faible poids moléculaire) afin d'immuniser différents groupes de souris C57BL/6. Le test ELISA a été utilisé pour caractériser la réactivité sérique. Les configurations du peptide seul ou couplé à la KLH ont donné une forte réactivité. Cependant, les sérums immunitaires produits n'ont pas pu neutraliser les effets létaux de la toxine (Ait-Amara *et al.*, 1993). D'autres études en utilisant la RIA en phase liquide ont montré que la toxine native n'était pas reconnue, ce qui indique que les propriétés neutralisantes dépendent principalement des épitopes conformationnels de la AahII (Carmo *et al.*, 2015).

3.4. Variante de AahII synthétisée chimiquement et dépourvue des ponts de cystéines

Dans un premier temps, la polymérisation au glutaraldéhyde des toxines d'*Androctonus* a été utilisée pour obtenir des agrégats d'antigènes à toxicité réduite (Zenouaki *et al.*, 1997). Ensuite, une toxine analogue de AahII nommée (Abu)8-AahII a été synthétisée chimiquement. Cette protéine dépourvue des ponts disulfures, a été utilisée comme antigène chez la souris et le lapin. La construction était totalement non-toxique chez la souris même si de grandes quantités équivalentes à 1000 fois la DL₅₀ de la toxine native étaient injectées. La (Abu)8-AahII en monomère ou polymérisée par le glutaraldéhyde était capable de protéger l'animal immunisé contre plusieurs doses mortelles de la AahII native. La protection était meilleure lorsque le peptide synthétique polymérisé était utilisé. Le titre d'anticorps a diminué avec le temps, mais l'immuno-protection est restée élevée six mois après l'immunisation (Zenouaki *et al.*, 1997).

3.5. Utilisation d'anatoxine native pour générer un antisérum

Une anatoxine naturelle d'*Androctonus mauretanicus*, l'AmmVIII, qui partage 87% d'identité avec la AahII, a été utilisée pour générer des antisérums chez les lapins. Les antisérums générés

ont été capables de protéger les souris contre la AahII. De plus, ils ont empêché l'association de l'¹²⁵I-AahII avec les canaux Nav dans les synaptosomes de cerveau de rat et ont également éliminé l'¹²⁵I-AahII déjà lié à son site de liaison (Martin-Eauclaire *et al.*, 2006). Comme les anticorps anti-AmmVIII sont censés reconnaître des épitopes discontinus et continus de la toxine, 24 peptides imitant les régions discontinues et continues de l'AmmVIII ont été conçus *in silico* et préparés par synthèse. Les anticorps anti-AmmVIII ont reconnu sept de ces peptides. La localisation 3D des segments constituant les peptides discontinus et continus antigéniquement réactifs a mis en évidence trois régions de l'AmmVIII assez similaires à la structure 3D de la AahII (Alvarenga *et al.*, 2010). La région A se trouvait dans l'hélice α et le feuillet β à trois brins de la toxine. La région B comprenait des segments de la boucle β 2- β 3. L'antigénicité des régions A et B dans la toxine AahII avait déjà été évaluée expérimentalement. La région C de l'AmmVIII était constituée de différents segments de la surface hydrophobe conservée décrite dans les α -toxines. Elle comprenait les positions 10 et 58 qui ont été retrouvées dans l'épitope discontinu de l'anticorps monoclonal anti-AahII, le 4C1, ainsi que trois résidus Tyr appartenant chacun à un brin distinct des feuillets β (Bahraoui *et al.*, 1988 ; Alvarenga *et al.*, 2010)

3.6. Les toxines d'*Androctonus* comme protéines de fusion exprimées dans *Escherichia coli*

Les toxines recombinantes de AahI, AahII et AahIII, ainsi qu'une construction en tandem de AahI-AahII, ont été produites sous forme de protéines de fusion avec la protéine de liaison au maltose (MBP) dans *Escherichia coli*. Ces constructions ont été utilisées comme immunogènes chez le lapin et la souris afin d'obtenir des antisérums protecteurs contre les α -toxines les plus létales du venin d'*Androctonus*. *In vivo*, les protéines de fusion ont induit une protection à long terme chez les souris contre les effets létaux des toxines natives (Legros *et al.*, 2001). Malgré leur efficacité intéressante, aucun vaccin efficace n'a été proposé dans ces études (Gazarian *et al.*, 2005).

3.7. Technologie du système Phage Display

Plus récemment, la méthode bien établie du phage display (présentation des peptides sur les phages) a permis de réaliser des études approfondies sur les épitopes des toxines (Ledsgaard *et al.*, 2018).

Cette technologie offre l'avantage de pouvoir construire biologiquement des banques combinatoires d'ADNc hautement diversifiées exprimant à la surface de phages toutes sortes de molécules protéiques sous leur forme active. L'utilisation la plus fréquente du phage display reste le criblage d'anticorps recombinants (**Figure 16**). Les anticorps, en particulier les anticorps monoclonaux, sont des outils précieux capables de se lier de manière hautement spécifique à un ligand d'intérêt de type toxine de scorpions (voir section 3.8). Les techniques classiques de production d'anticorps monoclonaux sont longues et coûteuses, alors que la technologie du phage display ne demande que très peu de matériel spécifique pour sa mise en place et permet d'obtenir des anticorps en deux semaines. De plus, la technique du phage display permet d'obtenir des anticorps spécifiques contre des molécules très conservées ou même de très faible immunogénicité chez l'animal (Shim, 2017). Les anticorps recombinants obtenus par phage display peuvent remplacer les anticorps conventionnels utilisés en immunochimie. De ce fait, ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines, allant de la biologie moléculaire à la recherche biomédicale, pour le diagnostic, mais aussi le traitement de pathologies (Shim, 2017). Les anticorps ont été présentés sur les phages sous forme de fragments scFvs, F(ab)s, VH et de VHH (Shim, 2017 ; Ledsgaard *et al.*, 2018). La petite taille des gènes des VHHs permet la génération de banques de molécules stables et facilement manipulables. Cette technique a permis de produire des petits fragments d'anticorps connus sous le nom des nanoanticorps dirigés contre les deux principales toxines de *Androctonus*, la AahI et la AahII (Hmila *et al.*, 2008 ; Abderrazek *et al.*, 2009) (voir la section 3.9).

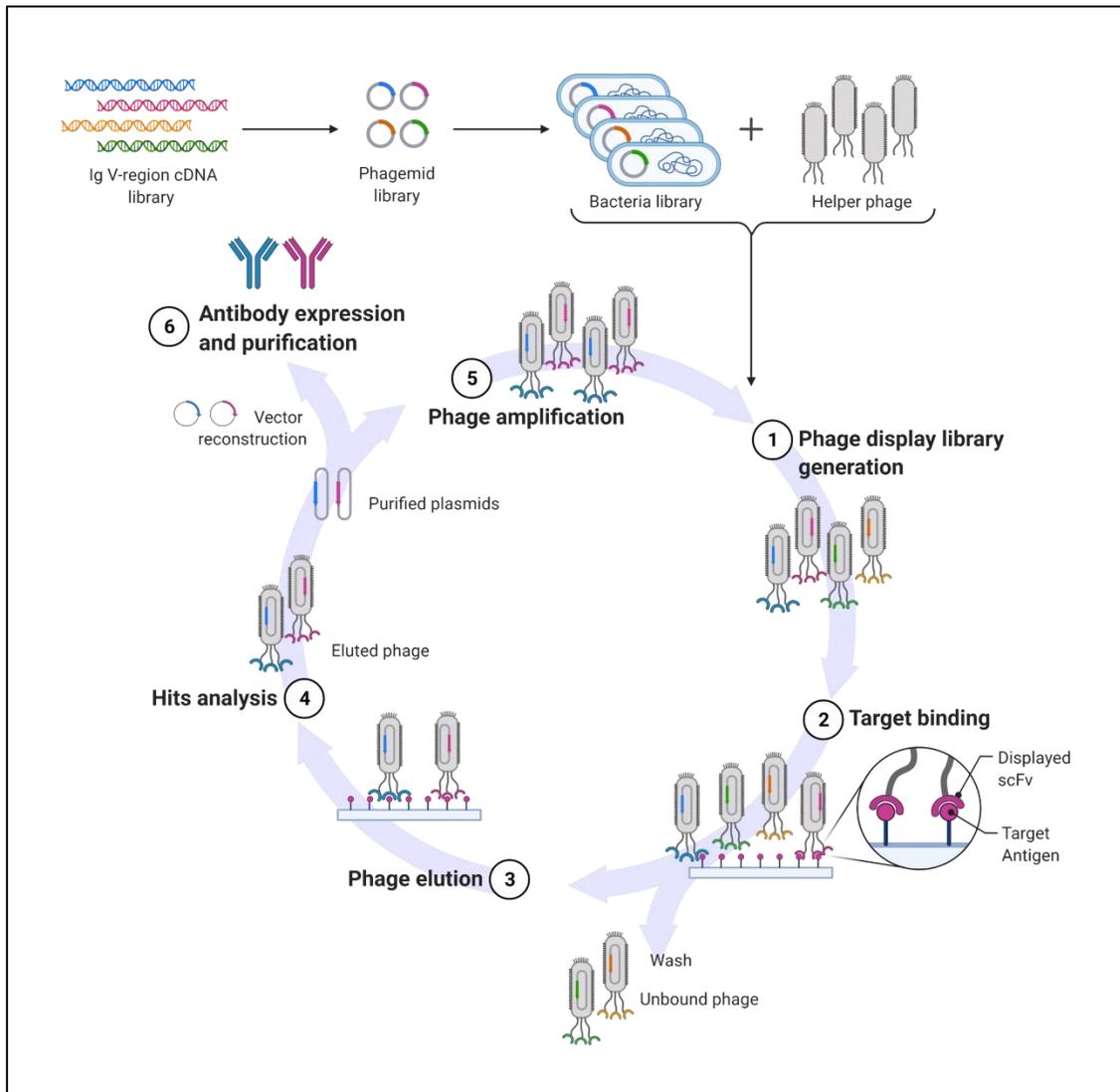


Figure 16 : Illustration des principales étapes de la technique du phage display (www.Biocytogen.com ; phage-display)

3.8. Anticorps monoclonaux

Plusieurs Anticorps monoclonaux (AcMs) ont été générés afin de neutraliser l'effet de la toxine AahII. Le premier étant le 4Cl, cet AcM est capable de bloquer la liaison de la toxine à son récepteur de manière compétitive ($K_d = 0,8 \text{ nM}$) en raison de sa liaison à un épitope proche de celui impliqué dans la liaison AahII-Nav (Bahraoui *et al.*, 1988). Le 4Cl est rapporté connaître plusieurs résidus de la toxine regroupés dans la partie C-terminale et a montré un effet neutralisant robuste *in vivo* chez les souris (1 mg de l'AcM a neutralisé 30DL₅₀ de AahII). Structuralement, l'activité neutralisante du 4Cl pourrait être liée à la charge positive conférée par le résidu Lys58 de sa chaîne latérale. Fonctionnellement, il est proposé que la liaison de

l'AcM abolit la toxicité, soit en empêchant l'interaction avec la membrane, soit en accélérant la dissociation de la toxine préliée à son récepteur (Bahraoui *et al.*, 1988). Les spécificités épitopiques du 4C1 et d'un second AcM, le 3C5 ont ensuite été caractérisées en utilisant 58 heptapeptides synthétiques linéaires chevauchants qui couvraient toute la séquence de la AahII. Aucun n'a été capable de reconnaître l'un des heptapeptides ce qui montre que ces AcMs ne reconnaissent que les épitopes conformationnels de la AahII. D'autres expériences ont été conçues pour voir si les deux AcMs étaient capables ou non de se lier simultanément à la toxine. Les études structurales ont montré que les épitopes reconnus par l'AcM 4C1 et l'AcM 3C5 étaient proches l'un de l'autre à la surface de la AahII, empêchant ainsi la liaison simultanée des deux AcMs à une seule molécule de toxine (Yahi *et al.*, 1992). L'analogue synthétique non toxique de AahII, la (Abu)8-AahII a également été utilisée pour obtenir des AcMs qui ont reconnu et neutralisé la toxine native (Devaux *et al.*, 1997). Cependant, aucune production d'AcM n'a été obtenue chez les souris immunisées par l'autre toxine létale majeure du venin de Aah, la AahI, sous sa forme native ou chimiquement inactive (Abu)8-AahI. Une nouvelle stratégie dans laquelle AahI a été couplée à une protéine porteuse (BSA, KLH, ou l'analogue non toxique de AahII) a conduit à un panel d'AcM de haute affinité. L'AcM 9C2 était particulièrement intéressant, car il était également réactif avec d'autres toxines classées dans le même groupe immunologique que la AahI et la AahIII. Il était capable de neutraliser l'effet toxique de la toxine mère ainsi que du venin. Ce AcM a montré une affinité de 150 pM pour la toxine et a été utilisé pour mettre en place un ELISA à deux sites pour la quantification de la AahI dans les fluides biologiques d'animaux envenimés. Ainsi, l'AcM 9C2 (anti-AahI), associé à l'AcM 4C1 (anti-AahII), a constitué un nouvel outil précieux pour la sérothérapie (Clot-Faybesse *et al.*, 1999 ; Devaux *et al.*, 2002). Malgré le potentiel de neutralisation évident de ces AcMs, leur origine murine a diminué l'enthousiasme quant à leur valeur thérapeutique. C'est pourquoi des dérivés à chaîne unique (scFv) des régions variables des AcMs 4C1 et 9C2 ont été conçus et exprimés dans *Escherichia coli*. Le clonage a permis d'isoler les ADNc codant pour les régions variables de l'AcM 4C1. En effet, les fragments Fv constituent la structure minimale pour conserver les caractéristiques de liaison d'un anticorps et peuvent être produits dans un système hétérologue. Les domaines variables recombinants (VH et VL) ont été génétiquement liés dans une construction à chaîne unique (scFv). Un petit peptide relie l'extrémité C-terminale de VH à l'extrémité N-terminale de VL et stabilise l'association. Cette protéine recombinante a montré des activités pharmacologiques et biologiques similaires à celles de l'anticorps initial, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Mousli *et al.*, 1999). En raison de leur petite taille, ces molécules peuvent se diffuser dans les compartiments extravasculaires et sont

plus efficaces que les AcMs. Cependant, elles sont rapidement dégradées et leur liaison monovalente diminue leur viabilité commerciale. Pour contourner ces restrictions, un produit issu de l'association non covalente de deux scFv (diabody) a été conçu (Aubrey *et al.*, 2003). Un diabody recombinant fonctionnel, conçu à partir de l'AcM 9C2 et qui reconnaît l'AahI, a été produit dans le périplasme d'*Escherichia coli*. Il présente une affinité de 80 pM pour AahI, une grande stabilité thermique dans le sérum et une activité protectrice chez les souris infectées. Cependant, le diabody ne peut pas être produit dans des systèmes non bactériens en quantités requises pour une utilisation pratique. Plus récemment, un tandem-scFv bispécifique unique capable de neutraliser à la fois AahI et AahII a été produit dans des bactéries. Cette construction a pu neutraliser la liaison des deux toxines à leur récepteur et a protégé *in vivo* des souris contre une envenimation expérimentale (Juste *et al.*, 2007). De même, le diabody (anti-AahI) Db9C2 et le diabody (anti-AahII) Db4C1 ont été mélangés de manière à ce que le rapport molaire corresponde aux caractéristiques des toxines et au polymorphisme du venin. *In vivo*, dans des conditions simulant une envenimation scorpionique, l'injection intrapéritonéale de 30 µg du mélange de diabodies a protégé la quasi-totalité des souris exposées à 3 LD₅₀ de venin injecté par voie sous-cutanée. La présence des deux diabodies était nécessaire pour que les animaux survivent (di Tommaso *et al.*, 2012).

Enfin, pour mieux définir les épitopes et les sites pharmacologiques de AahII, une analyse cristallographique a été réalisée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-AahII 4C1, qui présente une haute affinité et une grande sélectivité pour AahII (Bahraoui *et al.*, 1988). La structure cristallographique du complexe F(ab)4C1-AahII a été résolue à une résolution de 2,3 Å (Fabrichny *et al.*, 2012). La liaison de AahII à la région variable du F(ab)4C1 était étonnamment complémentaire en termes de forme, de chimie et de potentiel électrostatique de la surface du paratope du F(ab), chargée négativement et de la surface de l'épitope de la toxine, chargée positivement. La toxine AahII liée était orientée avec la région pentapeptidique C-terminale et les résidus non continus du long segment β1-α1 et du pli β2-β3, profondément enfouis dans la poche de liaison (25% de sa surface moléculaire). Les résidus Arg56 à His64 ont contribué à 68% de la surface de liaison (**Figure 17**). La conformation globale de AahII liée était inchangée par rapport à la AahII non liée, à l'exception de l'Arg62-His64 de la partie C-terminal, où une rotation de 75° a réduit la flexibilité du pont Cys12-Cys63 et a modifié drastiquement la direction du squelette. A partir du AcM 9C2, anti-AahI, une étape de cristallisation d'un complexe AahI-F(ab) de haute affinité a également été réalisée (Fabrichny *et al.*, 2012). Cependant, la structure à résolution de 1,6 Å qui en résulte n'a révélé qu'une molécule F(ab)

dépourvue de la toxine AahI liée, ce qui indique l'expulsion de l'antigène lié lors de la formation du cristal. Une analyse comparative et des données complémentaires provenant d'une étude de docking flexible ont proposé l'apparition d'orientations de piégeage distinctes pour les deux toxines par rapport à leur F(ab) respectif (Fabrichny *et al.*, 2012).

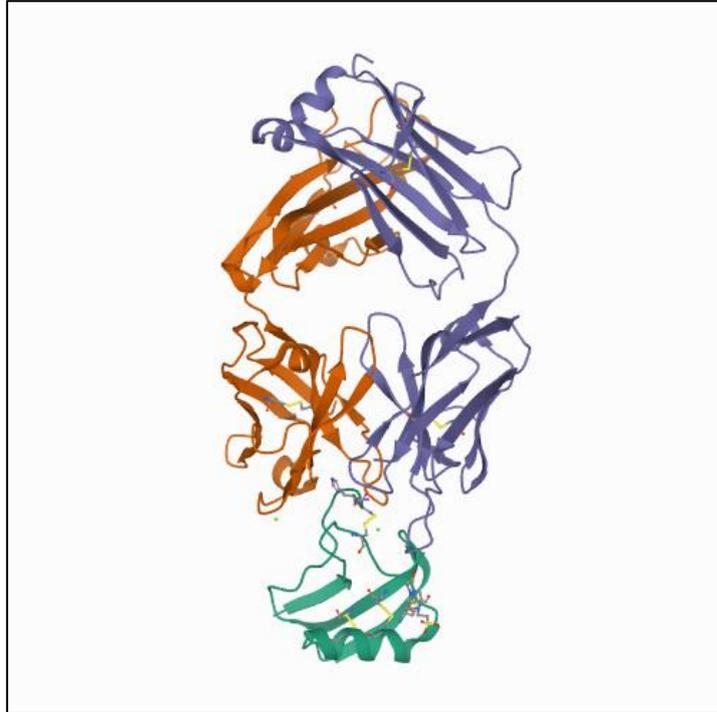


Figure 17 : Structure cristallographique du complexe AahII-F(ab)4C1 ; (PDB : 4AEI)

La toxine AahII est représentée en vert, la chaîne lourdes du F(ab)4C1 en orangé et sa chaîne légère en violet.

3.9. Les nanoanticorps des camélidés (Nbs)

L'immunisation des dromadaires (*Camelus dromedarius*) avec les toxines faiblement antigéniques de Aah a été considérée comme un succès (Meddeb-Mouelhi *et al.*, 2003). Les sérums des dromadaires immunisés ont neutralisé à la fois la fraction toxique du venin (AahG50) et la toxine la plus toxique du venin, la AahII. Une proportion significative d'anticorps polyclonaux à chaîne lourde a reconnu les toxines de Aah en particulier la AahII et a neutralisé leur toxicité chez la souris (Meddeb-Mouelhi *et al.*, 2003). Plus tard, une alternative aux anti-venins classiques a été proposée en utilisant des nanocorps (fragments de liaison aux antigènes à domaine unique dérivés d'anticorps à chaîne lourde de dromadaire) (**Figure 18**). Les premières tentatives de production d'anticorps VHH (domaine variable de la chaîne lourde de l'anticorps des camélidés) efficace contre la toxine AahI ont été basées sur le criblage d'une

bibliothèque immunitaire de sérum de dromadaire immunisé par la même toxine. Grâce à la technologie du phage display, divers formats de ce VHH qui neutralisent l'effet toxique de AahI ont été construits (Hmila *et al.*, 2008). Ces nanoanticorps étaient stables et se distribuaient rapidement et facilement dans les animaux envenimés. Toutes ces constructions et principalement le nanoanticorps Nb12, possédaient une capacité de neutralisation de la toxine du scorpion chez la souris qui dépassait de loin les tentatives précédentes réalisées avec des constructions à base de scFv (Hmila *et al.*, 2008). Postérieurement, de multiples nanoanticorps d'affinité nanomolaire contre la toxine AahII ont été isolés par la même approche. Le NbAahIII10 (Nb10), a montré une capacité de neutralisation chez la souris d'environ 37 000 DL₅₀ de toxine/mg de nanocorps (Abderrazek *et al.*, 2009). De plus, un mutant Cys/Ser de Nb10, où la Cys38 a été remplacée par une Ser afin d'éviter la dimérisation lors d'un stockage prolongé, a ensuite été humanisé. Ce nanoanticorps a conservé une forte affinité pour la AahII ainsi qu'une grande capacité de neutralisation sans que le rendement d'expression ou la stabilité ne soient compromis (Ben Abderrazek *et al.*, 2011). Une approche de bioinformatique structurale a été menée récemment pour élucider les interactions Nb10-AahII (Ksouri *et al.*, 2018) en utilisant un alignement de séquences de multiples Nb, suivi d'une modélisation et d'un docking moléculaire avec Rosetta-Antibody RAbD (Weitzner *et al.*, 2017) et ZDOCK (Pierce *et al.*, 2014). Notre étude récente visant à caractériser électrophysiologiquement l'interaction AahII-Nb10 a montré que le Nb10 est capable de reverser l'effet de AahII sur l'inactivation rapide du canal Nav1.5 à un ratio de 1 :1 en patch clamp. Structuralement on a montré que le Nb10 interagit avec le même épitope de AahII impliqué dans la liaison AahII-Nav1.5 (Hmadi *et al.*, 2022). Suivant la même logique, un NbF12-10 bispécifique a été conçu contre les toxines AahI et AahII. L'injection intraveineuse de 85 µg de NbF12-10 a protégé toutes les souris injectées par voie sous-cutanée avec une dose létale de venin d'Aah. De plus, face à des souris présentant des signes sévères d'envenimation, le NbF12-10 est resté totalement protecteur, alors que les souris non traitées sont mortes (Hmila *et al.*, 2010). La pharmacodynamique du NbF12-10 a été étudiée chez le rat par échocardiographie *in vivo*. Le NbF12-10 a été capable d'inhiber les troubles hémodynamiques provoqués par une dose létale de venin. Il a aussi rétabli les valeurs de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle et a prévenu les lésions pulmonaires et cardiaques des souris traitées après envenimation. Les auteurs ont suggéré que ce nanocorps thérapeutique pourrait remplacer les produits classiques à base de F(ab')₂ comme immunothérapie dans l'envenimation par le scorpion (Hmila *et al.*, 2012). Dans l'ensemble, tous ces efforts ont permis d'obtenir des informations précieuses pour la conception et le

développement des futurs anti-venins malgré l'efficacité thérapeutique limitée par la courte demi-vie sérique des VHH (Kitten and Martineau, 2019)

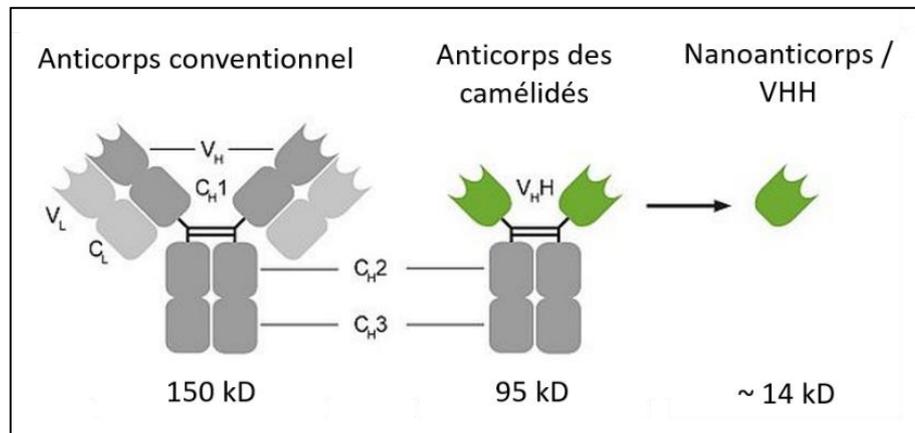


Figure 18 : Comparaison entre un anticorps conventionnel et un nanoanticorps (www.chromotek.com, Nanobodies/VHHs, modifiée)

4. Thérapies avancées des envenimations scorpioniques

Aujourd'hui, l'anti-venin obtenu à partir de chevaux hyperimmunisés est le seul traitement utilisé pour les humains envenimés. Cependant, les limites actuelles de la sérothérapie nécessitent une alternative efficace avec une marge de sécurité élevée, une affinité avec la cible et une capacité de neutralisation du venin plus prometteuse (Darvish *et al.*, 2016).

Malgré les progrès réalisés dans la compréhension de la physiopathologie de l'envenimation scorpionique et de son traitement, les défis à relever restent nombreux (Utkin, 2015). Ainsi, le développement de traitements efficaces, bon marché et sûrs est d'une grande nécessité. La compréhension des événements cellulaires et moléculaires impliqués offre des possibilités thérapeutiques et diagnostiques prometteuses. Parmi les cibles thérapeutiques possibles figurent les molécules d'adhésion, les métalloprotéases de la matrice (MMP), les cytokines inflammatoires et leurs récepteurs. Étant donné l'implication potentielle du stress oxydatif dans la pathogenèse de l'envenimation, il y a des raisons de penser que les composés antioxydants pourraient également être bénéfiques.

Une autre alternative qui a prouvé son utilité en thérapie expérimentale est l'utilisation d'IgY obtenues à partir de jaunes d'œufs (Thalley and Carroll, 1990 ; Carroll *et al.*, 1992 ; Martin-Eauclaire *et al.*, 2019). Par rapport aux mammifères, les poulets sont économiquement intéressants en termes de production d'anticorps polyclonaux, car les niveaux d'anticorps sont

plus élevés (5-6 fois plus que chez un lapin sur une période de 2 semaines) et la production dure longtemps, puisqu'une poule pondeuse peut être productive pendant toute la période de ponte et au-delà (Narat and Biotechnology, 2003). Cet avantage économique est renforcé par :

- (i) Le coût inférieur de l'alimentation et du logement des poulets, par rapport à d'autres animaux tels que les chevaux ou les moutons,
- (ii) et aussi par la production éthique d'IgY à partir du jaune d'œuf (Narat and Biotechnology, 2003 ; Kovacs-Nolan and Mine, 2012 ; Martin-Eauclaire *et al.*, 2019).

Récemment, il a été signalé que les anticorps IgY neutralisent efficacement la létalité du venin d'Aah et pourraient prévenir ses effets pathologiques (Sifi *et al.*, 2018). Il convient de noter qu'un traitement prophylactique pourrait être utilisé pour prévenir les effets physiopathologiques induits et la létalité de l'envenimation scorpionique (Lila and Laraba-Djebari, 2011 ; Nouri and Laraba-Djebari, 2015 ; Bachsais *et al.*, 2018). Le développement d'un produit similaire au vaccin pourrait renforcer les réponses immunitaires à un antigène spécifique sans effets secondaires délétères causés par les adjuvants (Singh and O'Hagan, 1999)

En conclusion, toutes les études académiques rapportées ci avant, ont montré que malgré le coût et le temps nécessaires, l'isolement des principaux composants toxiques du venin pour développer des antisérums présente des avantages remarquables par rapport à l'utilisation du venin brut comme antigène pour produire des anticorps thérapeutiques hautement protecteurs. Cependant, il est intéressant de noter que les anticorps isolés sont spécifiques de la famille des toxines de scorpions injectées.

Finalement, En tenant compte de ses limitations fonctionnelles et pharmacologique, l'immunothérapie contre l'envenimation scorpionique reste une approche prometteuse, cependant pour être plus efficace, cette thérapie doit être améliorée, optimisée et standardisée pour être prête à une utilisation humaine.

Objectifs de la thèse

1^{er} Volet :

La biodiversité du venin des scorpions est un atout majeur qui joue en faveur des espèces venimeuses pour survivre, notamment, en tant que moyen de défense ou encore pour se nourrir (Rodriguez de la Vega and Possani, 2005). Depuis le début de l'Histoire les piqures des scorpions posent un problème de santé publique (Chippaux and Goyffon, 2008 ; Feola *et al.*, 2020). La course pour comprendre et lutter contre les envenimations scorpioniques ne cesse d'évoluer. A l'aide des nouvelles technologies de fractionnement et de purification, les toxines responsables des effets majeurs du venin ont été identifiées et plusieurs antitoxines ont été développées. Il est connu que la majorité des toxines et de peptides de scorpions ciblent en particulier les canaux ioniques en perturbant leurs fonctionnements (Ortiz *et al.*, 2015 ; Restano-Cassulini *et al.*, 2017). C'est le cas du peptide AahII, issu du venin de scorpion Aah. Cette toxine est connue d'être la toxine la plus active du venin. Elle agit en ralentissant l'inactivation rapide des canaux Nav d'où sa classification comme une α -toxine (Clairfeuille *et al.*, 2019). Physiologiquement, les effets se manifestent par des altérations hémodynamiques, une réaction inflammatoire et plus gravement une dysfonction cardiaque ainsi qu'une insuffisance respiratoire suite à la formation d'un œdème pulmonaire. Au cours des années, plusieurs études se sont intéressées par le mode de fonction de cette toxine sur les différentes isoformes des canaux Nav notamment, le canal Nav1.7 (Clairfeuille *et al.*, 2019) mais aucune d'elles n'a rapporté une caractérisation électrophysiologique de l'effet de AahII sur l'isoforme cardiaque Nav1.5. D'autre part et afin de lutter contre l'envenimation par ce scorpion, le nanoanticorps Nb10 neutralisant jusqu'à 7 DL₅₀ l'effet de AahII a été développé par l'équipe de notre laboratoire (Abderrazek *et al.*, 2009). L'efficacité de ce nanoanticorps a été évaluée *in vivo* sur des souris, cependant son mécanisme d'action au niveau cellulaire reste inconnu. Pour apporter plus de clarification à ces deux points, l'objectif de ce volet consiste à :

- Étudier la structure-fonction de la toxine AahII avec le canal Nav1.5 en présence et en absence du nanoanticorps Nb10 par des outils électrophysiologiques et bio-informatiques.

2^{ème} Volet :

La signalisation ionique est assurée par la redistribution des ions entre les compartiments cellulaires suite à l'ouverture des canaux ioniques et elle peut affecter une multitude de processus et de fonctions cellulaires. Parmi ces processus figurent ceux qui sont cruciaux pour le maintien de l'homéostasie tissulaire normale, tels que la survie, la migration/invasion et l'apoptose. Ainsi, une signalisation dérégulée peut altérer ces processus, entraînant la transformation de cellules normales en dérivés malignes (Prevarskaya *et al.*, 2018).

Récemment, plusieurs études se sont focalisées sur l'investigation de la richesse des peptides de différents animaux notamment des scorpions comme agents modulateurs des processus tumoraux (Heinen and da Veiga, 2011 ; Diaz-Garcia *et al.*, 2013). Ces peptides ont la possibilité de moduler l'activité de certains canaux ioniques impliqués directement dans le cancer, notamment, des canaux Na_v (Fraser *et al.*, 2000 ; Schiavon *et al.*, 2006 ; Gu *et al.*, 2013 ; Kampo *et al.*, 2019), potassiques (Jang *et al.*, 2011 ; Urrego *et al.*, 2014) et calciques (Shalabi *et al.*, 2004 ; Shahbazzadeh *et al.*, 2007 ; Schwartz *et al.*, 2009).

En se basant sur les travaux du laboratoire et les données de la littérature, notre 2^{ème} objectif était :

- L'identification de peptides capables de moduler la viabilité, la prolifération ou la migration des deux lignées cellulaires du cancer du sein MCF-7 et MDA-MB-231.
- La caractérisation de l'implication potentielle des canaux ioniques.

Matériels et méthodes

1. Venin de scorpion

1.1. Généralités

Le venin exploité au cours de ce travail vient du scorpion Aah, c'est une espèce de scorpions de la famille des Buthidae très répandue dans le grand Maghreb. L'envenimation par ce venin peut entraîner la mort chez les humains, notamment pour les personnes qui ont une immunité réduite telles que les enfants et les personnes âgées. Le venin de Aah se caractérise par des propriétés physicochimiques très intéressantes : il est stable à pH acide, hydrosoluble et thermorésistant (la toxicité ne disparaît qu'après un chauffage à 100° C pendant 90 min).

Ce venin forme un mélange complexe de substances telles que les protéines, les lipides, les sels, les enzymes, les amines biogènes notamment de la sérotonine (5-hydroxytryptamine), les nucléotides et les neurotoxines.

La principale cause de toxicité de ce venin est due à la présence de toxines qui sont des petites protéines chargées positivement (basiques), faiblement antigéniques et constituées par l'enchaînement d'une soixantaine de résidus d'acides aminés.

1.2. Extraction et préparation

Les scorpions Aah sont collectés de la région de BeniKhedach en Tunisie et maintenus vivants. Au laboratoire, ils ont subi des stimulations au niveau de l'abdomen (55 volts pendant 0,5 s) afin de sécréter le venin, un rendement maximal de 1,5 à 2 mg de venin sec pour chaque animal a été obtenu et conservé à -20°C. Cette étape est assurée par un vétérinaire de l'Institut Pasteur de Tunis.

Le venin brut a été ensuite mélangé avec de l'eau froide à l'ordre de (1:4 Volume/Volume) et centrifugé à 15000 x g pendant 15 min. Le surnageant qui contient la majorité des molécules actives du venin est séparé délicatement.

2. Purification des molécules du venin

La purification du venin se base sur la séparation de ses molécules en utilisant leurs caractéristiques biochimiques. Pour y faire, on a recours à plusieurs techniques de séparations biochimiques.

2.1. Chromatographie à basse pression

C'est une technique de séparation des molécules selon la taille, plus spécifiquement selon leurs rayons de Stokes. En effet, la taille d'une molécule de la même catégorie (fibrillaire ou globulaire) est directement proportionnelle à sa masse, ce qui nous permet de déduire la masse des molécules séparées par cette technique en se référant à la matrice utilisée.

Le dispositif de séparation est formé par une colonne (K26/100) remplie par une matrice de billes poreuses de Sephadex-G50 superfine (Sigma-Aldrich, Prod. Code : G5050) qui assurent la séparation des molécules dont la taille varie entre 1.5 et 30 kDa. Cette dernière est équilibrée par une phase mobile d'acide acétique à 0,1M. Au cours de la séparation, les molécules de très petite taille passent à travers plusieurs pores de billes de sephadex-G50 ce qui retarde leur élution, tandis que les molécules de taille plus importante passent entre les billes pour être éluées plus rapidement (**Figure 19**).

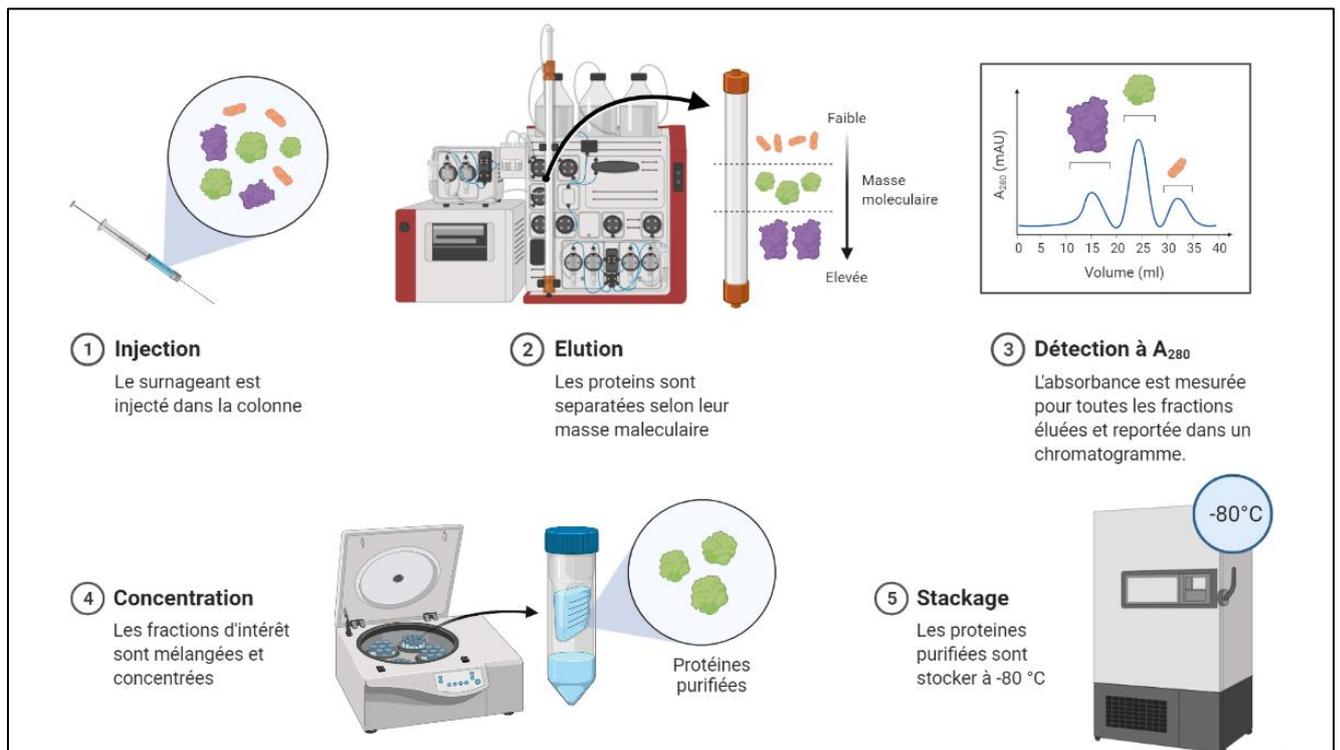


Figure 19 : Illustration du protocole de la chromatographie à basse pression

2.2. Chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC)

C'est une technique analytique de séparation et de quantification des molécules en fonction de leur affinité par rapport à la phase stationnaire. Dans cette configuration, les molécules sont séparées en fonction de leur charge de surface globale.

Le dispositif analytique de la marque ÄKTA™ FPLC System se compose d'une phase mobile formée par une concentration évolutive d'acétate d'ammonium. Une pompe à haute pression assure le passage de la phase mobile en continu dans le système à un débit de 0,5 ml/min. L'échantillon ainsi introduit par l'injecteur, se mélange avec la phase mobile et parcourt une colonne de séparation échangeuse de cation Resource-S (Cytiva, Volume = 1 ml ; Longueur = 30 mm ; I.D. = 6,4 mm) comportant la phase stationnaire. Cette colonne est constituée d'une résine acide chargée négativement qui échange les cations (échanges de molécules chargées positivement). L'élution se fait selon un gradient linéaire d'acétate d'ammonium allant de 0,05 M à 0,5 M pendant 45 minutes. Plus la charge de surface globale de l'analyte est positive, plus il est retenu.

Les molécules éluées seront ainsi détectées au niveau du détecteur à une longueur d'onde de 280 nm. Le signal émis par le détecteur est décodé par un décodeur pour être enfin projeté sous forme d'un chromatogramme sur l'ordinateur.

2.3. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

C'est une technique analytique de séparation et de quantification des molécules en fonction de leur affinité par rapport à la phase stationnaire. Dans cette configuration, les molécules hydrophiles seront éliminées en premier, celles qui sont hydrophobes seront retenues plus longtemps

Le dispositif analytique de la marque Dionex se compose d'une phase mobile formée par un mélange de H₂O et d'acétonitrile à laquelle on ajoute de l'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1%. Dans ce mélange, l'H₂O joue le rôle du tampon très polaire tandis que l'acétonitrile est beaucoup moins polaire. Le TFA est utilisé pour tamponner la phase stationnaire à un pH acide (2 - 3) afin d'optimiser la séparation. Une pompe à haute pression assure le passage de la phase mobile en continu dans le système à un débit de 0,8 ml/min. L'échantillon ainsi introduit par l'injecteur, se mélange avec la phase mobile et parcourt une colonne de séparation C18 (Spherisorb 5 µm, L × I.D. 25 cm × 4.6 mm) comportant la phase stationnaire. Cette colonne est dotée d'une

phase apolaire appelée aussi phase inversée, elle se compose d'une continuité de molécules de silice très polaires rendues apolaires par greffage des chaînes aliphatiques à 18 carbones chacune. L'éluion des molécules se fait en mode gradient en rendant la phase mobile de plus en plus éluante par la diminution de sa polarité (hydrophobicité) (**Tableau 1**). Plus un analyte est apolaire, plus il est retenu. Plus la phase mobile sera rendue apolaire par l'augmentation du pourcentage d'acétonitrile (lors d'un gradient d'éluion), plus elle sera éluante.

Les molécules éluées seront ainsi détectées au niveau du détecteur à deux longueurs d'ondes 214 et 280 nm. Le signal émis par le détecteur est décodé par un décodeur pour être enfin projeté sous forme d'un chromatogramme sur l'ordinateur (**Figure 20**).

Phase stationnaire : Spherisorb C18 5 µm			
Phase mobile : A: Eau-0.1% TFA / B: Acétonitrile-0.1% TFA			
Colonne : L = 25 cm ; I.D. = 4.6 mm			
Conditions chromatographiques :			
Gradient	Min	%A	%B
	0	100	0
	4	80	20
	44	60	40
	49	0	100
	51	0	100
Débit : 0,8 ml/min			
Détection : UV à 214 et 280 nm			

Tableau 1 : Gradient de séparation des molécules par HPLC

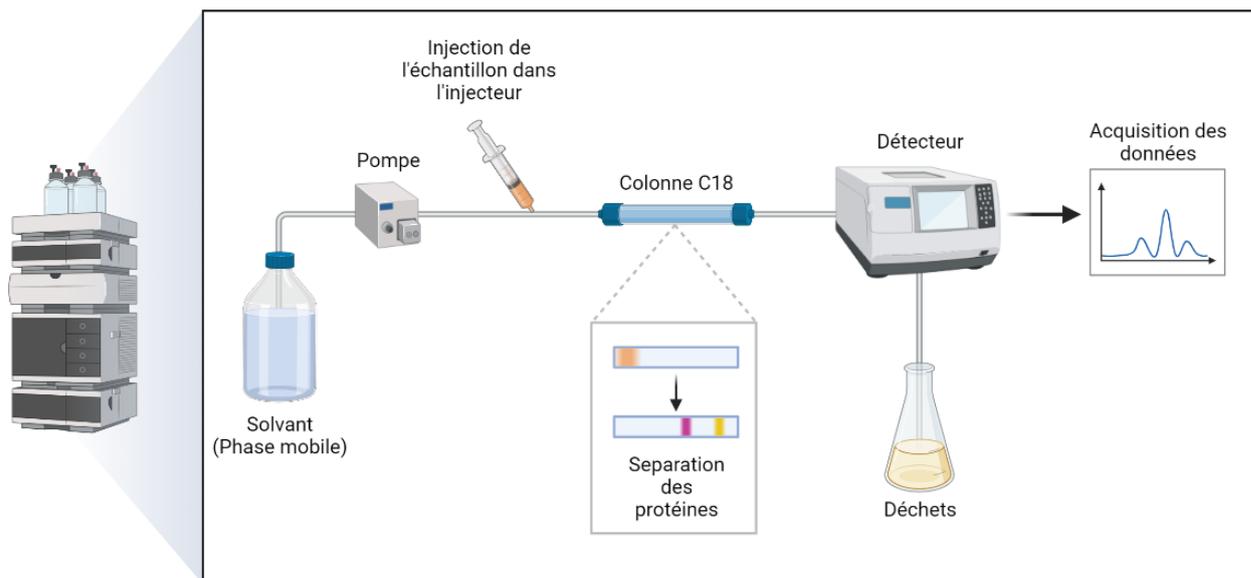


Figure 20 : Illustration du protocole de la HPLC

3. Lyophilisation

La lyophilisation est la technique d'élimination progressive de l'eau dans un produit préalablement congelé sans l'endommager. L'eau dans son état solide (phase solide) se transforme directement en phase vapeur sans passer par la phase liquide. Le diagramme température/pression de l'eau présente un point caractéristique appelé le point triple. Autour de ce point triple, l'eau peut exister à l'état solide, liquide ou gazeux, et en faisant varier la température et la pression, on fait passer l'eau d'un état à un autre

La lyophilisation se déroule sur 3 cycles, la congélation, la sublimation et le piégeage.

Au cours du cycle de congélation l'eau passe de l'état liquide à l'état solide sous l'action de la température, c'est l'étape la plus critique et qui conditionne l'aspect final du produit. Plus le refroidissement est lent plus les cristaux qui vont se former seront petits et nombreux ce qui va aboutir à une qualité du lyophilisat supérieur. Cette qualité est évaluée par son pouvoir à se dissoudre très facilement après le processus de lyophilisation. Pour se faire le produit à lyophiliser est mis dans un tube Falcon de 50 ml $\frac{1}{3}$ rempli et recouvert de parafilm. Le parafilm est percé de multiples trous pour laisser passer la vapeur d'eau pendant l'étape suivante. La congélation est faite par paliers, 2h dans le $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, suivie par une incubation de 3h au $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ et 12h au $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ minimum. Avant de mettre le tube dans le lyophilisateur un dernier passage dans l'azote liquide est réalisé.

Le deuxième cycle du processus de la lyophilisation est la sublimation, au cours de ce cycle, l'eau congelée est éliminée du produit en passant de son état solide à l'état vapeur sous l'action de la basse température et de pression.

L'étape finale de la lyophilisation est le piégeage où l'eau éliminée du produit au cours de la sublimation passe de l'état vapeur à l'état solide sur une surface refroidie.

A la fin de ce processus on obtient le produit dans son état le plus robuste (sec) qui peut se conserver pendant une durée indéterminée ou repris dans le solvant souhaité (PBS 1X en cas de culture cellulaire ou dans le H₂O stérile en cas de purification supplémentaire).

4. Culture cellulaire : modèles, milieu et entretien

4.1. Modèles cellulaires

- MCF-7

Les cellules cancéreuses épithéliales mammaires humaines MCF-7 (ATCC HTB-22) provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection), ont été isolées chez une femme de 69 ans atteinte d'un carcinome canalaire infiltrant. Ces cellules sont adhérentes et appartiennent à un cancer de type luminal d'où le fait qu'elles expriment les récepteurs hormonaux d'œstrogènes (ER+) et de progestérones (PR+) avec une absence du récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2-). Elles sont peu agressives, non invasives et considérées comme ayant un faible potentiel métastatique.

- MDA-MB-231

Les cellules cancéreuses épithéliales mammaires humaines MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) provenant aussi de l'ATCC, ont été isolées chez une femme de 51 ans atteinte d'un carcinome mammaire métastatique. Ces cellules sont adhérentes et appartiennent à un cancer de type basal, triple négatif (ER-), (PR-) et (HER2-). Elles sont dotées d'un caractère invasif d'où le fort potentiel métastatique.

- HEK293

Les cellules rénales embryonnaires humaines 293, également appelées HEK293, proviennent aussi de l'ATCC, sont une lignée cellulaire immortalisée spécifique prélevées sur un fœtus féminin en 1973. Ces cellules sont largement utilisées en raison de leur croissance fiable et de

leur capacité à la transfection. Dans cette thèse, ces cellules ont été transfectées et stabilisées pour surexprimer le canal Nav1.5.

Pour ces 3 lignées cellulaires et afin d'éviter les soucis de prolifération et de réponses des cellules aux traitements causés par les cycles de décollement / ensemencement lors des passages cellulaires, les cellules sont utilisées pendant 30 passages maximum. Des tests mensuels de mycoplasmes sont aussi réalisés.

4.2. Culture cellulaire et milieu de culture

L'ensemble des expériences cellulaires est réalisé dans une salle dédiée, la manipulation des cellules a été faite dans des conditions stériles sous un poste de sécurité microbiologique de niveau 2 (Faster BH-EN-2003-S).

Les cellules MCF-7, MDA-MB-231, HEK293 sont cultivées dans un milieu de croissance cellulaire bien défini, il s'agit du milieu Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) 5% de Sérum de Vœu Fœtal (SVF), Il est constitué de (**Tableau 2**) :

Produits	Pourcentages
H ₂ O (Sigma-Aldrich)	77,08 %
(EMEM) 10X (Lonza)	10 %
Bicarbonate 7,5% (Gibco Life Technology)	2.92 %
HEPES 1 M (Gibco Life Technology)	2 %
AA non-essentiels (=MEM 100X) (Gibco Life Technology)	1 %
L-glutamine 200 mM (Gibco Life Technology)	1 %
Sérum SVF (Gibco Life Technology)	5%

Tableau 2 : Composition du milieu de cultures des cellules MCF-7, MDA-MB-231 et HEK293

Le milieu est changé toutes les 48 heures dans le but de maintenir les cellules dans des conditions de culture et de prolifération optimales. Les cellules sont cultivées dans des flasques T25 puis conservées dans l'incubateur à 5% de CO₂ et à 37°C.

Une fois par semaine (à 80% de confluence), un décollement cellulaire est effectué. Pour se faire, le milieu de culture est retiré, un rinçage des cellules avec le Phosphate Buffer Saline (PBS 1X) (Sigma-Aldrich, France) est réalisé et par application d'un mélange de 400 µl de trypsine-EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid), les cellules se décollent de leur support après une incubation de 4 à 5 min dans l'incubateur. La neutralisation de l'action de la réaction enzymatique de la trypsine-EDTA est faite en ajoutant du 5 ml du milieu de culture. Afin d'homogénéiser et individualiser les cellules, l'ensemble est mélangé mécaniquement par pipetage.

Un comptage de la population cellulaire est réalisé sur lame de Malassez suivi par un ensemencement dans un nouveau flasque ou dans une boîte de pétri en vue d'une expérimentation.

4.3. Congélation et décongélation des cellules

Les cellules sont conservées par congélation à -80 °C ou à l'azote liquide dans un milieu SVF supplémenté par 10% de DiMéthylSulfOxyde (DMSO) de la firme (Sigma-Aldrich, France). Le DMSO est un agent cryoprotecteur qui protège la cellule lors de la déshydratation et le rétrécissement pendant une congélation lente. Pour y faire, les cellules sont décollées et comptées comme il est décrit précédemment, ensuite elles sont reprises dans le milieu de congélation préalablement préparé à raison de 2 millions de cellules par 1 ml. Le mélange est dispatché dans des cryotubes à raison de 1 ml de suspension cellulaire chacun.

En cas de besoin, les cellules à bas passages congelées précédemment sont décongelées suivant un protocole de décongélation bien établi. Il consiste à décongeler le contenu d'un cryotube dans un bain marie à 37°C puis le mélanger dans un tube de 15 ml avec 7 ml de milieu fraîchement préparé. Le mélange est centrifugé à 1000 tours/min pendant 7 minutes pour éliminer le DMSO qui fragilise la paroi cellulaire. Le surnageant est jeté et le culot est repris dans un volume de 5 ml puisensemencé dans un flasque T25 et incubé dans l'incubateur.

Les cellules fraîchement décongelées sont cultivées pendant deux semaines avant le début des expérimentations.

5. Estimation de la viabilité et la mortalité cellulaire

5.1. Test au Bleu de Trypan (BT)

C'est une méthode de coloration des cellules qui permet de mesurer le nombre de cellules vivantes et mortes. Le BT est un colorant perméant à la membrane plasmique et capable de pénétrer de façon passive au niveau des cellules alors que son exclusion est un mécanisme nécessitant de l'énergie. Seules les cellules vivantes, peuvent expulser activement le BT et rester ainsi blanches au microscope alors que les cellules mortes deviendront bleues.

Ce test est effectué sur des cellules cultivées dans des boîtes de pétri de 35 mm de diamètre, dans chaque boîte 30 000 cellules sontensemencées dans 1.5 ml de milieu.

Le surnageant est prélevé en estimant le plus fidèlement possible le volume puis conservé dans un tube Eppendorf de 2 ml, les cellules décollées par l'ajout de 400 µl de trypsine-EDTA sont ajoutées au surnageant déjà prélevé.

Après homogénéisation, 200 µl de surnageant contenant les cellules est mélangé avec 50 µl de BT. Ce mélange est préparé 3 fois dans 3 tubes Eppendorf de 1.5 ml.

Un comptage de nombre des cellules mortes (bleues) et vivantes (blanches) de chaque tube est réalisé sur lame de Malassez et une moyenne est ainsi calculée.

- Le nombre total de cellules est calculé par la formule suivante :
Nombre de cellules comptées x 4 x (volume estimé + 400 µl)
- Le pourcentage de cellules mortes :
Nombre de cellules mortes/nombre total de cellules x 100
- Le nombre de cellules vivantes :
Nombre de cellules non colorées x 4 x (volume estimé + 400 µl)

5.2. Test de métabolisation de MTT

C'est un test colorimétrique permettant de révéler les cellules métaboliquement actives et donc vivantes d'une population cellulaire. Il se base sur l'activité d'une enzyme mitochondriale nommée la succinate déshydrogénase qui métabolise le MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5 diphényltétrazolium bromide) en sels de formazan qui forme à son tour des cristaux de couleurs mauves insolubles dans le milieu. Dans le DMSO, ce précipité se dissout et donne une coloration violette.

Le MTT est une molécule photosensible, commercialisée sous forme de poudre (Sigma-Aldrich). Elle est solubilisée dans le milieu de culture à une concentration de 0,5 mg/ml.

Ce test est réalisé dans des plaques 6 puits (Thermo Scientific, Nunc Cell Culture Plastics, Roskilde, Denmark) pour culture cellulaire. Le milieu de culture est retiré et 800 µl de MTT (préalablement solubilisé dans du milieu de culture) est ajouté. Après incubation des cellules pendant 45 min dans l'incubateur, le MTT est éliminé et 800 µL de DMSO est ajouté sous PSM ou sorbonne. Quelques reflux de pipetage sont exercés pour dissoudre le formazan et le contenu de chaque puits (800 µl) est divisé en 4 puits d'une plaque 96 puits (Greiner Bio-one, Sigma-Aldrich, France) à l'ordre de 200 µL par puits. La densité optique (DO) de chaque puits de la plaque 96 puits est lue au spectrophotomètre (Infinite F200 PRO, TECAN, logiciel i-contrôle) à une longueur d'onde de 550 nm.

6. Etude de la migration cellulaire

6.1. Test de cicatrisation de blessure

Le test de cicatrisation, consiste à faire une lésion mécanique à l'aide d'un objet pointu (ex : cône) une rangée de cellules dans un tapis cellulaire à confluence. En observant au cours du temps la réponse des cellules restantes (la « cicatrisation ») à cette « blessure », on mesure qualitativement la capacité des cellules à migrer de façon directionnelle pour restaurer l'intégrité de la monocouche.

Ce test est réalisé dans des boîtes de pétri de 35 mm, la blessure est prise en photo à 0h, 6h, 12h et 24h par une caméra reliée à un microscope inversé (X400, Nikon eclipse TS100, Champigny sur Marne, France) à un grossissement X20. Le pourcentage de cicatrisation est évalué par le traitement d'image en utilisant le programme ImageJ en calculant l'aire de la blessure au cours du temps puis en évaluant le pourcentage de cicatrisation (**Figure 21**).

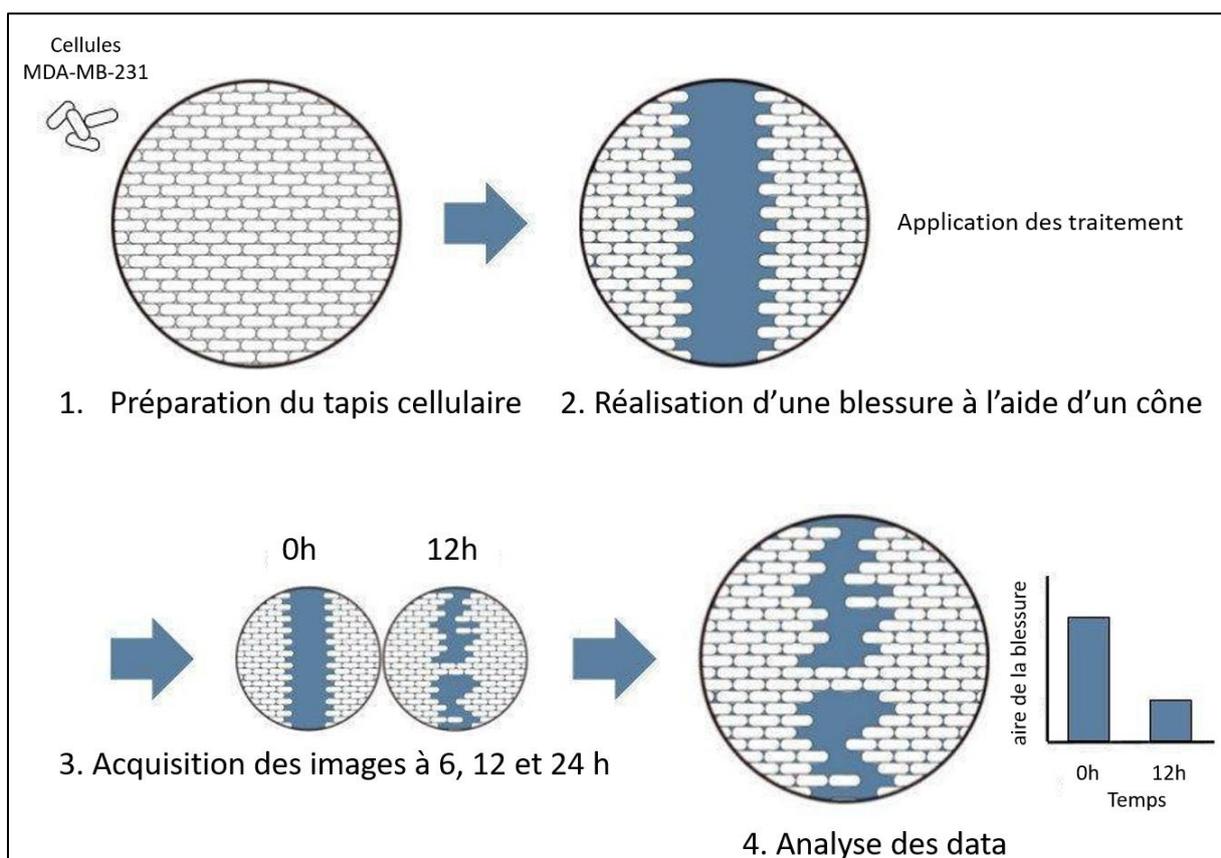


Figure 21 : Schématisation du test de cicatrisation (www.trends.medicaexpo.fr, Test de cicatrisation)

6.2. Etude de la migration cellulaire par chambre de Boyden

L'évaluation de la migration cellulaire est faite par l'utilisation d'inserts de migration (BD FALCON™ Cell Culture Inserts, BD Biosciences, Le pont de Claix, France) ou chambres de Boyden. Ces inserts se caractérisent par un fond constitué d'une membrane de polyéthylène téréphtalate (PET) présentant des pores de 8 µm de diamètre. Le diamètre de ces pores ne permet pas aux cellules non-migrantes (incapables de se déformer) de le traverser. La capacité migratoire des cellules est évaluée par le comptage de celles qui ont traversé les pores.

En pratique l'insert est positionné dans un puits de plaque de culture cellulaire 24 puits (BD FALCON™, Réf. 353047, BD Biosciences, Le pont de Claix, France). La membrane de PET de l'insert délimite les deux compartiments du dispositif. Au niveau du compartiment du dessus, 40000 cellules re-suspendues dans 200 µl de milieu à 0% de SVF ont étéensemencées tandis que 800 µl de milieu à 5% de SVF a été placé dans le compartiment du dessous pour favoriser le chimiotactisme vers le bas. Le dispositif est ainsi placé dans l'incubateur pendant 24h à 37°C et 5% CO₂. Le lendemain, les inserts sont récupérés et le milieu de culture est éliminé. Ils sont ensuite rincés au PBS (Sigma-Aldrich, France) pendant 2 min. Une étape de fixation au méthanol 100% (Sigma-Aldrich, France) pendant 10 minutes est indispensable pour fixer les cellules avant de passer à la coloration par l'hématoxyline (Sigma-Aldrich, France) qui dure 5 minutes. L'excès de colorant est éliminé par 3 lavages successifs à l'eau de 2 minutes chacun. Les cellules n'ayant pas migrées sont éliminées de la face interne de l'insert à l'aide d'un coton-tige.

Après l'ajout de 200 µl de PBS pour hydrater les cellules, le comptage des cellules migrantes (se trouvant à la face externe de la chambre de boyden) est fait par un microscope inversé (X400, Nikon eclipse TS100, Champigny sur Marne, France) à un grossissement X20. Le nombre de cellules est estimé par le comptage de 20 champs sur l'ensemble de l'insert (**Figure 22**).

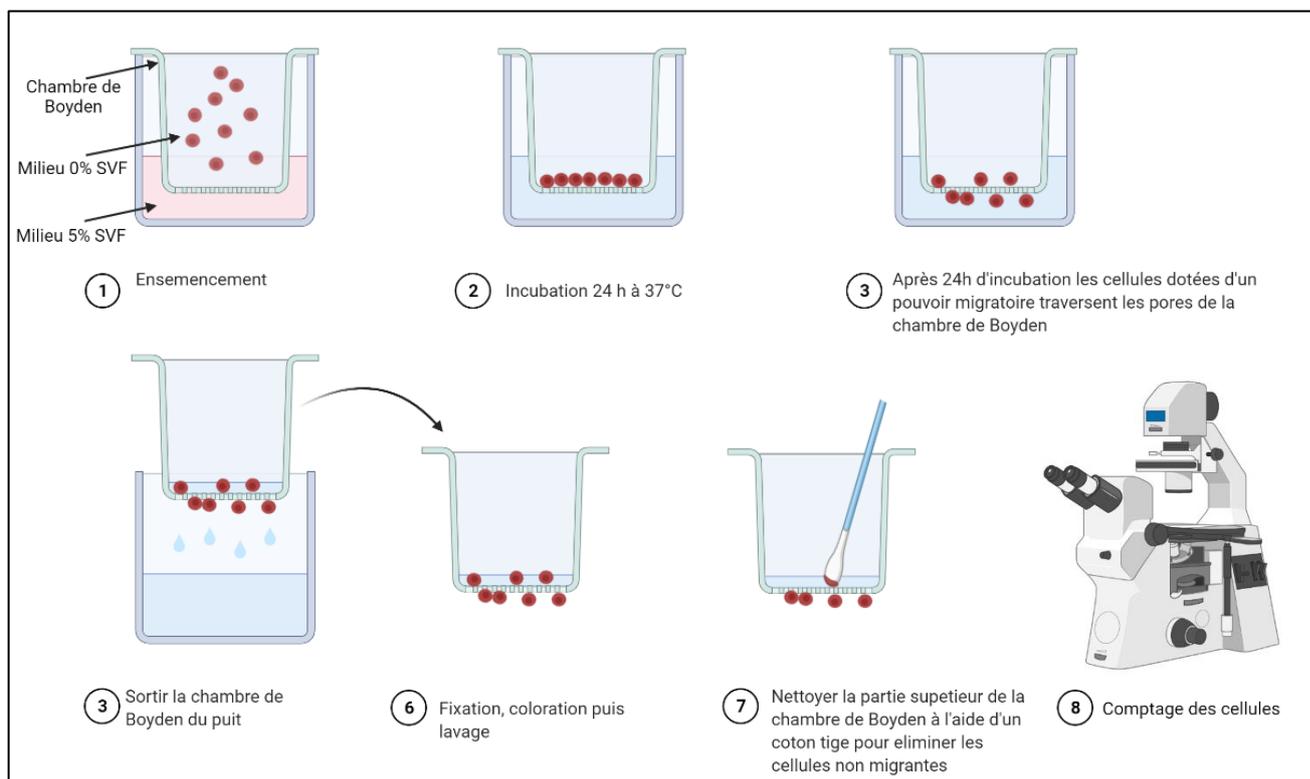


Figure 22 : Schématisation du protocole de la migration cellulaire par la technique de la chambre de Boyden

6.3. Etude de l'invasion cellulaire par chambre de Boyden avec le matrigel

Suivant le même principe de migration par la chambre de Boyden, l'évaluation de l'invasion cellulaire est faite par l'utilisation d'inserts d'invasion (BD FALCON™ Cell Culture Inserts, BD Biosciences, Le pont de Claix, France) ou chambres de Boyden avec matrigel. Ces inserts se caractérisent par un fond constitué d'une membrane de PET présentant des pores de 8 µm de diamètre, couverte d'une couche de matrigel à sa face interne. Les cellules dotées d'un pouvoir invasif doivent dégrader la couche du matrigel et se déformer pour traverser les pores. La capacité invasive des cellules est évaluée par le comptage de celles qui se trouvent à la face externe de l'insert.

En pratique l'insert est positionné dans un puits de plaque de culture cellulaire 24 puits (BD FALCON™, Réf. 353047, BD Biosciences, Le pont de Claix, France). La membrane de PET de l'insert couverte du matrigel délimite les deux compartiments du dispositif. Au niveau du compartiment du dessus, 40000 cellules re-suspendues dans 200 µl de milieu à 0% de SVF ont été ensemencées tandis que 800 µl de milieu à 5% de SVF a été placé dans le compartiment du

dessous pour favoriser le chimiotactisme vers le bas. Le dispositif est ainsi placé dans l'incubateur pendant 24h à 37°C et 5% CO₂. Le lendemain, les inserts sont récupérés et le milieu de culture est éliminé. Ils sont ensuite rincés au PBS (Sigma-Aldrich, France) pendant 2 min. Une étape de fixation au méthanol 100% (Sigma-Aldrich, France) pendant 10 minutes est indispensable pour fixer les cellules avant de passer à la coloration par l'hématoxyline (Sigma-Aldrich, France) qui dure 5 minutes. L'excès de colorant est éliminé par 3 lavages successifs à l'eau de 2 minutes chacun. Les cellules n'ayant pas migrées sont éliminées de la face interne de l'insert à l'aide d'un coton-tige.

Après l'ajout de 200 µl de PBS pour hydrater les cellules, le comptage des cellules invasives (se trouvant à la face externe de la chambre de Boyden) est fait par un microscope inversé (X400, Nikom eclipse TS100, Champigny sur Marne, France) à un grossissement X20. Le nombre de cellules est estimé par le comptage de 20 champs sur l'ensemble de l'insert (**Figure 23**).

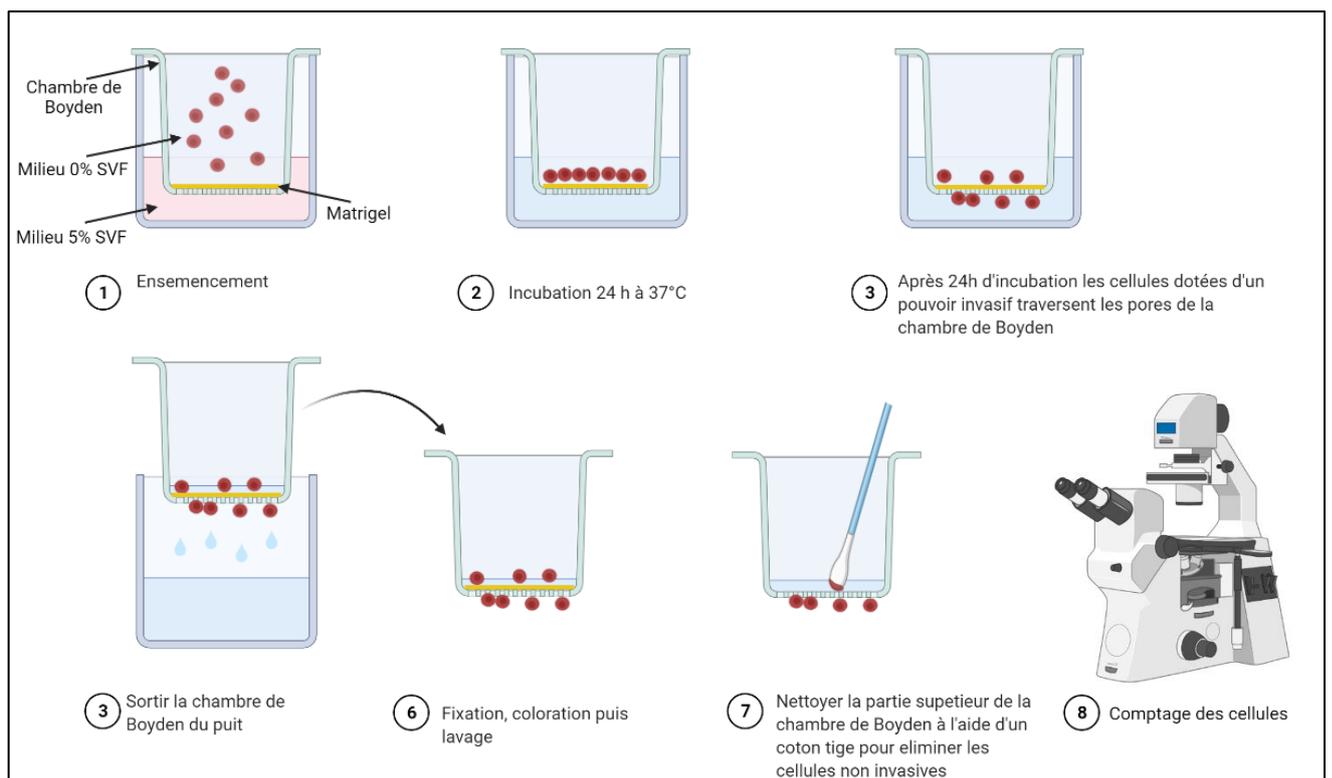


Figure 23 : Schématisation du protocole de l'invasion cellulaire par la technique de la chambre de Boyden

7. Production et purification du Nb10

Une mini-culture de 1 ml de la souche *E. Coli WK6* transformée par le plasmide pHEN6 codant pour la protéine de Nb10 a été préparée. Le lendemain 100 µl de la mini-culture ont été ajoutés au 1L de milieu TB ampicilline additionnée par 1% de glucose et placés à 37°C avec une agitation de 200 rpm. Lorsque la DO à 600 nm atteint 0,3-0,4, on induit la production avec 1 mM d'IPTG suivie d'une incubation de 16h sous agitation à 190 rpm à 28°C. L'IPTG est un analogue structural du lactose capable d'induire l'opéron lactose sans être métabolisé. En absence de lactose, le gène Lac I code pour une protéine qui réprime l'opéron. En présence de lactose, celui-ci vient se fixer sur le répresseur et l'inhibe. La transcription de la protéine d'intérêt peut alors se faire.

La culture bactérienne ainsi obtenue est centrifugée à 4 °C pendant 15 min à 5000 rpm et le culot contenant les cellules est récupéré. L'extraction des protéines périplasmiques est faite par choc osmotique. Pour y faire, les bactéries sont re-suspendues dans 1/200^{ème} du volume initial de tampon TES (Tris-HCl 200 mM, EDTA 0,5 mM, Sucrose 500 mM) pendant une heure. On ajoute ensuite deux fois un volume de TES/4. Les cellules sont incubées 45 min à froid puis centrifugées 45 min à 8000 rpm, 4°C. A la fin de cette étape, les protéines d'intérêt se trouvent donc au niveau du surnageant tandis que le culot contient les débris cellulaires.

La purification de la protéine recombinante du nanoanticorps Nb10 fusionnée à la queue poly histidine a été réalisée par chromatographie d'affinité. La sépharose chargée par le nickel possède la propriété d'interagir avec le motif des 6 Histidines.

L'extrait périplasmique obtenu à partir d'un litre de culture est d'abord purifié sur gel Ni-NTA (Super flow Qiagen, Courtaboeuf, France), préalablement équilibré dans un tampon PBS. L'extrait périplasmique est incubé avec le gel sous agitation pendant 1 h à 4°C. Le tout est déposé sur colonne PD 10 (Amersham Biosciences, Amersham, Royaume-Uni). L'ensemble est ainsi lavé par 20 fois le volume des billes de sépharose par le PBS 1X (Sigma-Aldrich, France) sous l'effet de la gravité. L'étape de lavage se termine lorsque la DO à 280 nm de la dernière gouttelette de l'éluat s'approche de 0. L'éluat des fragments d'anticorps liés aux ions Ni a été effectuée en ajoutant 5 ml de PBS/imidazole concentré à 500 mM. La solution ainsi obtenue est concentrée sur des colonnes Vivaspin6 à cut-off de 5 kDa (Sigma-Aldrich, France). La pureté des fragments est évaluée par gel SDS-PAGE (**Figure 24**).

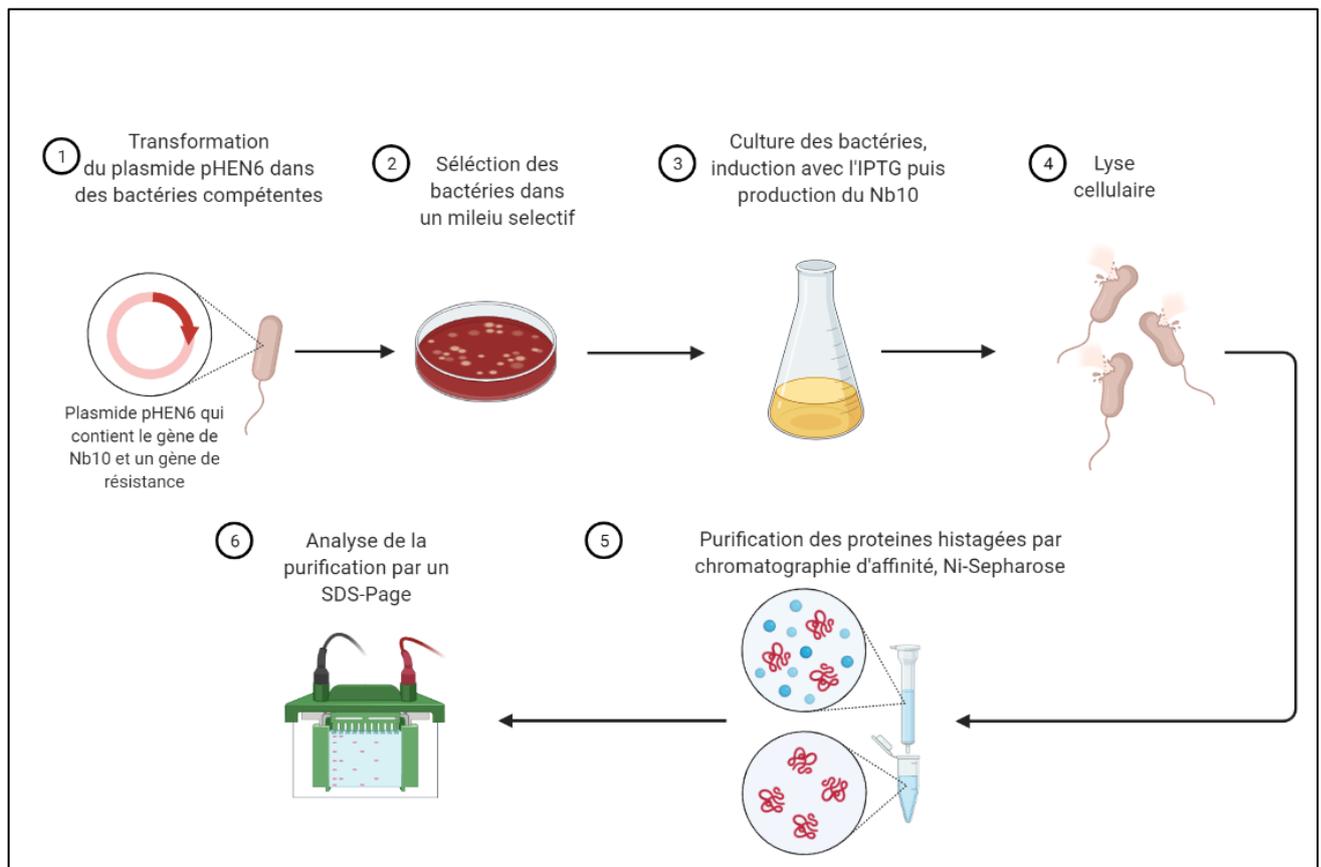


Figure 24 : Schématisation du protocole de la production et la purification du Nb10

8. Patch clamp

Les cellules HEK293 exprimant de manière stable le canal Nav1.5 ont été généreusement offertes par le professeur Hugues Abriel (Institut de biochimie et de médecine moléculaire, Université de Berne, Suisse). Ces cellules ont été cultivées dans des boîtes de Petri de 35 mm à une densité de 1×10^4 cellules au moins 2 jours avant les expériences de patch-clamp. Avant l'enregistrement, les cellules ont été lavées avec une solution saline utilisée comme milieu extracellulaire pour les conditions de contrôle (**Tableau 3**). Les enregistrements par patch-clamp des cellules entières ont été obtenus à l'aide d'un amplificateur de patch-clamp (Axon Axopatch 200B, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Toutes les expériences électrophysiologiques ont été réalisées à température ambiante. L'enregistrement des cellules entières par la technique de patch-clamp a été fait avec des pipettes sans revêtement (Hirschmann®, Laborgerate, Eberstadt, Allemagne) avec une résistance comprise entre 3 et 5 M Ω remplies par un milieu intra-pipette (**Tableau 4**). La résistance du joint était généralement supérieure à 1 G Ω avant la rupture de la membrane pour accéder à la configuration de la cellule

entière. La perfusion de différentes concentrations d'AahII et de Nb10 a été réalisée à l'aide d'un système de perfusion avec un débit de 5 ml/min. Les courants ont été enregistrés à la fréquence de 0,2 Hz. Les signaux ont été filtrés à 1 kHz et numérisés à 5 kHz. Les cellules ont été clampées en tension à -140 mV, et les courants Na⁺ ont été enregistrés après dépolarisation de la membrane de -140 à -40 mV pendant 200 ms toutes les 5 s. La capacité des cellules n'a pas été compensée. Les données ont été analysées à l'aide du programme Clampfit 10.7 (Molecular Devices, Inc., San Jose, CA, USA), puis tracées dans le programme OriginPro 2018 (Software, Inc., USA). La valeur de la constante de temps d'inactivation (tau) est calculée directement à l'aide d'un ajustement de la fonction exponentielle simple sur Clampfit 10.7 (Molecular Devices, Inc., San Jose, CA, USA).

Composant	Concentration (mM)
Na-gluconate	150
K-gluconate	5
Mg-gluconate	2
Ca-gluconate	2
HEPES	10
Glucose	5

Tableau 3 : Composition du milieu extracellulaire utilisé en Patch-clamp.

Le milieu est préparé avec de l'eau 18 MΩ et le pH est ajusté à 7,4 par une solution de NaOH à une concentration de 1M. l'osmolarité finale du milieu est de 337 mOsm/l.

Composant	Concentration (mM)
Na-gluconate	8
Cs-méthane sulfonate	145
EGTA	10
HEPES	10

Tableau 4 : Composition du milieu intracellulaire (intra pipete) utilisé en Patch-clamp.

Le milieu est préparé avec de l'eau 18 MΩ et le pH est ajusté à 7,2 par une solution de NaOH à une concentration de 1M. l'osmolarité finale du milieu est de 326 mOsm/l.

9. Etude de l'expression des gènes des canaux ioniques :

L'étude transcriptionnelle des protéines au cours de cette thèse est faite par Réaction en Chaîne par Polymérase Quantitative (qRT-PCR) nommée aussi PCR en temps réel. C'est une technique particulière de PCR permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN en mesurant le nombre d'amplicons défini par un couple d'amorces. La qRT-PCR se fait ainsi sur l'Acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) qui nécessite plusieurs étapes pour l'avoir.

9.1. Extraction des Acides ribonucléiques (ARN) totaux :

L'extraction des ARN à partir des cellules cultivées dans les boîtes de pétri 35 mm se fait suivant un protocole strict. Tout d'abord un nettoyage total des matériels à utiliser et de l'espace de manipulation par RNase Away est fait, ce produit est un inhibiteur d'RNase qui permet de protéger l'ARN d'intérêt.

Après avoir retiré le milieu de culture et effectué un lavage au PBS, les cellules adhérentes sont traitées par 250 µl de Trizol (Tri Reagent, Sigma-Aldrich, France) pendant 5 min sur la glace sous hotte chimique. Cette étape a pour intérêt de lyser les cellules, d'autre part la glace permet de réduire l'activité de RNase. La boîte est ainsi grattée par un cône et le mélange est récupéré dans un tube Eppendorf 1.5 mL autoclavés.

Pour 500 µl de Trizol initial, un volume de 100 µl de 1-bromo-3-chloropropane est ajouté sous hotte chimique pour séparer l'ARN des autres composés. Le mélange est vortexé puis centrifugé à 12000 x g à 4°C pendant 15 min. Trois phases se forment, une phase supérieure aqueuse contenant les ARN, une interphase de couleur blanche contenant les protéines et une phase organique de couleur rose contenant les débris cellulaires. La phase supérieure contenant les ARN est délicatement récupérée dans un nouveau tube en évitant le maximum de la mélanger avec les autres phases.

L'ARN est ainsi précipité par l'ajout de 500 µl d'isopropanol, une centrifugation à 12000 x g à 4 °C pendant 15 min permet d'avoir le culot d'ARN. Ce dernier subit 2 lavages à l'éthanol 70% de 1 mL chacun ensuite laissé sécher à l'air libre.

Le culot sec est re-suspendu dans 21 µl de H₂O RNase free puis dosé par Nanodrop (ThermoScientific), ce dosage permet de savoir la concentration et le niveau de pureté du produit. L'ARN est ensuite stocké à -20 °C

9.2. Transcription Reverse par Réaction en Chaîne par Polymérase (RT-PCR) :

C'est l'étape permettant d'avoir l'ADNc à partir de l'ARN. Elle est réalisée en utilisant le kit (High Capacity cDNA Reverse Transcription, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). Chaque réaction est faite dans un tube PCR contenant 2 µg d'ARN dilué dans 13.2 µl d'eau, 2 µl de tampon de RT, 2 µl d'amorces "Random Primer", 0.8 µl de mélange de quatre désoxyribonucléotides "dNTP", 1 µl d'enzyme inhibitrice d'RNase et 1 µl de l'enzyme rétro-transcriptase "Multiscribe". Afin de faciliter et homogénéiser la manipulation un mix avec ces proportions est préparé puis dispatché à l'ordre de 7.8 µl par réaction. Le volume total de la réaction est de 20 µl.

Le tube est ainsi placé dans le thermocycleur (Mastercycler gradient, Eppendorf, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne), la réaction dure pendant deux heures et demi contrôlée par le programme RT qui comprend une phase d'hybridation des amorces sur l'ARN (10 minutes, 25°C), une phase de synthèse d'ADNc par rétro-transcription (2h, 37°C) et une phase de désactivation de l'enzyme (5 minutes, 85°C). Les échantillons sont conservés à 4 °C.

9.3. Amplification génique par qRT-PCR :

La q-PCR ou qRT-PCR repose sur le même principe que la PCR classique qui se résume à l'amplification génique *in-vitro*. La particularité de la q-PCR c'est qu'elle permet de mesurer la quantité initiale d'ADNc (précédemment produite par RT-PCR) qui se rapporte directement à la quantité d'ARN produit lors de l'expression d'un gène donné. La réaction nécessite un couple d'amorce spécifique (sens et antisens) pour chaque gène (**Tableau 5**). La détection et la quantification sont faites en temps réel par mesure de la fluorescence du SYBR Green (SYBR Green I Master, Light Cycler, Roche, France). C'est un agent intercalant entre les doubles brins d'ADN qui émet une fluorescence à une longueur d'onde de 520 nm lorsqu'il est fixé à une molécule d'ADN double brin, en outre il est non fluorescent à son état libre. La fluorescence émise en fonction de la quantité d'ADNc néosynthétisée est mesurée à chaque cycle par un microspectrofluorimètre couplé au thermocycleur à capillaire (Light Cycler 480 II, Roche, France). L'intensité de fluorescence est indirectement proportionnelle à l'expression du gène d'intérêt.

Les réactions sont faites dans une plaque de 384 puits (Light Cycler, Roche, France), chaque réaction est réalisée dans un puits contenant 2 µl d'ADNc préparé précédemment dilué au 1/20

et 7.2 µl de Mix. Le mix est préparé pour chaque gène, il est constitué de 0.5 µl de chaque amorce (sens et anti-sens) dilué à 10 µM, 4.6 µl de Syber Green et 1.6 µl de H₂O (RNase DNase free, Sigma-Aldrich, France). Le volume total de la réaction est de 9.2 µl.

Avant d'être mise dans le thermocycleur, la plaque est recouverte d'un film ultra-transparent, vortexée et centrifugée.

Le programme d'amplification comporte quatre phases. Une phase de dénaturation (5 min à 95 °C), pendant cette phase les doubles brins d'ADNc se séparent. Une phase d'hybridation des amorces sur le simple brin d'ADN (15 s à 60 °C) suivie d'une phase d'amplification (20 s à 72 °C) durant laquelle la quantification est réalisée. Le cycle comportant ces 3 phases est répété 45 fois. La phase finale étant la phase de fusion au cours de laquelle la température monte de 72 °C à 95 °C par palier de 0.1 °C et en faisant de l'acquisition de l'intensité de fluorescence en continu. Cette phase sert à obtenir une courbe de fusion en fin de la manipulation de quantification qui permet de vérifier qu'il n'y a qu'un seul amplicon.

Les résultats sont ainsi récupérés sous forme de courbes où il est déterminé le cycle seuil (Ct) qui correspond à la valeur du nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base de bruit de fond.

Le gène de référence utilisé dans toutes les manipulations est le GAPDH en raison de son expression stable dans les cellules MDA-MB-231.

Gène cible	Amorces
GAPDH	Sens : AGGGGCCATCCACAGTCTTC Anti-Sens : AGAAGGCTGGGGCTCATTTG
ORAI 1	Sens : AGGTGATGAGCCTCAACGAG Anti-Sens : CTGATCATCATGAGCGCAAACAG
STIM 1	Sens : GAGGCCTTGAGGAAAGCAGAG Anti-Sens : GCGCCAGTAATGCCTTCTTG

Tableau 5 : Séquence des amorces utilisées pour la q-PCR

10. Imagerie cellulaire par fluorescence : Etude de la concentration cationique intracellulaire :

10.1. Principe :

C'est une technique de physiologie cellulaire qui permet de mesurer indirectement et en temps réel la variation du calcium intracellulaire. Elle se base sur l'utilisation d'une sonde fluorescente qui chélate le calcium. Cette sonde se caractérise par un spectre d'excitation bien défini selon son état (libre ou lié), une fois excitée elle émet un signal à une longueur d'onde appelée longueur d'onde d'émission.

Durant mes travaux de thèse, on s'est intéressé à l'étude de la variation calcique intracellulaire. Pour cela on a utilisé la sonde Fura-2 (Sigma-Aldrich, France). C'est la principale sonde calcique utilisée lors des expérimentations d'imagerie calcique avec une constante de dissociation au calcium de 135 nM (Jackson *et al.*, 1987). Elle possède deux longueurs d'ondes d'excitation en fonction de son état de liaison au calcium. En effet, à l'état libre la Fura-2 est excitée à une longueur d'onde de 380 nm (**F₂**). La fixation du calcium sur la Fura-2 engendre une modification de son environnement électrostatique ce qui se traduit par la modification du son spectre d'excitation, elle sera donc excitée à 340 nm (**F₁**). La Fura-2 émet un signal à une longueur d'onde de 510 nm indépendamment de sa longueur d'onde d'excitation (**Figure 25**).

Afin d'étudier le calcium intracellulaire la sonde Fura-2 doit s'introduire au niveau cytoplasmique, pour cela on utilise la forme Fura-2-AM. C'est une sonde Fura-2 où il est attaché un groupement Acétyle-Méthyle (AM), ce groupement la rend lipophile et la permet alors de passer la membrane plasmique. Une fois à l'intérieur de la cellule ce groupement est clivé par les estérases cytoplasmiques ce qui engendre la séquestration de la Fura-2 à l'intérieur de la cellule à cause de la perte de son pouvoir lipophile.

Les cellules à étudier sontensemencées sur une lamelle de verre (Deckgläser, Knittel GLASS, Braunschweig, Allemagne) placée dans une boîte de pétri 35 mm à une densité de 60 000 cellules (on évite d'utiliser les boites de pétri standard pour culture cellulaire pour ne pas avoir un bruit de fond causé par un signal dû au polypropylène).

Après les différents traitements, les cellules sont incubées avec la Fura-2-AM (diluée dans le milieu d'imagerie) à une concentration de 3.3 μ M pendant 45 min dans l'incubateur.

La Fura-2 est une sonde photosensible, par conséquent la continuité de l'expérience se fait à l'obscurité dans une salle dédiée à l'imagerie cellulaire.

Les lamellesensemencées sont lavées par le milieu d'imagerie 2 mM calcium (**Tableau 6**) et collées à l'aide d'une graisse siliconée sur des boîtes de pétri 35 mm percées au milieu.

Le dispositif d'imagerie se compose d'un microscope inversé à fluorescence (Axiovert 200, Zeiss) relié à un polychromateur (Polychrome V, Till Photonics) émettant simultanément des longueurs d'ondes de 340 et 380 nm et une caméra (Photometric CoolSNAP HQ2) capable d'enregistrer la fluorescence émise par les sondes à 510 nm pour chaque temps. Les images sont ainsi transférées à l'ordinateur et traitées par le logiciel MetaFluor v 6.1 (Meta Imaging Series). Ce logiciel est capable de quantifier la fluorescence émise à 510 nm par les sondes excitées à 340 et 380 nm en faisant le rapport entre ces deux valeurs F340/F380 ce qui nous permet de déduire la variation du calcium intracellulaire. Quand le ratio F340/F380 augmente, la concentration du calcium intracellulaire augmente. Le milieu d'imagerie à différentes conditions est perfusé tout au long de la manipulation avec un système de perfusion couplé à un système d'aspiration permettant un changement rapide des solutions extracellulaires.

Produit	Concentration (mM)
NaCl	145
KCl	5
HEPES	10
D-(+)-Glucose	5
MgCl ₂	2
CaCl ₂	2

Tableau 6 : Composition du milieu physiologique extracellulaire utilisé en imagerie calcique à 2 mM Ca²⁺

Le milieu est préparé avec de l'eau 18 MΩ et le pH est ajusté à 7,4 par une solution de NaOH à une concentration de 1M.

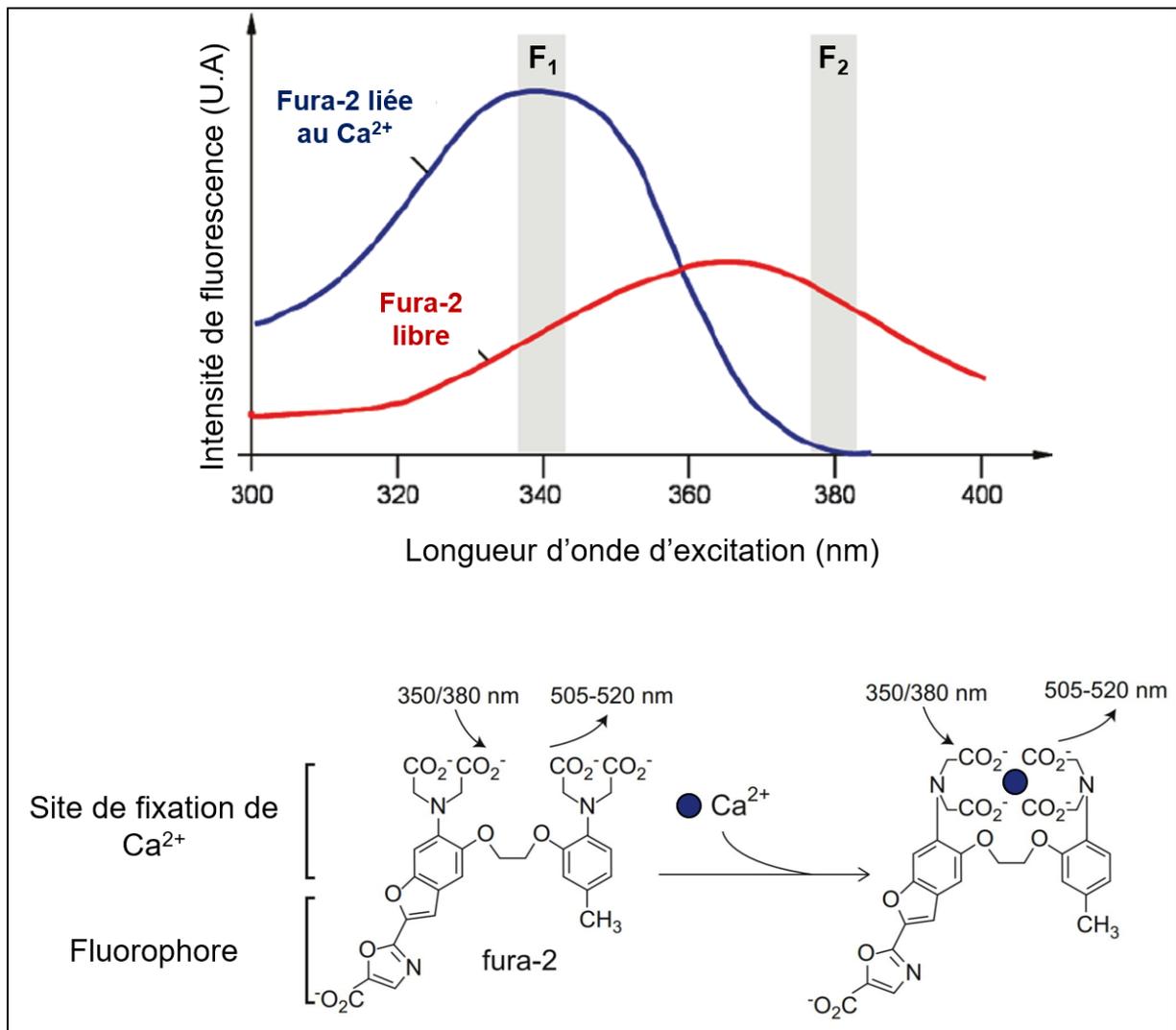


Figure 25 : Structure et principe de fonctionnement de la sonde Fura-2

10.2. Etude du calcium basal et l'entrée calcique *via* les canaux de la membrane cytoplasmique :

Afin d'étudier le calcium basal et l'entrée calcique *via* les canaux de la membrane cytoplasmique, les cellules précédemment traitées sont chargées avec la Fura-2-AM dans un milieu d'imagerie cellulaire (2 mM calcium et magnésium). Après l'incubation pendant 45 min, les lamelles sont préparées et le dispositif d'imagerie est mis en place. Au niveau logiciel, on sélectionne les cellules à enregistrer (40 cellules) et on supprime le bruit de fond. Le protocole commence par la perfusion du milieu extracellulaire physiologique de 2 mM calcium pendant 2 min, le ratio moyen enregistré pour toutes les cellules représente la concentration basale calcique. La deuxième partie du protocole consiste à la perfusion du milieu d'imagerie à 0 mM calcium, ce changement de concentration du calcium engendre un vidange calcique cellulaire.

La troisième partie du protocole dure 10 min, au cours de laquelle on perfuse le milieu d'imagerie à 0 mM calcium supplémenté ou non par 1 μ M de thapsigargine (Tg). La Tg est un inhibiteur non compétitif de la pompe sarco / réticulum endoplasmique Ca^{2+} ATPase (SERCA). L'action de la Tg étant irréversible, elle est donc perfusée pendant les 4 premières minutes seulement, le reste de la troisième partie est perfusé par le milieu d'imagerie à 0 mM calcium. Pendant la quatrième partie du protocole, on perfuse le milieu d'imagerie à 2 mM calcium pendant 8 min. La variation du Ratio F340/F380 nous indique l'entrée calcique guidée par les canaux calciques de la membrane cytoplasmique (puisque la pompe SERCA est bloquée par la Tg). Le protocole se termine par une perfusion par le milieu d'imagerie à 0 mM calcium pendant 8 min.

10.3. Evaluation de l'entrée cationique par le Quench au manganèse :

La technique de Quench manganèse permet d'étudier l'implication de certains canaux ioniques dans l'entrée cationique notamment le calcium. Elle repose sur le suivi de l'extinction "Quench" de la sonde Fura-2 suite à la perfusion d'une solution d'imagerie où le manganèse remplace le calcium.

Étant un cation divalent, le manganèse utilise les mêmes voies d'entrée dans la cellule comme le calcium. Il se caractérise par une constante de dissociation de 2,8 nM comparée à 135 nM pour celle du calcium. Son affinité très élevée au Fura-2 se traduit pour une même concentration des produits, 99% du manganèse se fixe sur la Fura-2. Cette fixation engendre une extinction permanente de la sonde par altération de sa structure. L'excitation de la Fura-2 se fait à 360 nm, cette longueur d'onde correspond au point isobestique entre les formes libres et liées, l'émission de fluorescence étant indépendante de la concentration en calcium cytosolique.

Les cellules préalablement traitées et chargées sont sélectionnées sous microscope inversé à fluorescence (20 cellules). La première partie du protocole dure 2 min où les cellules sont perfusées avec du milieu physiologique supplémenté de 2 mM de calcium et magnésium. Une légère diminution du tracé due à une extinction naturelle de la sonde appelée « bleaching » peut être observée. Cette diminution sera prise en compte dans le traitement des résultats. La deuxième partie du protocole dure 3 min au cours de laquelle les cellules sont perfusées par le milieu d'imagerie où le calcium est remplacé par 2 mM de manganèse. Le manganèse présent dans le milieu extracellulaire va pénétrer au cytosol, entrer en compétition avec le calcium attaché sur la Fura-2 et finir par se lier à cette dernière ce qui cause son extinction. Par

extrapolation avec le calcium, plus l'extinction de la fluorescence est importante plus le flux de manganèse est important et donc plus l'entrée calcique est élevée.

L'analyse des résultats se fait par le calcul de la pente d'extinction pour chaque cellule à partir des tracés obtenus. Pour y faire, on procède au calcul de la pente de bleaching (extinction naturelle de la sonde) et la pente du « quenching » (extinction due à la fixation du manganèse). La soustraction de la valeur moyenne du bleaching de celle du quenching nous permet d'évaluer l'entrée cationique dans les cellules (**Figure 26**).

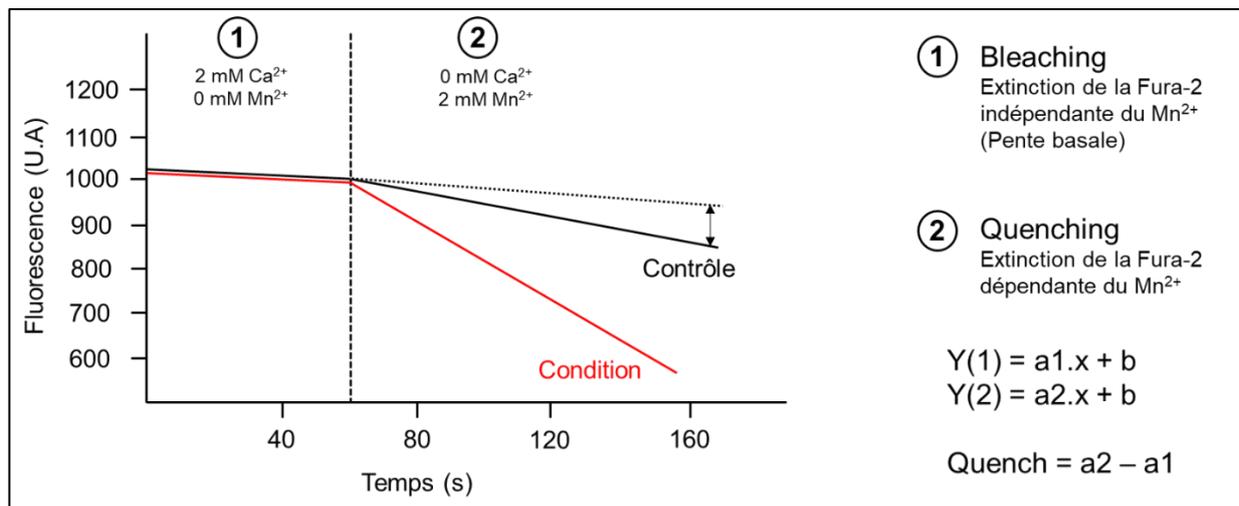


Figure 26 : Méthode d'analyse du Quench au Manganèse

11. Analyse statistique

L'ensemble des expériences sont réalisées au moins 3 fois sur 3 passages différents. Les résultats numériques sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM (erreur standard à la Moyenne) avec n pour le nombre d'expériences réalisées et N pour le nombre de passages cellulaires étudiés. Le logiciel pour tests statistiques utilisé est Sigma Stats 3.0.

Les moyennes de deux groupes à une seule variable sont comparées par le test de Student après vérification de leur distribution selon la loi normale par le test de Kolmogorov-Smirnoff. Lorsque le test de normalité échoue, le test non paramétrique de Mann-Whitney est alors utilisé.

Pour les tests nécessitant de comparer plus de 2 paramètres entre eux, la méthode ANOVA à une ou à deux voies est utilisée. Le seuil de significativité des résultats est représenté comme suit : * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Résultats

Partie I : Caractérisation électrophysiologique, pharmacologique et structurale de l'interaction de l' α -toxine AahII avec le canal Nav1.5 en présence et en absence du nanoanticorps Nb10 (anti-AahII)

L'envenimation par le venin de Scorpion représente un problème de santé publique notamment dans les régions tropicales et subtropicales. Les principaux acteurs responsables des effets des venins sont les neurotoxines. Ces peptides de petites tailles interagissent avec les canaux Nav et provoquent une altération de leurs fonctions ce qui se traduit par de multiples événements physiologiques caractéristiques des symptômes de l'envenimation.

La toxine AahII issue du venin de scorpion Aah est le polypeptide le plus toxique responsable des effets nocifs de ce venin. Cette toxine ralentit la phase d'inactivation rapide des canaux Nav. Afin de lutter contre l'envenimation par le scorpion Aah, le nanoanticorps Nb10 qui neutralise l'effet de cette toxine *in vivo* a été développé.

Les cellules HEK293 stablement transfectées par la sous-unité α de l'isoforme adulte du canal Nav1.5 ont été utilisées pour la caractérisation de l'effet de l' α -toxine AahII sur l'inactivation du canal Nav1.5 et l'impact du nanoanticorps Nb 10 sur cette interaction.

La première étape de ce travail a consisté à purifier la toxine AahII à partir du venin de scorpion Aah et la production du nanoanticorps Nb10.

1. Fractionnement de l'extrait du venin de Aah sur gel de Sephadex-G50 par chromatographie à basse pression

Le venin brut de scorpion Aah est mélangé avec de l'eau froide à l'ordre de (1:4 Volume/Volume) est centrifugé à 15000 x g pendant 15 min. Le surnageant qui contient la majorité des molécules actives du venin est récupéré délicatement.

En suivant le protocole de purification de la toxine AahII mis au point depuis les travaux de (Miranda *et al.*, 1970), le surnageant qui contient la majorité des molécules actives du venin est séparé par une chromatographie à basse pression comme il est décrit précédemment dans la partie « matériels et méthodes ». Cette technique permet de séparer les molécules selon leur taille. L'utilisation des billes de Sephadex-G50 superfine assure la séparation des molécules dont la taille varie entre 1.5 et 30 kDa.

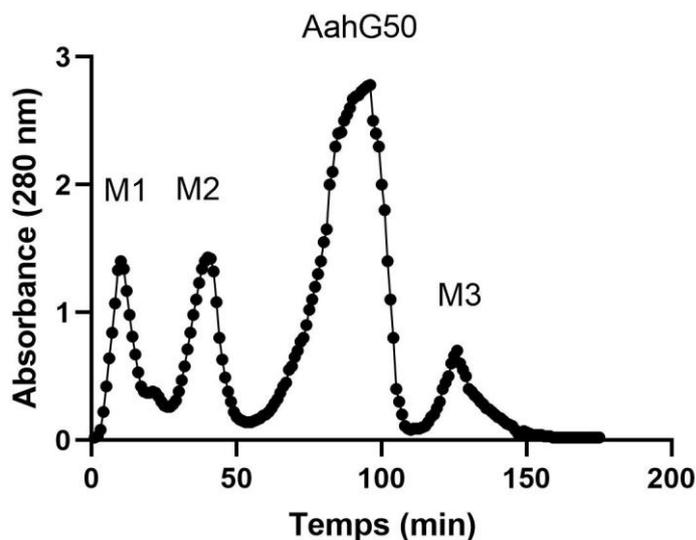


Figure 27 : Profil chromatographique du fractionnement de l'extrait du venin de Aah sur gel de Sephadex-G50 par chromatographie à basse pression

Le profil chromatographique d'élution de l'extrait du venin permet de distinguer quatre fractions essentielles nommées M1, M2, AahG50 et M3 (**Figure 27**). Ces fractions se différencient essentiellement par la masse moléculaire des molécules dont elles sont composées ce qui explique les différences de temps d'élution.

La fraction M1 caractérisée par son temps d'élution très rapide (vers les 10 min), est composée de molécules de masse moléculaire très élevée (≥ 30 kDa).

L'élution de la fraction M2 se fait au bout de 45 min, cette fraction est composée de molécules de masse moléculaire qui varie entre 30 et 14 kDa. Les fractions M1 et M2 sont connues par leur richesse en protéines.

La troisième fraction élue est la fraction AahG50, cette dernière a une taille majoritaire par rapport à celles qui la précèdent. Elle se caractérise par une plus faible masse moléculaire de ses constituants (de 14 à 6 kDa) et contient la majorité des molécules responsables de l'activité toxique de ce venin. La toxine AahII est incluse dans l'ensemble de ces molécules.

Vers la fin de la séparation, une fraction de molécules de faible masse moléculaire (≤ 6 kDa) nommée M3 est élue.

2. Séparation de la fraction AahG50 contenant la toxine AahII par chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC)

Toujours en suivant le protocole de (Miranda *et al.*, 1970) pour cibler la toxine AahII, la fraction AahG50 issue de la purification précédente a subi à son tour un fractionnement selon la charge suivant un gradient linéaire d'acétate d'ammonium par la méthode de FPLC.

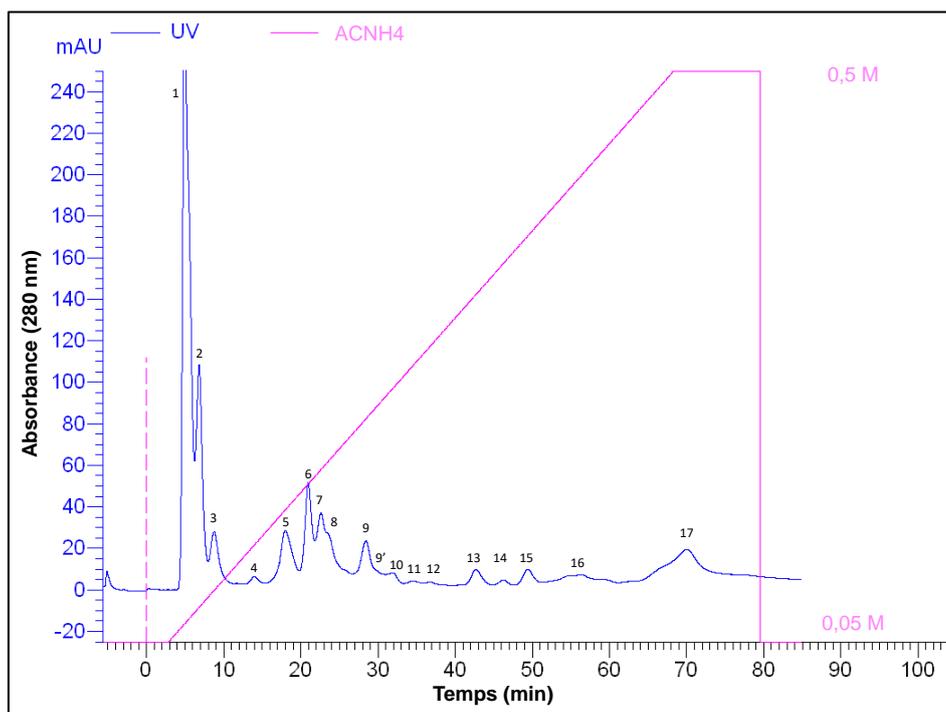


Figure 28 : Profil chromatographique du fractionnement de la fraction toxique AahG50 par FPLC

Le profil chromatographique d'élution de la fraction toxique AahG50 du venin permet de distinguer 17 pics chevauchants numérotés de 1 à 17 (**Figure 28**). Ces pics se différencient essentiellement par la charge des molécules dont elles sont composées ce qui explique les différences de temps d'élution. En se basant sur les travaux de (Abderrazek *et al.*, 2009) et en comparant le temps de rétention et le pourcentage d'acétate d'ammonium d'élution, on détermine que la toxine AahII se trouvait au niveau du pic 9.

3. Purification de la toxine AahII à partir du pic 9 de la FPLC par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

L'étape finale de la purification de la toxine AahII consiste à purifier cette dernière à partir du pic 9 issu de l'étape précédente. Le pic 9 a subi une séparation selon l'hydrophobicité suivant un gradient optimisé allant de 0% à 100% d'Acétonitrile/TFA pendant 51 min.

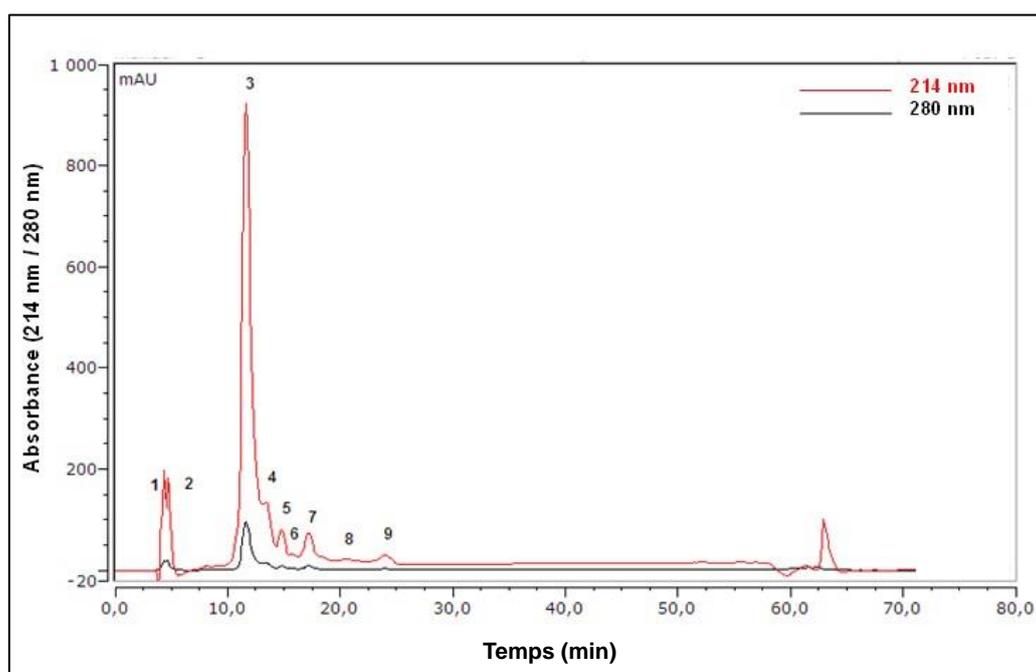


Figure 29 : Profil chromatographique du fractionnement du pic 9 par HPLC

Le profil chromatographique d'élution permet de distinguer un pic majoritaire à la position 3 qui correspond à la toxine AahII (**Figure 29**). Ce pic est récupéré séparément, lyophilisé puis resuspendu dans l'H₂O milli-Q avant d'être dosé et conservé au -20 °C.

4. Production et purification du nanoanticorps Nb10 (Anti-AahII)

La production et la purification du Nb10 ont été faites suivant le protocole détaillé dans la section 7 de la partie « Matériels et méthodes ». Après l'étape de la purification, la qualité de la production et de la purification des fragments obtenus est évaluée par un gel SDS-PAGE à 12% d'acrylamide. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie (**Figure 30**).

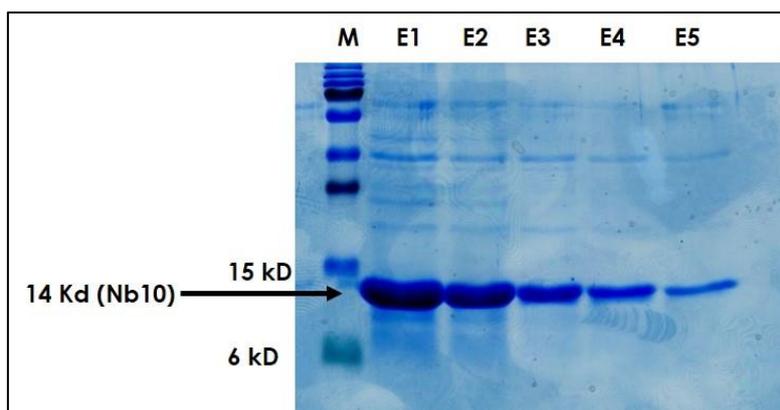


Figure 30 : Profil de migration des protéines d'élué de Nb10 sur gel de polyacrylamide dénaturant à 12 %

M : Marqueur de poids moléculaire ; **E, E2, E3, E4, E5 :** les différentes élué de la purification

Les profils de migration des élués montrent l'apparition d'une seule protéine de 14 kD qui correspond au nanoanticorps Nb10. Les contaminants protéiques présents sont très peu représentés par rapport à la protéine de Nb10 (**Figure 30**).

5. Effet de la toxine AahII sur l'activité du canal Nav1.5

Tout d'abord, nous avons caractérisé électrophysiologiquement par la technique du patch-clamp, l'effet de la toxine AahII purifiée précédemment sur l'activité du canal sodique cardiaque Nav1.5 transfecté et surexprimé dans les cellules HEK293. Pour cela on a enregistré les courants dans une configuration de cellule entière.

Dans les conditions de contrôle, les courants sodiques s'activent rapidement et s'inactivent au bout de 2-3 ms. La perfusion de AahII à des concentrations croissantes ralentit progressivement la cinétique d'inactivation du canal Nav1.5. Ce ralentissement de la phase d'inactivation a été 4,7 et 35 fois plus important en présence de [AahII] à 75, 150 et 300 nM, respectivement, par rapport à la condition de contrôle (**Figures 31 A et B**). L'application de AahII à ces 3 concentrations semble ne pas affecter l'amplitude du courant au pic (**Figure 31 C**). Dans une deuxième série d'expériences, nous avons cherché à savoir si l'effet de l'AahII était réversible. Pour cela nous avons mis au point un protocole de perfusion et de rinçage de la toxine AahII. Après 1 min de perfusion du milieu extracellulaire, la toxine AahII, à une concentration de 75 nM, a été perfusée pendant 7 min, puis rincée avec du milieu extracellulaire (la solution de

contrôle) pendant aussi 7 minutes. (**Figure 31 D**). AahII a ralenti la constante du temps d'inactivation (τ) ($8,3 \pm 0,9$ ms dans les conditions de traitement par AahII à 75 nM au lieu de $3,2 \pm 0,4$ ms dans les conditions de contrôle) (**Figures 31 E et F**). L'inactivation du courant sodique atteint une valeur de $5,2 \pm 1,2$ ms après rinçage de la toxine (**Figures 31 E et F**), suggérant une fixation sur le canal du côté extracellulaire.

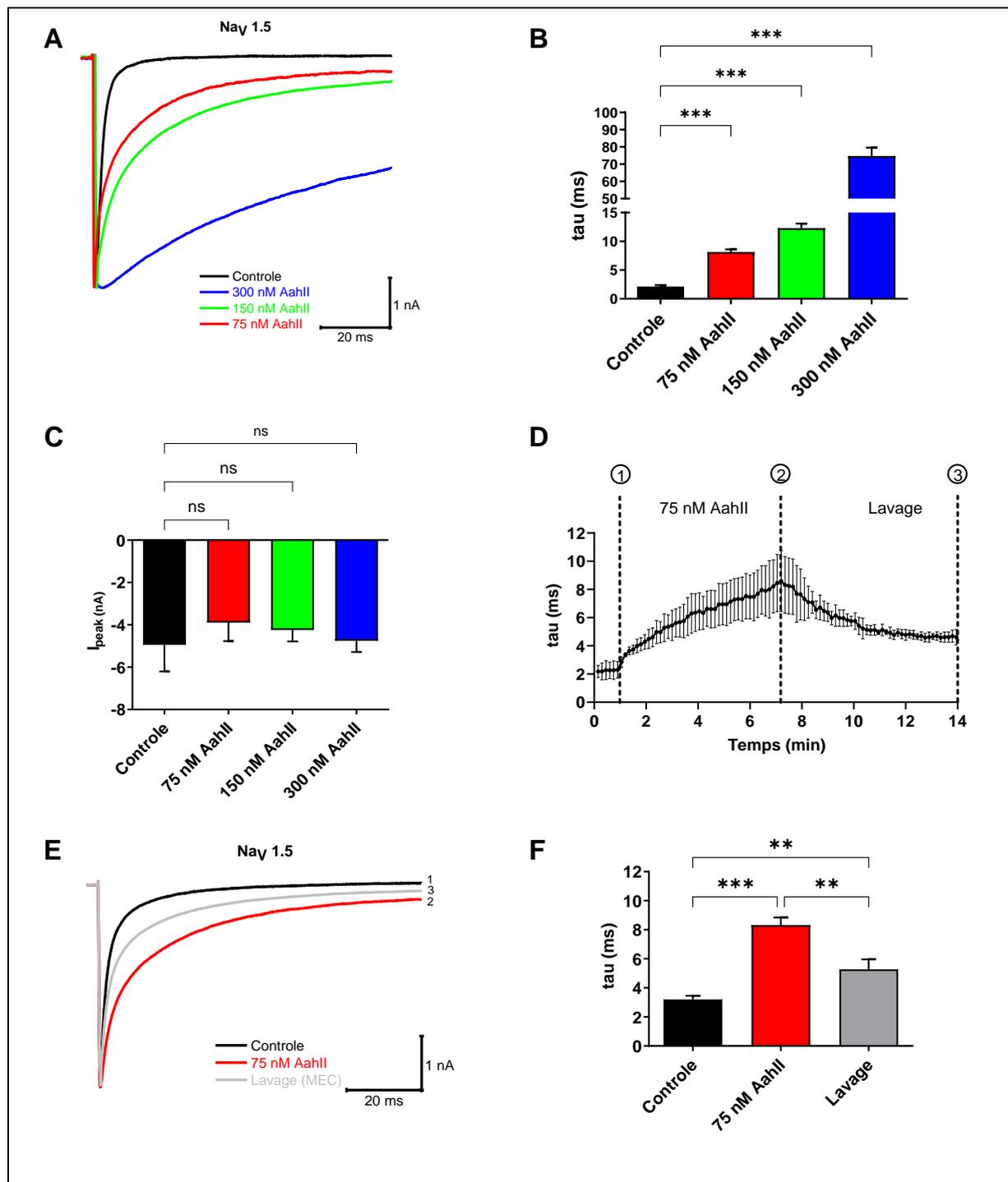


Figure 31 : Effet pharmacologique de la toxine AahII sur le canal Nav1.5 surexprimé dans les cellules HEK293 en incubation et en perfusion

(A) Traces originales du courant Na⁺ enregistrées avec la configuration de cellule entière en condition de contrôle (contrôle = milieu extracellulaire = MEC) et en présence de différentes concentrations de la toxine AahII. (B) Moyenne de la constante de temps d'inactivation du canal Nav1.5 (τ) à la condition de contrôle et après application de la toxine AahII à différentes concentrations (75, 150 et 300 nM), $n = 5$. (C) Moyenne de l'amplitude du courant, I_{peak} (nA), mesurée à -40 mV dans les mêmes conditions que dans le panel (B), $n = 5$. (D) Moyenne de la cinétique de la constante de temps d'inactivation du canal Nav1.5 (τ) après perfusion de la toxine AahII à 75 nM de 1 à 7 min suivie d'un lavage avec MEC jusqu'à 14 min, $n = 3$. (E) Traces originales représentatives du courant Na⁺ enregistrées avec la configuration de cellule entière montrant l'effet réversible de AahII observé dans le panneau (D). Trace 1 : trace de courant enregistrée dans la condition de contrôle, Trace 2 : trace de courant enregistrée à 7 min et qui représente l'effet maximal de la toxine AahII à 75 nM, Trace 3 : trace de courant enregistrée à 14 min après lavage de la toxine AahII, $n = 3$. (F) Moyenne de la constante de temps d'inactivation du canal Nav1.5 (τ) calculée à partir du panel (D). Les valeurs sont représentatives d'expériences indépendantes. Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (Two-way ANOVA, *** $p < 0,001$, ns : Non significatif).

6. Le Nb10 reverse l'effet de l'AahII sur l'inactivation du canal Nav1.5

Dans un second temps nous avons étudié l'effet du nanoanticorps Nb10 seul et combiné avec la toxine sur le courant sodique. Pour cela nous avons testé l'activité des quatre ratios (AahII : Nb10) sur les courants sodiques du canal Nav1.5 enregistrés dans une conformation de cellule entière.

Nos résultats montrent que l'application du Nb10 à des Ratios de 1:4 ([AahII] = 300 nM : [Nb10] = 1.2 μ M), 1:2 ([AahII] = 300 nM : [Nb10] = 600 nM) et 1:1 ([AahII] = 300 nM : [Nb10] = 300 nM) est capable de neutraliser l'effet de la toxine AahII sur l'inactivation rapide du canal Nav1.5 et permet d'obtenir des valeurs comparables aux valeurs de contrôle ($\tau = 2 \pm 0,6$ ms) (**Figures 32 A et B**). En revanche, le Ratio 1:0,5 ([AahII] = 300 nM : [Nb10] = 150 nM), réduit seulement l'effet de la toxine sur l'inactivation sans le neutraliser (**Figures 32 A et B**). On note également que ni le Nb10 seul ni les complexes AahII-Nb10 n'affectent l'amplitude du courant (**Figure 32 C**).

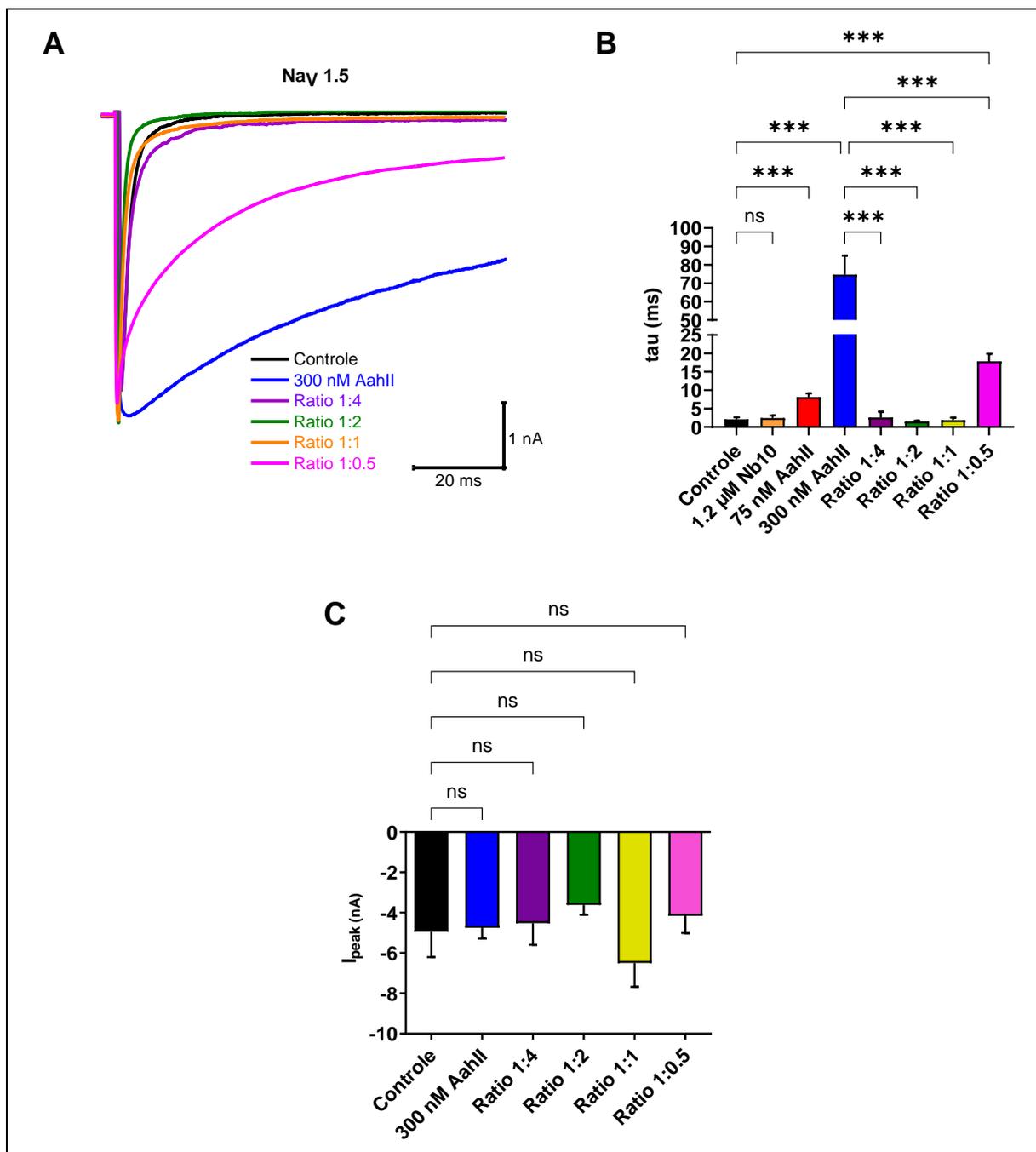


Figure 32 : Effet électrophysiologique de Nb10 sur le complexe AahII-Nav1.5 en incubation

(A) Traces originales du courant Na^+ enregistrées avec la configuration de cellule entière en condition de contrôle, en présence de 300 nM AahII seul, 1,2 μM Nb10 seul, ou à différents Ratios de [AahII] : [Nb10]. Ratio 1:4 ([AahII] = 300 nM : [Nb10] = 1,2 μM) ; Ratio 1:2 ([AahII] = 300 nM : [Nb10] = 600 nM), Ratio 1:1 ([AahII] = 300 nM : [Nb10] = 300 nM), et Ratio 1:0,5 ([AahII] = 300 nM : [Nb10] = 150 nM). (B) Moyenne de la constante de temps d'inactivation de Nav1.5 (τ) dans la condition de contrôle et à différents Ratios, $n = 5$. (C) Moyenne de l'amplitude du courant, I_{peak} (nA), mesurée à -40 mV dans les mêmes conditions que dans le panel (B), $n = 5$. Les valeurs sont représentatives d'expériences indépendantes. Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (Two-way ANOVA, *** $p < 0,001$; ns : Non significatif).

Afin d'étudier si le Nb10 est capable de déplacer la toxine AahII préalablement liée au canal $\text{Nav}_1.5$, nous avons établi un protocole pour suivre la constante de temps d'inactivation (τ) dans différentes conditions (**Figure 33**).

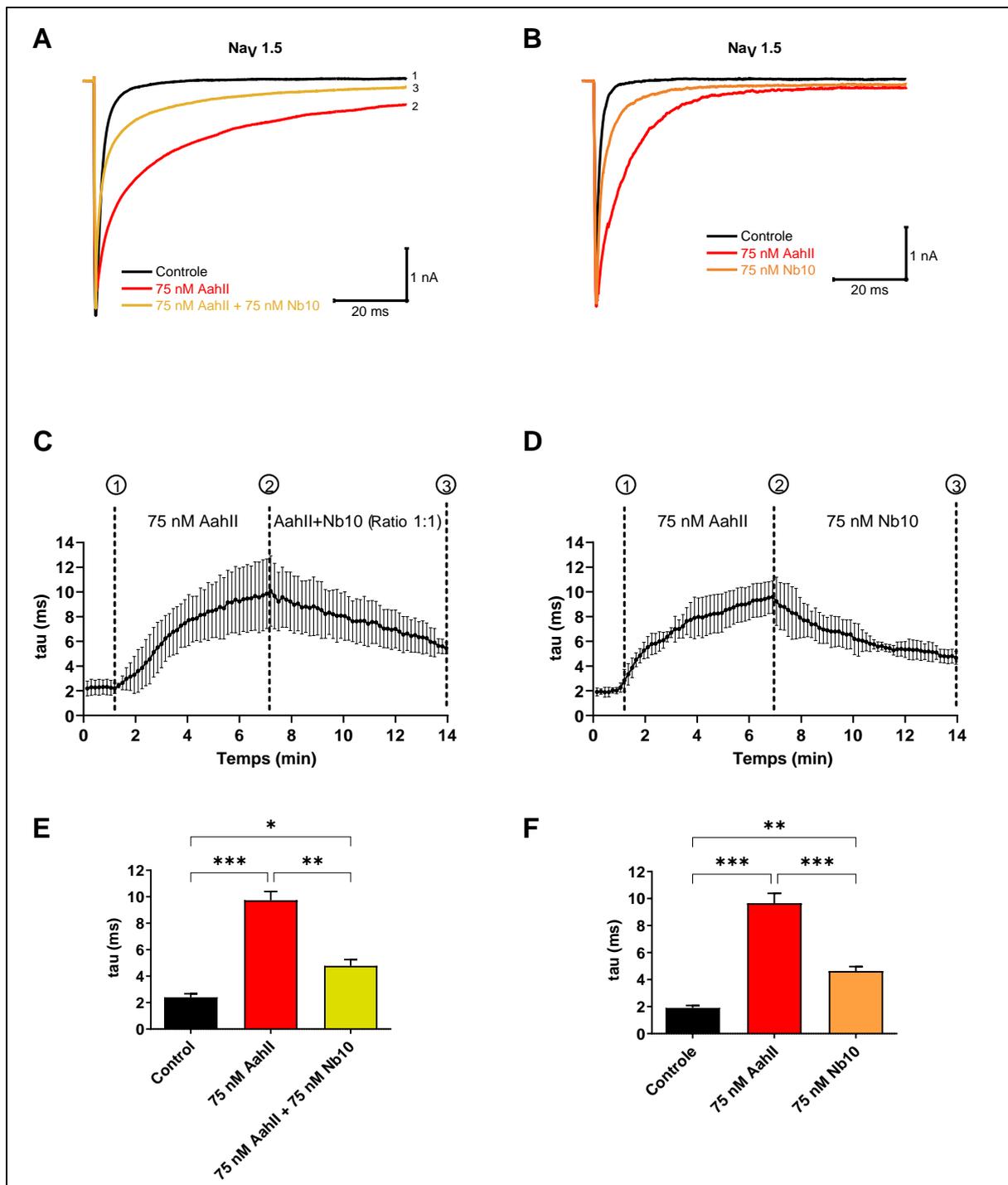


Figure 33 : Effet électrophysiologique de Nb10 sur le complexe AahII- $\text{Nav}_1.5$ en perfusion

(A) Traces originales représentatives du courant Na^+ enregistrées avec la configuration de cellule entière, Trace 1 : trace de courant enregistrée dans la condition de contrôle, Trace 2 :

trace de courant enregistrée à 7 min et qui représente l'effet maximal de la toxine AahII à 75 nM, Trace 3 : trace de courant enregistrée à 14 min après la perfusion de AahII+Nb10 pendant 7 min. **(B)** Traces originales représentatives du courant Na⁺ enregistrées avec la configuration de cellule entière, Trace 1 : trace de courant enregistrée dans la condition de contrôle, Trace 2 : trace de courant enregistrée à 7 min et qui représente l'effet maximal de la toxine AahII à 75 nM, Trace 3 : trace de courant enregistrée à 14 min après la perfusion de Nb10 pendant 7 min. **(C)** Moyenne de la cinétique de la constante de temps d'inactivation du canal Nav1.5 (τ) après perfusion de la toxine AahII à 75 nM de 1 à 7 min suivie de la perfusion du mélange AahII+Nb10 jusqu'à 14 min, $n = 3$. **(D)** Moyenne de la cinétique de la constante de temps d'inactivation du canal Nav1.5 (τ) après perfusion de la toxine AahII à 75 nM de 1 à 7 min suivie de la perfusion du Nb10 jusqu'à 14 min, $n = 3$. **(E)** Moyenne de la constante de temps d'inactivation du canal Nav1.5 (τ) calculée à partir du panel (C). **(F)** Moyenne de la constante de temps d'inactivation du canal Nav1.5 (τ) calculée à partir du panel (D). Les valeurs sont représentatives d'expériences indépendantes. Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (Two-way ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0,001$; ns : Non significatif).

Après la stabilisation du courant par la perfusion de la solution de contrôle pendant 1 min ($\tau = 2,4 \pm 0,4$ ms), la toxine AahII a été perfusée à une concentration de 75 nM pendant 7 min ($\tau = 9,7 \pm 1,2$ ms). A partir de 7 min et jusqu'à 14 min, les cellules ont été perfusées par un Ratio de 1:1 de toxine-nano-anticorps à une concentration de 75 nM (75 nM AahII +75 nM Nb10) (**Figures 33 A, C et E**) ou du Nb10 seul avec la même concentration (**Figures 33 B, D et F**). L'application de Nb10 favorise une annulation partielle de l'action de AahII ($\tau = 4,7 \pm 0,4$ ms). Ces résultats suggèrent fortement que le Nb10 peut déplacer la toxine AahII de son site de liaison sur le canal Nav1.5.

7. Le Nb10 annule l'effet de l'AahII sur l'invasion des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231

Les cellules MDA-MB-231, issues d'un cancer de type basal triple négatif sont dotées d'un caractère très invasif. A l'échelle électrophysiologique ces cellules expriment l'isoforme néonatale du canal Nav1.5 d'une façon endogène. Ce canal est impliqué dans les processus de migration et d'invasion de cette lignée et favorise les métastases (Roger *et al.*, 2003 ; Luo *et al.*, 2020). Dans ce contexte nous avons donc choisi d'évaluer l'effet de AahII et de Nb10, seuls et ensembles, sur l'invasion des cellules MDA-MB-231.

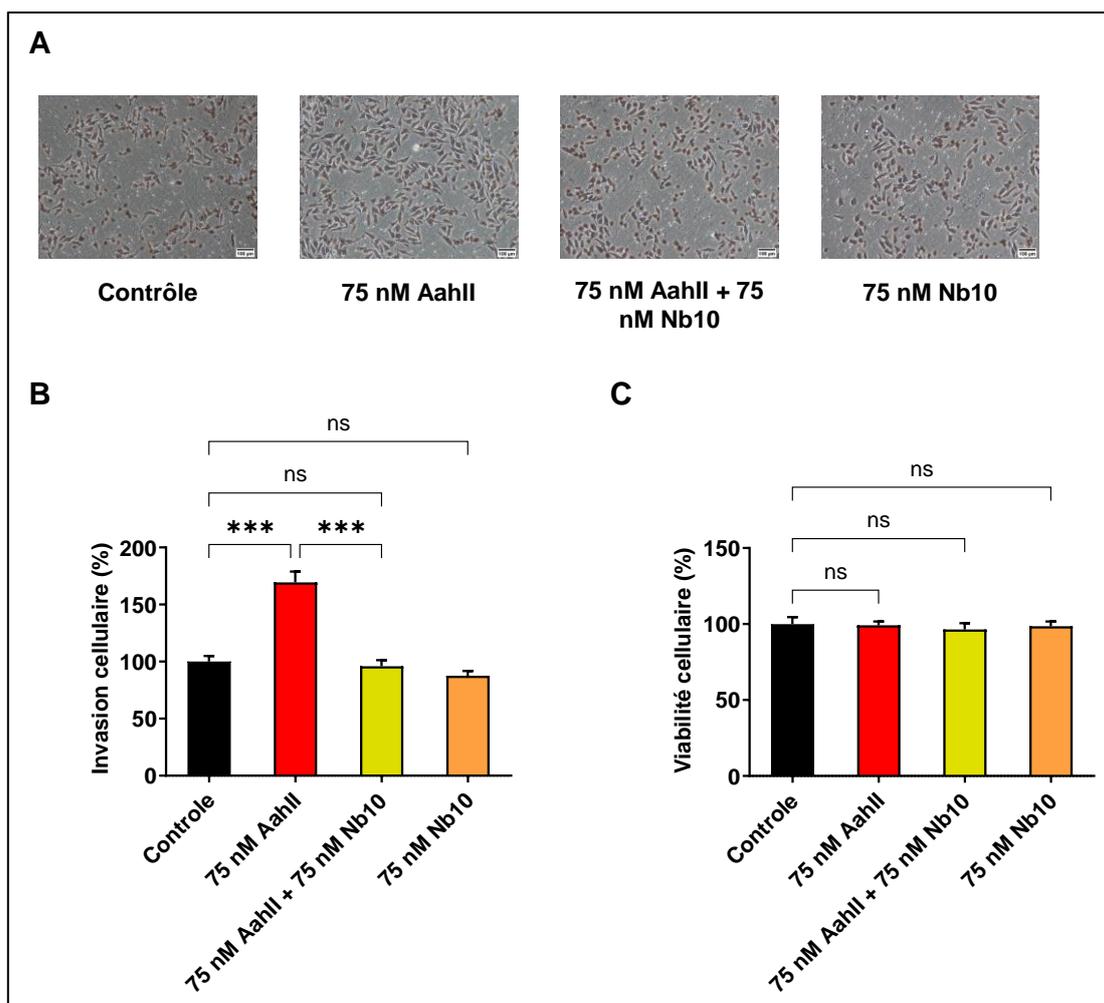


Figure 34 : Effet de AahII, Nb10 et AahII+Nb10 sur l'invasion des cellules MDA-MB-231

(A) Images microscopiques des champs dans différentes conditions. (B) Invasion cellulaire des cellules MDA-MB-231 mesurée après 24h d'incubation dans la condition de contrôle (contrôle) et en présence de AahII et Nb10 seuls ou combinés à un Ratio 1:1. Les valeurs sont la moyenne de 3 expériences indépendantes, $n = 3$. (C) Viabilité des cellules MDA-MB-231 réalisée par MTT dans les mêmes conditions que le panel (B), $n = 3$. Les valeurs sont représentatives d'expériences indépendantes. Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (Two-way ANOVA, *** $p < 0,001$; ns : Non significatif).

Le Nb10 seul, à 75 nM, n'a eu aucun effet sur l'invasion des cellules MDA-MB-231 (**Figures 34 A et B**). À 75 nM, AahII seule augmente l'invasion cellulaire de $67,16 \pm 9 \%$ (**Figures 34 A et B**). En revanche, le Ratio 1:1 (Nb10 : toxine AahII) neutralise l'effet pro-invasif de la toxine (**Figures 34 A et B**). En outre, ni AahII ni Nb10 ni le mélange AahII-Nb10 affecte la viabilité des cellules MDA-MB-231 (**Figure 34 C**).

8. Simulation structurelle *in silico* d'interaction du complexe Nav1.5 et l'AahII

Etant donné que le complexe d'interaction de AahII-Nb10 a été résolu par (Ksouri *et al.*, 2018). Dans le but de déterminer les résidus impliqués dans l'interaction AahII-Nav_v1.5 et comparer les surfaces de contact AahII-Nav_v1.5 et AahII-Nb10 on a réalisé une étude bioinformatique en collaboration avec Dr Ayoub KSOURI de l'institut Pasteur de Tunis.

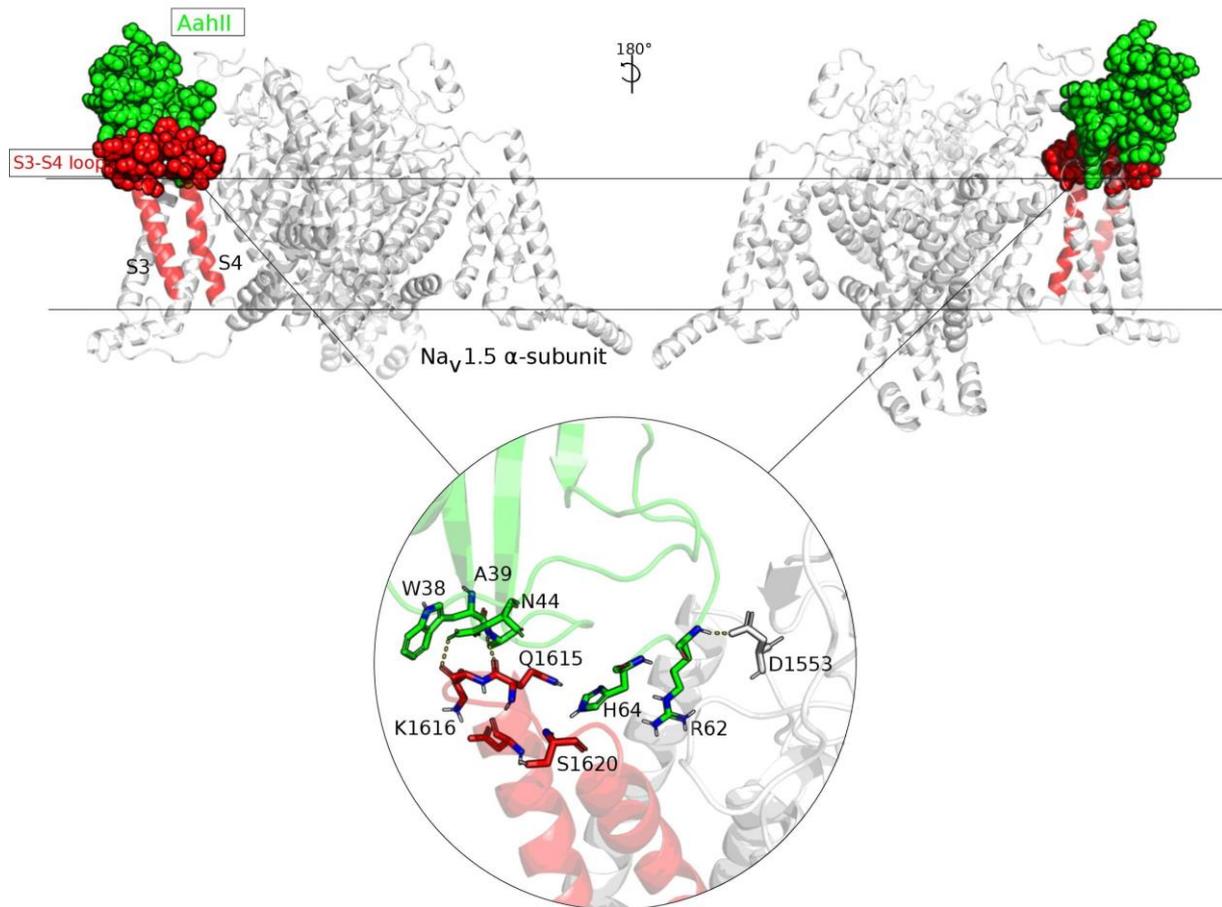


Figure 35 : Présentation de deux faces de l'interaction moléculaire du complexe AahII-Nav_v1.5

Les deux faces de l'interaction moléculaire AahII-Nav_v1.5 sont présentées avec une orientation de 180°. Les surfaces de Nav_v1.5 impliquées dans l'interaction sont colorées en rouge tandis que la toxine AahII en vert. La partie zoomée illustrée dans un cercle montre les résidus les plus cruciaux impliqués dans l'interaction du complexe et le maintien d'une orientation moléculaire stable.

Des simulations moléculaires ont été conçues pour prédire le complexe d'interaction Nav1.5-AahII. Plusieurs méthodes et classes de « docking » moléculaire ont été testées, notamment un « docking » rigide ou flexible, que ce soit en mode aveugle ou en mode piloté. Au total, environ 4 500 complexes ont été générés. La meilleure orientation du complexe a été trouvée avec la méthode flexible HADDOCK (high ambiguity driven protein-protein docking). L'orientation a été établie en fonction des domaines topologiques extracellulaires de la sous-unité α du canal Nav1.5. Un total de 150 complexes générés ont été obtenus et regroupés en cinq clusters principaux. Le cluster 1 est le plus important avec 121 des 150 complexes ayant le meilleur score HADDOCK (-100,9). Les données des complexes générés sont présentées dans le **Tableau 1 Annexe**. La meilleure conformation du complexe montre que la toxine AahII est orientée vers la boucle extracellulaire S3-S4 au niveau des résidus 1608-1620. En général, cette partie de la sous-unité α du canal Nav1.5 est dédiée aux interactions α -toxines. L'orientation stable choisie est basée sur le mode d'interaction moléculaire forte. Tout d'abord, le complexe 3D a montré que le résidu Ala39 de AahII joue un rôle crucial pour établir une liaison stable par le biais des interactions hydrogènes avec les positions des résidus Gln1615 et Lys1616 de la sous-unité α du canal Nav1.5. Une deuxième interaction significative implique une interaction entre le résidu Arg62 de AahII et l'Asp1553 de la sous-unité α du canal Nav1.5 du domaine topologique extracellulaire (boucles S1-S2) par le biais des interactions hydrogènes (**Figure 35**).

Partie II : Évaluation des fractions issues du venin de scorpion Aah sur la viabilité et la migration des cellules cancéreuses mammaires humaines

Les produits d'origine naturelle sont de plus en plus recherchés et testés pour leur potentiel thérapeutique. Les peptides issus de venins de scorpions capables de moduler l'activité des canaux ioniques constituent de robustes outils biologiques essentiels pour une meilleure compréhension des mécanismes de fonctionnement de ces canaux transmembranaires, sélectifs notamment au sodium. Ils représentent parfois la majeure partie de la composition des venins responsables des effets hautement toxiques qui se manifestent par des syndromes cardiogéniques et d'œdèmes pulmonaires. En modulant l'activité des canaux ioniques, ces molécules sont potentiellement capables d'agir sur les processus cellulaires qui leur sont associés.

Dans le but d'isoler des nouvelles molécules naturelles capables de moduler les processus cellulaires notamment dans le cancer, nous avons évalué l'effet Aah sur la viabilité et la migration des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB-231.

1. Evaluation de l'effet des fractions issues du venin de Aah sur la viabilité des cellules cancéreuses mammaires humaine

La première étape de ce travail a consisté à préparer le venin de scorpion et à fractionner l'extrait du venin de Aah sur gel de Sephadex-G50 par chromatographie à basse pression (Voir **Figure 27**). Les fractions ont été testées sur deux lignées cellulaires MCF-7 (**Figure 36**) et MDA-MB-231 (**Figure 37**).

1.1. MCF-7

Nous avons traité les cellules MCF-7 par différentes concentrations de la fraction M1, M2 et l'AahG50 (1 µg/ml, 10 µg/ml et 50 µg/ml) pendant 4 jours. Les mesures de la viabilité ont été réalisées à 24h, 48h, 72 et 96h après traitement.

La fraction M1 augmente la viabilité cellulaire à partir de 48h pour les 3 concentrations 1 µg/ml, 10 µg/ml et 50 µg/ml de $14 \pm 3 \%$; $20 \pm 3 \%$ et $11 \pm 2 \%$ respectivement (**Figure 36 A**). Cette augmentation diminue au cours du temps où elle persiste uniquement pour les concentrations de 1µg/ml et 10 µg/ml à 72h. Seule la fraction M1 à 10 µg/ml garde un effet stimulateur minime

de 4 ± 1 % sur la viabilité des cellules MCF-7 à 96h. La concentration 10 $\mu\text{g/ml}$ semble induire un effet stimulateur important (**Figure 36 A**).

En suivant le même protocole, la fraction M2 stimule la viabilité des cellules MCF-7 de 11 ± 2 % à partir de 48h pour la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$. L'effet augmente légèrement à 72h et continue à progresser à 96h pour atteindre 13 ± 4 % (**Figure 36 B**).

L'effet de la fraction majoritaire qui comporte la majorité des molécules à activité toxique de ce venin, la AahG50, est testé de la même manière. Cette fraction montre un effet biphasique sur la viabilité des cellules MCF-7 selon sa concentration. En effet, AahG50 à 1 $\mu\text{g/ml}$ et 10 $\mu\text{g/ml}$ augmente la viabilité des cellules MFC-7 de 8 ± 2 % et 12 ± 2 % respectivement à 72h. A 96h, l'AahG50 à 50 $\mu\text{g/ml}$ induit une légère diminution de 9 ± 2 % de la viabilité cellulaire (**Figure 36 C**).

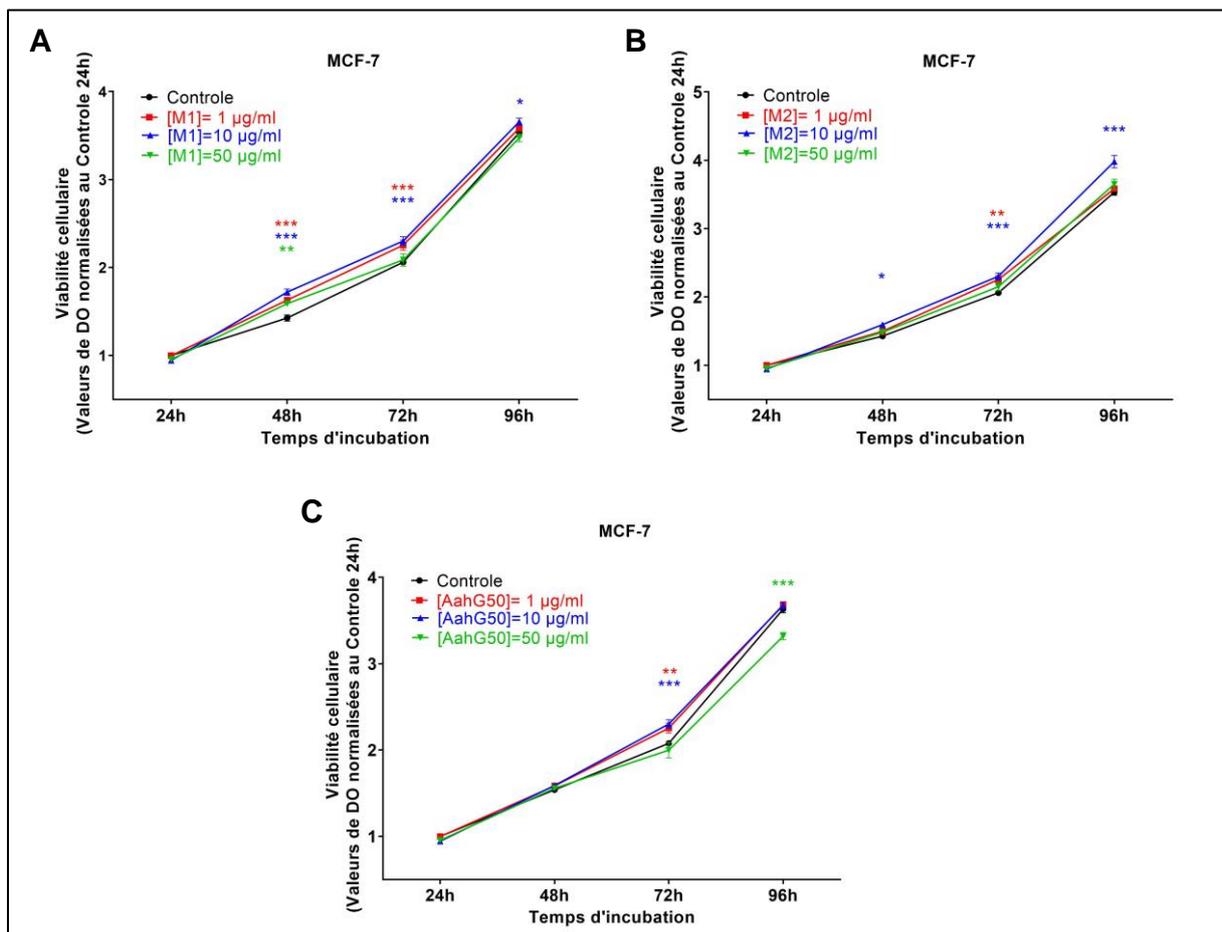


Figure 36 : Évaluation de la viabilité des cellules MCF-7 traitées par différentes concentrations des fractions issues du venin de Aah.

Quantification de la viabilité cellulaire par test au MTT des cellules MCF-7 traitées avec les fractions M1 (A) ; M2 (B) et AahG50 (C) à différentes concentrations. Les valeurs sont représentatives de 3 expériences indépendantes, $n = 3$. Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (Two-way ANOVA, *** $p < 0,001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0,05$)

1.2. MDA-MB-231

L'évaluation de l'effet des fractions M1, M2 et AahG50 sur la viabilité des cellules MDA-MB-231 a été effectuée suivant le même protocole expérimental. Les cellules ont été traitées par des concentrations progressives (1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ et 50 $\mu\text{g/ml}$) des fractions (M1, M2. Et AahG50) durant 4 jours et les mesures effectuées chaque jour.

La fraction M1 module la viabilité des cellules MDA-MB-231 en adaptant un effet biphasique quel que soit sa concentration. Un effet inhibiteur de la viabilité, de $19 \pm 2 \%$ et $21 \pm 3 \%$, est constaté à partir de 24h de traitement avec les concentrations de 10 $\mu\text{g/ml}$ et 50 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. à 48h de traitement, l'effet inhibiteur du M1 à 10 $\mu\text{g/ml}$ et 50 $\mu\text{g/ml}$ persiste ($20 \pm 2 \%$; $27 \pm 2 \%$ respectivement) et atteint $19 \pm 3 \%$ de réduction pour la faible concentration (**Figure 37 A**). L'effet de M1 sur la viabilité disparaît au bout de 72h de traitement avec les 3 concentrations. A 96h, les cellules traitées par les trois concentrations de la fraction M1 présentent une viabilité augmentée et ce jusqu'à $19 \pm 3 \%$ pour la concentration 10 $\mu\text{g/ml}$ (**Figure 37 A**).

La fraction M2 affecte faiblement la viabilité uniquement pour la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$. Une réduction de $9 \pm 2 \%$ qui commence à partir de 72h de traitement a été observée (**Figure 37 B**).

L'effet inhibiteur de la viabilité cellulaire de la fraction AahG50 commence à 48h de traitement et semble être dose-dépendant. En effet, AahG50 réduit la viabilité de $12 \pm 3 \%$ et $22 \pm 1 \%$ respectivement pour 10 $\mu\text{g/ml}$ et 50 $\mu\text{g/ml}$ (**Figure 37 C**). Nous avons donc testé la fraction AahG50 à une concentration plus importante. Les résultats montrent que AahG50 à 100 $\mu\text{g/ml}$ n'a pas d'effet inhibiteur plus important que 50 $\mu\text{g/ml}$ (**Figure 37 C**).

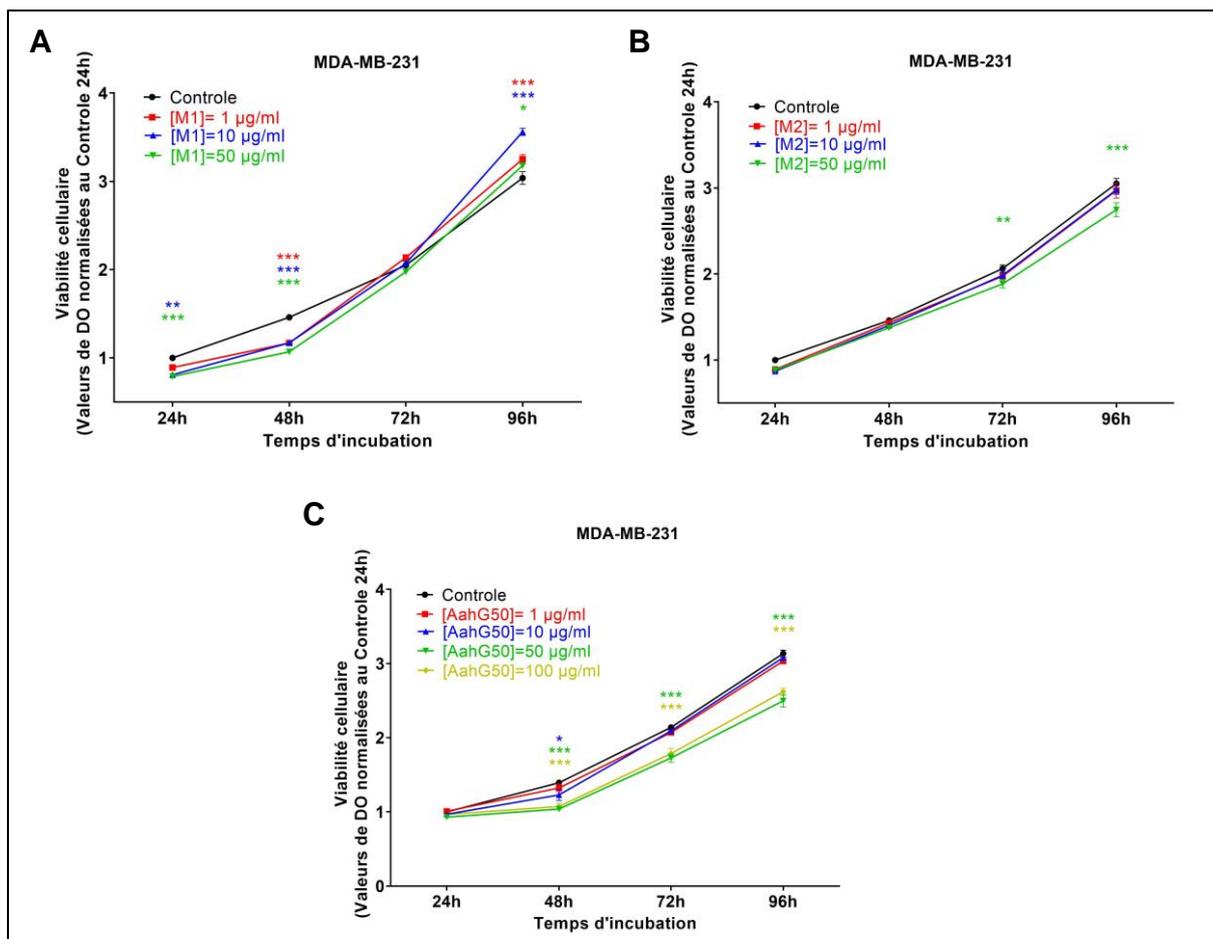


Figure 37 : Evaluation de la viabilité des cellules MDA-MB-231 traitées par différentes concentrations des fractions issues du venin de Aah

Quantification de la viabilité cellulaire par test au MTT des cellules MDA-MB-231 traitées avec les fractions M1 (A) ; M2 (B) et AahG50 (C) à différentes concentrations. Les valeurs sont représentatives de 3 expériences indépendantes, $n = 3$. Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (Two-way ANOVA, $***p < 0,001$; $**p < 0,01$; $*p < 0,05$; ns : Non significatif).

2. Évaluation de l'effet des fractions issues du venin de Aah sur la migration des cellules cancéreuses mammaires humaines

Nous avons aussi testé l'effet de ces 3 fractions sur la migration des cellules MDA-MB-231. Les cellules ont été traitées pendant 24h avec les fractions M1, M2 ou AahG50 à 50 µg/ml, puis la migration a été évaluée par le test de cicatrisation de la blessure à 6h, 12h et 24h de traitement

Les fractions M1, M2 et AahG50 ne présentent aucun effet sur la migration des cellules MDA-MB-231 (Figure 38 A et B).

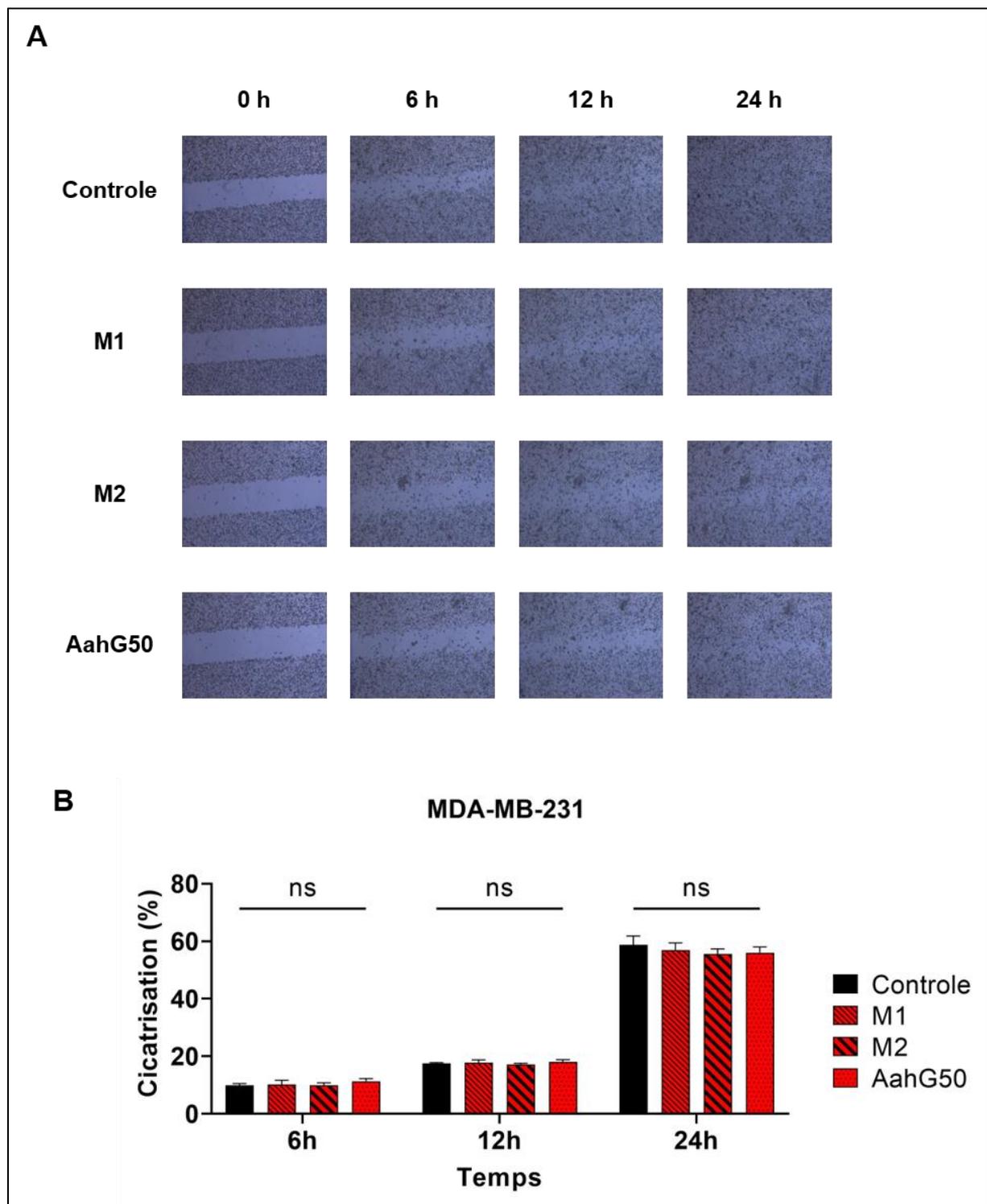


Figure 38 : Evaluation de la migration cellulaire des cellules MDA-MB-231 traitées par les fractions issues du venin de Aah

(A) Photos microscopiques des blessures suivant une cinétique de 24h à différentes conditions
 (B) Quantification du pourcentage de cicatrisation des blessures suivant une cinétique de 24h à différentes conditions. Les valeurs sont représentatives de 3 expériences indépendantes, $n = 3$. Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (Two-way ANOVA, ns : Non significatif).

3. Purification des fractions M1, M2 et AahG50 par Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les fractions représentent une source riche en peptides qui peuvent être faiblement ou fortement représentées dans la fraction et qui peuvent agir en synergie ou en antagonisme (Miranda *et al.*, 1970 ; Diaz *et al.*, 2019 ; Srairi-Abid *et al.*, 2019). L'effet biphasique observé pourrait être expliqué par la présence de différents peptides dans la fraction du venin.

En vue des résultats prometteurs des fractions sur la viabilité des cellules cancéreuses humaines, notamment sur les cellules MDA-MB-231 et dans le but d'isoler la/les molécule(s) responsable(s) de l'effet répresseur ou stimulateur, nous avons purifié les fractions M1, M2 et AahG50 par HPLC.

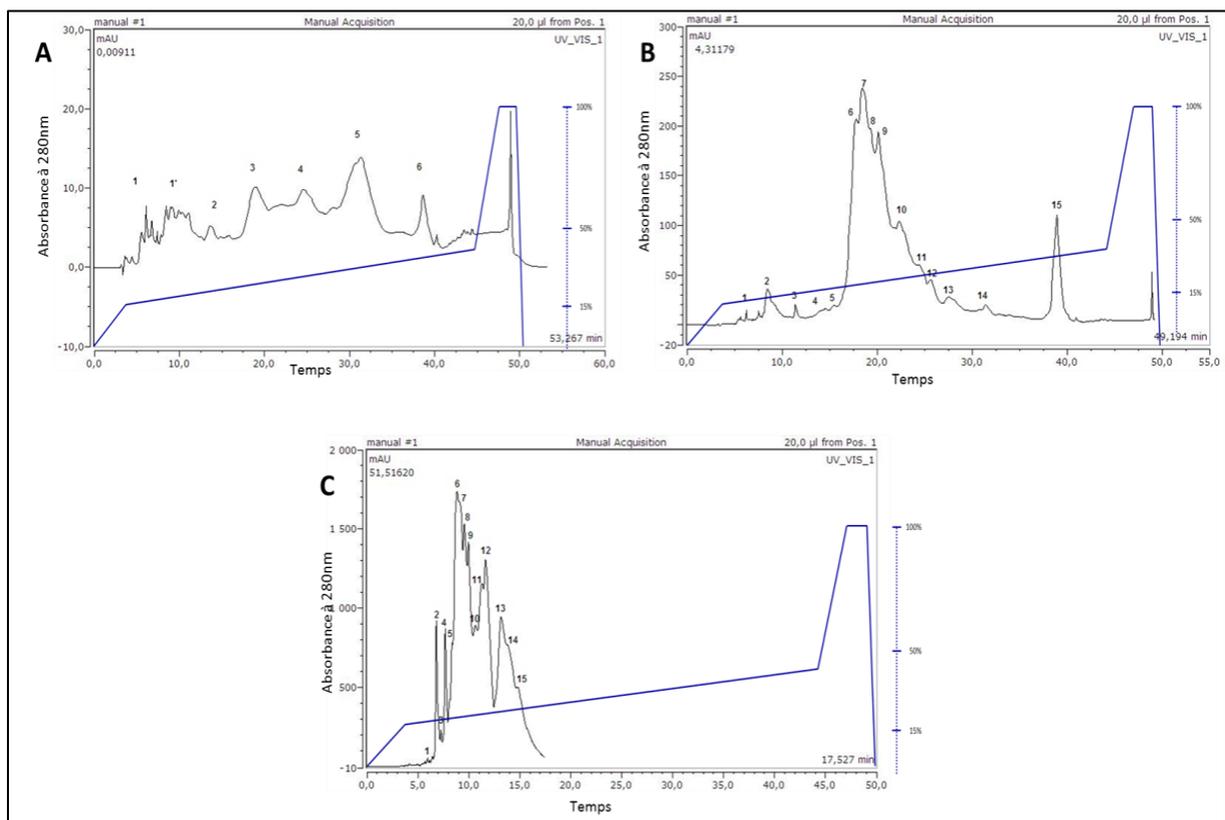


Figure 39 : Profil chromatographique du fractionnement des fractions de Aah sur gel par HPLC

(A) Profil chromatographique du fractionnement de la fraction M1 par HPLC, **(B)** Profil chromatographique du fractionnement de la fraction M2 par HPLC, **(C)** Profil chromatographique du fractionnement de la fraction AahG50 par HPLC

Le profil chromatographique présente entre 5 et 16 pics d'éluion chevauchants numérotés respectivement de 1 à 16 pour les 3 fractions (**Figure 39 A, B et C**). Les molécules des différents pics sont ensuite lyophilisées, re-suspendues dans le PBS puis dosées.

Le profil chromatographique de fractionnement de la fraction M1 présente seulement 5 pics très larges ce qui peut être expliqué par une composition faible en résidus aromatiques (Tyr, Phe, Try) et aux ponts disulfures (Cys) qui sont caractérisés par une longueur d'onde d'absorption aux alentours de 280 nm. Pour le reste de ce travail on va se focaliser sur la fraction M2 et AahG50 où on a pu isoler des pics bien individualisés.

4. Criblage de l'effet des sous-fractions issues de M2 et AahG50 fractionnées par HPLC sur la viabilité des cellules MDA-MB-231

Les sous fractions de M2 et AahG50 purifiées par HPLC ont été ensuite testées sur la viabilité des cellules MDA-MB-231. Nous avons opté pour tester les sous-fractions à une concentration unique de 50 µg/ml et un temps d'incubation de 96h.

Les 15 sous-fractions issues de la fraction M2 ont été testées comme décrit précédemment, seule la sous-fraction M2_15 diminue significativement la viabilité des cellules MDA-MB-231 par rapport aux valeurs de contrôle (**Figure 40 A**).

En adoptant la même démarche, les 16 sous-fractions issues de la fraction AahG50 ont été testées sur la viabilité des cellules MDA-MB-231 à 50 µg/ml pendant 96h. Plusieurs sous-fractions ont diminué la viabilité cellulaire. Les 15 sous-fractions sont représentées très différemment en termes de quantité dans la fraction AahG50, c'est pour cela, en plus d'avoir un effet inhibiteur très significatif, notre choix s'est basé aussi par rapport à la disponibilité des sous-fractions dans la fraction AahG50. Parmi les sous-fractions qui représentent un effet inhibiteur significatif de la viabilité des cellules MDA-MB-231, nous avons retenu deux sous-fractions qui sont la AahG50_2 et AahG50_6 (**Figure 40 B**).

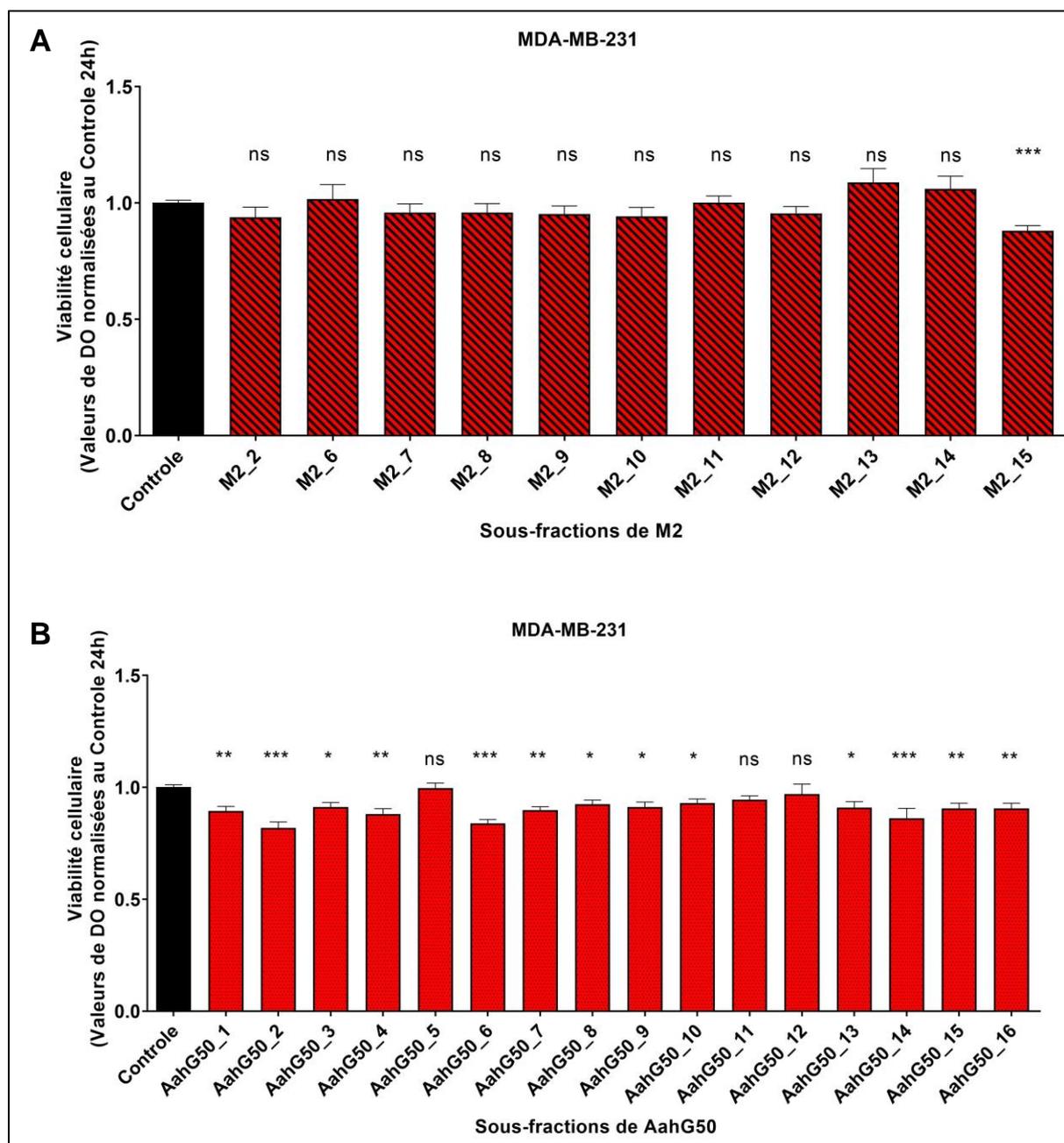


Figure 40 : Evaluation de la viabilité des cellules MDA-MB-231 traitées par différentes sous-fractions de M2 et AahG50

Quantification de la viabilité cellulaire par test au MTT des cellules MDA-MB-231 traitées avec les sous-fractions de M2 (A) et AahG50 (B) à 50µg/ml et 96h d'incubation. Les valeurs sont représentatives de 3 expériences indépendantes, $n = 3$. Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (Two-way ANOVA, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

5. Effet des sous-fractions M2_15, AahG50_2 et AahG50_6 sur la viabilité des cellules MDA-MB-231

La sous-fraction M2_15 diminue la viabilité des cellules MDA-MB-231 à partir de 48h d'incubation de 13 ± 2 %. L'effet persiste et s'intensifie avec le temps pour atteindre 26 ± 4 % à 96h. De façon intéressante, la sous-fraction M2_15 suit la même cinétique de viabilité que la fraction M2 avec un effet plus rapide et plus intense (**Figure 41 A**).

Les sous-fractions AahG50_2 et AahG50_6 diminuent la viabilité des cellules MDA-MB-231 avec la même intensité que la fraction AahG50 à partir de 48h d'incubation de 22%. L'effet des deux sous-fractions s'intensifie avec le temps au bout de 72h pour atteindre 27 ± 4 % et 21 ± 1 % pour AahG50_2 et AahG50_6 respectivement. Après 96h, la courbe de viabilité des deux sous-fractions garde la même allure. La viabilité des cellules MDA-MB-231 est plus impactée par l'effet des deux sous-fractions AahG50_2 et AahG50_6 que par la fraction AahG50. La sous-fraction AahG50_2 présente l'effet inhibiteur avec 23 ± 1 % ; 27 ± 4 % et 35 ± 5 % pour 48h, 72h et 96h respectivement. La fraction AahG50_6 diminue aussi la viabilité de 22 ± 4 % ; 21 ± 1 % et 26 ± 4 % la viabilité des cellules MDA-MB-231 sur la même cinétique (**Figure 41 B**).

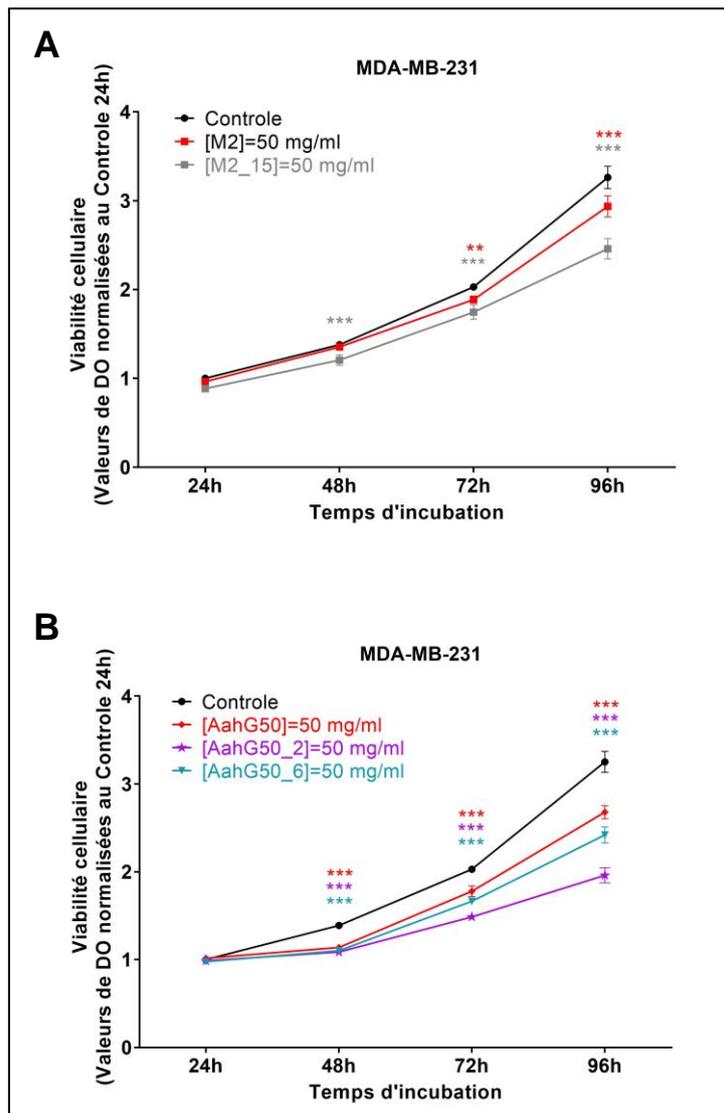


Figure 41 : Evaluation de la viabilité des cellules MDA-MB-231 traitées par différentes sous-fractions de M2 et AahG50 sur une cinétique de 96h

Quantification de la viabilité cellulaire par test au MTT des cellules MDA-MB-231 traitées avec la sous-fraction de M2 (A) et AahG50 (B). Les valeurs sont représentatives de 3 expériences indépendantes, $n = 3$. Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (Two-way ANOVA, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns : Non significatif).

6. Les sous-fractions AahG50_2 et AahG50_6 n'affectent pas l'expression du canal ORAI1 et de STIM1

Il est connu que le cancer du sein implique des changements dans la dynamique du Ca^{2+} intracellulaire (Azimi *et al.*, 2014 ; Prevarskaya *et al.*, 2014), de telles variations sont fréquemment associées à l'intensification des processus liés au cancer, notamment la prolifération, la migration et/ou l'échappement à l'apoptose cellulaire (Prevarskaya *et al.*, 2018).

Dans les cellules du cancer du sein, les niveaux de Ca^{2+} peuvent être augmentés par un flux extracellulaire de Ca^{2+} *via* les canaux calciques de la membrane plasmique ou par les réserves intracellulaires. Parmi les mécanismes de l'entrée de Ca^{2+} , on trouve l'entrée de type SOCE (Store Operated Calcium Entry). C'est un mécanisme déclenché par l'épuisement des réserves intracellulaires de Ca^{2+} . Ce mécanisme joue un rôle majeur dans la biologie cellulaire. Il a été démontré que l'entrée de type SOCE est nécessaire au développement de la plupart des caractéristiques du cancer, notamment la prolifération, la migration, l'angiogenèse et la résistance à l'apoptose (Azimi *et al.*, 2018 ; Jardin *et al.*, 2018). Les composants clés de l'entrée SOCE sont la molécule d'interaction stromale 1 (STIM1) et les canaux perméables au Ca^{2+} de la famille ORAI dans la membrane plasmique (Yoast *et al.*, 2020). Le remodelage de l'homéostasie du Ca^{2+} peut être médié par des changements dans l'expression de ces canaux et également des pompes à Ca^{2+} (Stewart *et al.*, 2015). Ainsi, dans les cellules cancéreuses du sein triples négatives, telles que les cellules MDA MB-231, l'entrée SOCE est fortement dépendante de STIM1 et ORAI1 (Motiani *et al.*, 2010). Récemment, STIM1 et ORAI1 ont été rapportés comme modulateurs de viabilité, de migration et d'apoptose (Lopez *et al.*, 2021).

Afin de déterminer un éventuel effet des sous-fractions AahG50_2 et AahG50_6 sur le niveau d'expression des acteurs calciques impliqués dans l'entrée calcique de type SOCE des cellules MDA-MB-231, nous avons étudié, par qPCR, le niveau d'expression des canaux ORAI1 et de la protéine STIM1. Nos résultats montrent clairement que les sous-fractions AahG50_2 et AahG50_6, n'affectent pas les niveaux d'expression transcriptionnelles du canal ORAI1 et la protéine STIM1 (**Figure 42 A, B**).

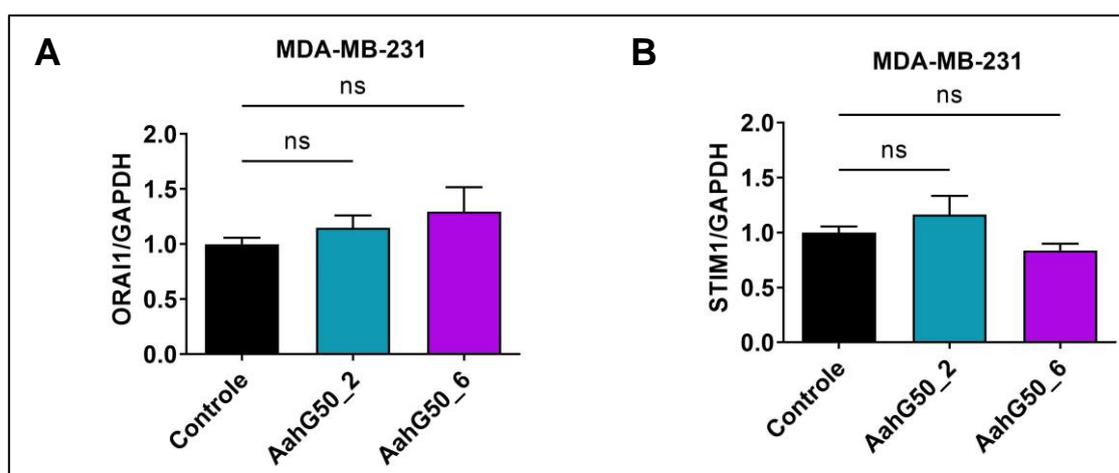


Figure 42 : Effet des sous-fractions de AahG50 sur l'expression transcriptionnelle de ORAI1 et STIM1 dans les cellules MDA-MB-231

Quantification de l'expression transcriptionnelle par RT-qPCR des protéines exprimées dans les cellules MDA-MB-231 traitées avec la sous-fraction de AahG50_2 et AahG50_6. **(A)** niveau d'expression du canal ORAI1 par rapport au gène de référence GAPDH **(B)** niveau d'expression de la protéine STIM1 par rapport au gène de référence GAPDH. Les valeurs sont représentatives de 3 expériences indépendantes, $n = 3$. Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (Two-way ANOVA, ns : Non significatif).

Fraction / Sous-fraction	Concentration	Type cellulaire							
		MCF-7				MDA-MB-231			
		Temps d'incubation							
		24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
M1	1µg/ml	ns	+ 14 ± 3 %	+ 9 ± 2 %	ns	ns	- 19 ± 3 %	ns	+ 7 ± 2 %
	10µg/ml	ns	+ 20 ± 3 %	+ 12 ± 3 %	+ 4 ± 1 %	- 19 ± 2 %	- 20 ± 2 %	ns	+ 19 ± 3 %
	50µg/ml	ns	+ 11 ± 2 %	ns	ns	- 21 ± 3 %	- 27 ± 2 %	ns	+ 5 ± 2 %
M2	1µg/ml	ns	ns	+ 9 ± 2 %	ns	ns	ns	ns	ns
	10µg/ml	ns	+ 11 ± 2 %	+ 12 ± 2 %	+ 13 ± 4 %	ns	ns	ns	ns
	50µg/ml	ns	ns	ns	ns	ns	ns	- 9 ± 2 %	- 10 ± 3 %
M2_15	50µg/ml					ns	- 13 ± 2 %	- 15 ± 3 %	- 28 ± 4 %
AahG50	1µg/ml	ns	ns	+ 8 ± 2 %	ns	ns	ns	ns	ns
	10µg/ml	ns	ns	+ 12 ± 3 %	ns	ns	- 12 ± 3 %	ns	ns
	50µg/ml	ns	ns	ns	- 9 ± 1 %	ns	- 22 ± 1 %	- 19 ± 3 %	- 21 ± 4 %
	100µg/ml					ns	- 21 ± 1 %	- 16 ± 2 %	- 16 ± 1 %
AahG50_2	50µg/ml					ns	- 23 ± 1 %	- 27 ± 4 %	- 35 ± 5 %
AahG50_6	50µg/ml					ns	- 22 ± 4 %	- 21 ± 1 %	- 26 ± 4 %

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des effets des molécules issues du venin de Aah sur la viabilité cellulaire des lignées du cancer du sein

Discussion

Partie I : Caractérisation électrophysiologique, pharmacologique et structurale de l'interaction de l' α -toxine AahII avec le canal Nav1.5 en présence et en absence du nanoanticorps Nb10 (anti-AahII)

Dans cette partie de la thèse nous avons montré le mécanisme d'interaction de l' α -toxine AahII avec le canal Nav1.5 ainsi que la modulation de cette interaction par le nanoanticorps Nb10 (anti-AahII) hautement neutralisant de l'effet de AahII *in vivo*.

Nos résultats, sur des cellules HEK293 stablement transfectées par la sous-unité α du canal Nav1.5, montrent que la toxine AahII (75 nM) ralentit 4 fois l'inactivation rapide du canal Nav1.5 sans affecter l'amplitude du courant, démontrant ainsi son effet spécifique. Nos résultats sont en accord avec une étude récente qui a montré que la toxine AahII ralentit le mécanisme d'inactivation rapide du canal Nav1.7 lorsqu'elle est utilisée à 300 nM ($EC_{50} = 51,7 \pm 1,5$ nM) (Clairfeuille *et al.*, 2019). Les études de Cryo-microscopie électronique de l'interaction structurale du complexe AahII-Nav1.7 ont montré que la α -toxine AahII se lie à deux sites différents sur une chimère non fonctionnelle au niveau des domaines DI et DIV. Cependant, cette étude n'a pas montré si la liaison de AahII à l'un de ces sites était fonctionnellement active (Clairfeuille *et al.*, 2019). En utilisant un protocole de perfusion et de rinçage de la toxine AahII, nous avons suivi la cinétique de son effet sur l'inactivation des canaux Nav1.5. AahII ralentit la constante d'inactivation au bout de 7 min de perfusion et cet effet est partiellement réversible après 7 minutes de rinçage. Ce résultat suggère fortement que l'AahII se lie au canal de façon extracellulaire. Préalablement, les études pharmacologiques sur l'activité des α -toxines de scorpion ont retenu un seul site de liaison de neurotoxines sur les canaux Nav appelé « site 3 ». Ce site est situé dans le VSD4 auquel se lient des toxines apparentées, comme les α -toxines de scorpion et les toxines d'anémone de mer (Rogers *et al.*, 1996 ; Gordon *et al.*, 2007). Afin d'étudier l'interaction de l'AahII avec le canal Nav1.5 à l'échelle moléculaire, nous avons réalisé un « Docking » flexible et ciblé sur le site 3 du canal Nav1.5 avec l' α -toxine AahII. Les résultats de cette étude bioinformatique ont sorti 2 complexes stables qui prédisent l'implication des résidus de la boucle $\beta 2\beta 3$ ainsi que de l'extrémité C-terminale de AahII dans l'interaction avec le VSD4 du canal Nav1.5. Le résidu Ala39 de la boucle $\beta 2\beta 3$ de AahII interagit avec les résidus Gln1615 et Lys1616 du canal Nav1.5 par le biais des liaisons hydrogènes, tandis que le résidu Arg62 de la partie C-terminale de AahII interagit avec le résidu Asp1553 situé sur la boucle extracellulaire entre S1-S2 du canal Nav1.5 par les mêmes types de liaison.

Nos données sont en adéquation avec des études de relations structure-fonction montrant que AahII interagit avec les canaux Nav *via* la boucle $\beta 2\beta 3$ et son segment C-terminal impliquant les résidus Arg62 et His64. Les résidus Arg62 et His64 sont rapportés être critiques pour une interaction puissante de la neurotoxine avec le site 3 des canaux Nav (Wang *et al.*, 2003 ; Benkhadir *et al.*, 2004 ; Clairfeuille *et al.*, 2019). De plus, les résidus Phe15, Trp38 et Asn44 de la boucle $\beta 2\beta 3$ de AahII ont été décrits pour leur reconnaissance du VSD4 des canaux Nav ainsi que leur rôle important dans la bioactivité de l' α -toxine (Kharrat *et al.*, 1989 ; Gur *et al.*, 2011 ; Clairfeuille *et al.*, 2019). Une autre étude récente portant sur l'interaction de l' α -toxine LqhIII du scorpion *Leirus quinquestriatus hebraeus* avec le canal Nav1.5 a montré par Cryo-microscopie électronique à une résolution de 3,3 Å que LqhIII se lie à l'extrémité extracellulaire du canal Nav1.5 au niveau des boucles extracellulaires entre S1-S2 et S3-S4 dans le domaine DIV par l'intermédiaire de sa boucle $\beta 2\beta 3$ et de son domaine C-terminal (Jiang *et al.*, 2021). Malgré la différence topologique des acides aminés impliqués dans l'interaction des deux toxines de scorpion distinctes (AahII et LqhIII), leur position de liaison avec les boucles extracellulaires entre S1-S2 et S3-S4 est remarquablement similaire.

Il est bien admis que les α -toxines de scorpion se lient au site 3 des canaux Nav de manière voltage-dépendante avec une liaison de haute affinité à l'état de repos et que la dépolarisation du canal réduit l'affinité de la toxine et provoque sa dissociation (Clairfeuille *et al.*, 2019 ; Jiang *et al.*, 2021). Structuralement, la liaison des α -toxines empêche le mouvement vers l'extérieur des charges positives du segment DIV-S4. Dans des conditions standards, ce mouvement normal vers l'extérieur du segment DIV-S4 est suivi par l'exposition d'un site récepteur pour la liaison du motif IFM afin de garantir le processus d'inactivation rapide. La liaison de l' α -toxine AahII empêcherait cette succession d'événements conformationnels qui conduisent à l'inactivation rapide du canal (Clairfeuille *et al.*, 2019 ; Hmaïdi *et al.*, 2022).

Au fil des années plusieurs stratégies ont été adoptées pour prévenir des envenimations suite aux piqûres par le scorpion Aah. Parmi ces stratégies il y a celle de l'immunothérapie par les Nbs (Hmila *et al.*, 2008). Ces derniers ont prouvé leur efficacité comme des meilleurs outils pour interagir avec les toxines pour neutraliser leurs effets. Ceci grâce à leur petite taille, leur bonne stabilité, leur haut niveau d'expression dans un système procaryote, leur haute solubilité et leur spécificité appropriée (Hmila *et al.*, 2008 ; Abderrazek *et al.*, 2009). Dans le but de produire un nanoanticorps qui neutralise l'effet de la toxine la plus toxique du venin de scorpion Aah, les anciens travaux de notre laboratoire ont réussi à produire un Nb anti-AahII hautement neutralisant. Ce nanoanticorps nommé Nb10 classé « meilleur de sa catégorie » est capable de

neutraliser l'effet de AahII *in vivo* (Abderrazek *et al.*, 2009). Cela nous a encouragé à étudier et à caractériser la capacité du Nb10 à moduler l'interaction de l'AahII avec le canal Nav1.5. Pour y faire, nous avons produit le Nb10 dans un système procaryote et l'avoir purifié suivant le protocole adopté par (Abderrazek *et al.*, 2009) ce qui nous a permis d'avoir une quantité suffisante de Nb10 qui reconnaît spécifiquement la toxine AahII. Ce Nb10 est une protéine de 14 kDa capable de neutraliser la toxicité de 7 DL₅₀ de AahII lorsqu'elle est injectée à des souris de 20g (Abderrazek *et al.*, 2009). Par une approche électrophysiologique, nous avons montré que le Nb10 peut abolir totalement l'effet de la toxine AahII sur l'inactivation rapide du canal Nav1.5 avec un ratio de 1:1 sans affecter l'amplitude du courant. Le suivi de la cinétique de perfusion de (AahII + Nb10) et/ou de Nb10 seul après la mise en place de l'action de AahII sur l'inactivation rapide du canal montre que le Nb10 peut abolir l'action de liaison de AahII, ce qui suggère fortement que le Nb10 déplace ou au moins altère le site d'interaction de la liaison de l'AahII avec le VSD4. On suggère que la présence de Nb10 à un ratio d'au moins 1:1 dans le milieu extracellulaire de perfusion libère le segment DIV-S4 préalablement bloqué par AahII pour adopter son mouvement normal et initie son rôle dans l'inactivation rapide du canal Nav1.5. Une récente modélisation 3D *in silico* de l'interaction de AahII avec Nb10 a révélé la contribution potentielle du résidu Trp38 de la boucle $\beta 2\beta 3$ ainsi que les résidus His64 et Arg62 de la partie C-terminale de AahII avec Met103, Arg108, Tyr105 et Ala111 du Nb10 (Ksouri *et al.*, 2018). De plus, le segment allant de Ala39 à Ala45 dans AahII a été identifié comme la principale région responsable de la réactivité antigénique (Devaux *et al.*, 1993). D'une façon très intéressante dans ce travail, notre prédiction *in silico* de l'interaction AahII-Nav1.5 a montré le rôle principal des résidus Ala39 et Arg62 de AahII pour stabiliser cette interaction.

L'ensemble de ces résultats suggère que Nb10 reconnaît une surface similaire ou identique de AahII qui interagit directement avec le segment DIV-S4 du canal Nav1.5, impliquant deux résidus majeurs aux positions 39 et 62.

Pour répondre au besoin d'une caractérisation physiologique de l'interaction de AahII et Nb10 au niveau cellulaire, nous avons réalisé des tests d'invasion en utilisant des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. Ces cellules expriment l'isoforme néonatale du canal Nav1.5 d'une façon endogène. Ce canal est impliqué dans les processus de migration et d'invasion de cette lignée et favorise les métastases (Roger *et al.*, 2003 ; Luo *et al.*, 2020). Nos résultats montrent que AahII augmente l'invasion des cellules MDA-MB-231 de $67,16 \pm 9 \%$. L'application de Nb10 à un ratio 1:1 par rapport à la AahII, inhibe complètement l'effet pro-invasif de la toxine AahII. Par conséquent, AahII et Nb10 peuvent tous deux être utiles pour développer des

modèles biomédicaux évaluant l'implication des sous-types de canaux Nav dans la capacité du processus d'invasion de plusieurs lignées cellulaires tumorales.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que Nb10 s'adapte parfaitement aux deux surfaces de liaison de la toxine AahII sur le canal Nav (boucle $\beta 2\beta 3$ et domaine C-terminal) et bloque dynamiquement les interactions AahII-Nav1.5. Les deux positions d'acides aminés Ala39 et Arg62 dans AahII sont cruciales pour son interaction avec le canal Nav1.5 et aussi avec le Nb10.

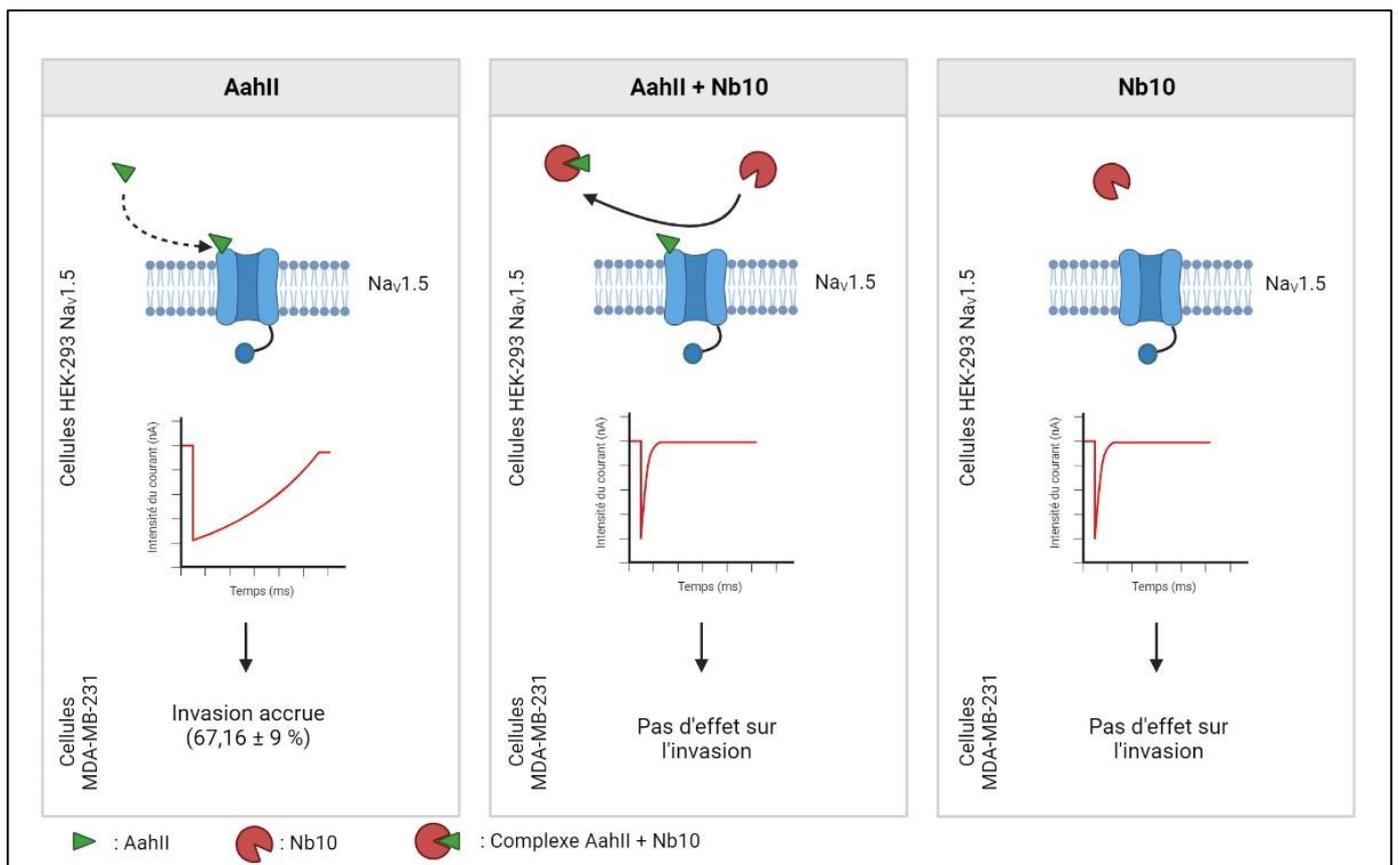


Figure 43 : Schéma de synthèse de l'interaction de la toxine AahII avec le nanoanticorps Nb10 et les conséquences au niveau électrophysiologique et physiologique

Partie II : Évaluation des fractions issues du venin de scorpion Aah sur la viabilité et la migration des cellules cancéreuses mammaires humaines

Dans ce travail nous avons choisi d'utiliser deux lignées cancéreuses mammaires, une lignée cellulaire très invasive de type basal : MDA-MB-231 et une lignée peu agressive de type luminal : MCF-7. Nos résultats ont permis d'identifier 3 sous-fractions issues d'une purification HPLC du venin de Aah qui diminuent la viabilité des cellules du cancer du sein triple négatif MDA-MB-231. L'effet de ces 3 sous-fractions s'intensifie au cours du temps sur une cinétique allant jusqu'à 96h. Ces 3 sous-fractions peuvent être des candidats potentiels comme des outils alternatifs pour une thérapie anticancéreuse contre le cancer mammaire agressif.

Le venin brut de Aah a été largement étudié pour ses qualités de modulation de processus cellulaires dans plusieurs types de cellules (Bechohra *et al.*, 2016 ; Saidani *et al.*, 2016 ; Sarfo-Poku *et al.*, 2016). Étant donnée la grande hétérogénéité dans la composition des venins, l'effet d'une molécule peut être neutralisée par l'effet d'une ou de plusieurs autres molécules qui antagonisent son effet (Bechohra *et al.*, 2016). Plusieurs travaux montrent que l'effet des fractions ou des peptides issus du même venin est souvent beaucoup plus intéressant que l'effet de son venin brut (Bechohra *et al.*, 2016 ; Sarfo-Poku *et al.*, 2016).

Dans cette logique, nous avons fait le choix de travailler directement avec les fractions du venin. Nous avons donc commencé par fractionner le venin de scorpion Aah en utilisant le protocole de fractionnement du venin de scorpion publié par (Miranda *et al.*, 1970). Cette méthode de fractionnement permet de séparer les molécules du venin de scorpion selon leur taille. En suivant ce protocole, nous avons opté pour une première purification à basse pression en utilisant des billes de Sephadex-G50 superfine qui assurent la séparation des molécules dont la taille varie entre 1.5 et 30 kDa. A la fin de cette étape nous avons isolé 4 fractions nommées M1, M2, AahG50 et M3 qui se différencient essentiellement par la masse moléculaire des molécules dont elles sont composées (**Figure 27**).

Tout au long de la suite de ce travail, nous avons évalué l'effet des 3 fractions M1, M2 et AahG50 sur différents processus cancéreux en utilisant les cellules MCF-7 et MDA-MB-231.

La fraction M1 module la viabilité cellulaire des deux lignées du cancer du sein très différemment. En effet, dans les cellules MCF-7, M1 augmente la viabilité à partir de 48h (**Figure 36 A**). Par contre, dans les cellules MDA-MD-231, M1 montre un effet biphasique (inhibiteur puis activateur) en fonction de la durée du traitement (**Figure 37 A**). Cet effet

biphasique pourrait s'expliquer par la composition de la fraction. Ainsi, Les travaux de (Saidani *et al.*, 2016) ont montré que le venin brut de Aah augmente la viabilité des cellules MDCK (cellules épithéliales du tubule rénal d'un chien Cocker Spaniel adulte) dès 20 µg/ml de concentration et diminue la viabilité des deux lignées cellulaires OK (cellules épithéliales du tubule proximal du rein humaine) et HK-2 (cellules de tubule proximal dérivées d'un rein humain normal) à cette même concentration (20 µg/ml). Un effet légèrement biphasique sur la viabilité cellulaire en fonction de la concentration a été observé dans les cellules M1 (cellules du canal collecteur cortical de la souris). Les cellules incubées avec le venin brut de Aah à 60 µg/ml présentent une diminution significative de la viabilité à l'inverse de celles incubées avec le même venin à 100 µg/ml qui montrent à leur tour une viabilité accrue (Saidani *et al.*, 2016). Tous ces résultats montrent la spécificité et la complexité de l'activité biologique de ce venin pour chaque type cellulaire.

Un autre travail utilisant la même fraction M1 a été réalisé *in vivo* sur le cancer du foie induit par les Fumonisines B1 (toxines produites par des champignons de type *Fusarium*). Les auteurs ont montré que la fraction M1 diminue le taux des enzymes transaminases (ALAT et ASAT). Les ASAT (aspartate aminotransférases), sont présentes dans le foie, les muscles, le cœur, les reins, le cerveau et le pancréas tandis que les ALAT (alanine aminotransférases), sont spécifiques du foie. Ces deux enzymes sont des biomarqueurs du cancer du foie (Nadjia and Fatima, 2015). La fraction M1 a aussi montré un effet répresseur sur l'activité de la catalase dans le cancer du foie induit par les Fumonisines B1 et a rétabli l'état d'oxydation (GSH : glutathion ; NO : oxyde nitrique ; MDA : malondialdéhyde) (Nadjia and Fatima, 2015). De plus, la fraction M1 a diminué spécifiquement la quantité d'ADN dans les cellules tumorales du foie sans affecter les hépatocytes saines (Nadjia and Fatima, 2015). L'effet inhibiteur de la fraction M1 sur le cancer de foie est proche de ce que nous avons rapporté sur les cellules MDA-MB-231 du cancer du sein.

La deuxième fraction non toxique M2, module la viabilité d'une façon similaire que M1. Elle augmente progressivement la viabilité des cellules MCF-7 incubées avec une concentration de 10 µg/ml (**Figure 36 B**) et diminue significativement la viabilité des cellules MDA-MB-231 traitées par 50 µg/ml de cette fraction et cela à partir de 72h d'incubation (**Figure 37 B**). Contrairement à la fraction M1, l'effet inhibiteur de la fraction M2 semble plus important en fonction de la durée du traitement.

Des travaux réalisés avec un venin brut d'un scorpion du même genre, le *Androctonus crassicauda*, sur la viabilité des cellules MDA-MB-231 ont montré que ce venin bloque le cycle

cellulaire des cellules MDA-MB-231 en phase G2/M et induit l'apoptose et la nécrose cellulaires en augmentant drastiquement les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Al-Asmari *et al.*, 2018).

Dans le but de cibler la ou les molécules responsables de l'effet inhibiteur de la viabilité des cellules MDA-MB-231, nous avons purifié la fraction M2 par HPLC. Le profil d'élution des molécules a donné 15 sous-fractions chevauchantes (**Figure 39 B**). L'effet des 15 sous-fractions ont été ensuite testées sur la viabilité des cellules MDA-MB-231. Seule la fraction M2_15 montre un effet inhibiteur de la viabilité cellulaire (**Figure 40 A**). En comparaison avec la fraction M2, la sous-fraction M2_15 diminue la viabilité des cellules MDA-MB-231 de 28 ± 4 % contre 10 ± 3 % d'inhibition pour sa fraction mère. Cette sous-fraction plus pure et plus active que la fraction M2 représente une potentielle molécule intéressante et il serait important d'étudier plus en détail son effet sur la prolifération et/ou l'apoptose ainsi que les voies de signalisations associées.

La fraction toxique AahG50 adopte des effets très hétérogènes sur la viabilité des cellules cancéreuses mammaires humaines. Elle augmente la viabilité des cellules MCF-7 traitées par 1 $\mu\text{g/ml}$ et 10 $\mu\text{g/ml}$. Cet effet apparait à 72h seulement. Cependant, à concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$, AahG50 diminue significativement la viabilité cellulaire à 96h (**Figure 36 C**). D'une façon très intéressante, la même fraction diminue significativement la viabilité des cellules MDA-MB-231 et cela à partir de 48h pour les concentrations 50 $\mu\text{g/ml}$ et 100 $\mu\text{g/ml}$. La cinétique de viabilité cellulaire montre que cet effet évolue progressivement au cours du temps (**Figure 37 C**). Des résultats similaires sur l'effet de cette fraction sur la viabilité des cellules d'adénocarcinome pulmonaire NCI-H358 ont été rapportés (Bechohra *et al.*, 2016). La fraction AahG50 à 50 $\mu\text{g/ml}$ diminue la viabilité cellulaire probablement des mécanismes d'apoptose ou de nécrose cellulaire (Bechohra *et al.*, 2016). Récemment, d'autres travaux ont rapporté que certains peptides issus de cette fraction ont diminué la prolifération des cellules du cancer de la prostate DU145 et de glioblastome humain U87 (Aissaoui *et al.*, 2018a ; BenAissa *et al.*, 2020). C'est le cas de la toxine AahIV, un peptide de 55 acides aminés purifiés à partir de la fraction AahG50, qui diminue la prolifération des cellules DU145 à une concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$. La même toxine diminue légèrement l'adhésion cellulaire de 11% (BenAissa *et al.*, 2020). Des études électrophysiologiques montrent que la toxine AahIV ralentit l'inactivation rapide du canal $\text{Nav}1.6$ et que ce canal pourrait être impliqué dans la prolifération des cellules DU145 (BenAissa *et al.*, 2020). Une autre toxine nommée KAaH2, diminue la prolifération des cellules U87 de glioblastomes incubées, pendant 72h, avec 15 μM de cette toxine. Les auteurs suggèrent

que KAaH2 pourrait interagir directement ou indirectement avec le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) pour inhiber la prolifération des cellules U87. L'interaction de KAaH2 avec l'EGFR empêche probablement l'activation de son domaine tyrosine kinase ce qui bloque l'activation des voies de signalisation sous-jacentes (AKT, ERK) (Aissaoui *et al.*, 2018a).

16 sous-fractions chevauchantes sont apparues suite à la purification de la fraction AahG50 par HPLC. (**Figure 39 C**). L'effet de chaque sous-fractions est évalué sur la viabilité des cellules MDA-MB-231. Deux sous-fractions nommées AahG50_2 et AahG50_6 diminuent significativement la viabilité cellulaire (**Figure 40B**). Ces deux sous-fractions à 50 µg/ml ont montré un effet persistant et progressif sur la viabilité cellulaire au cours du temps (**Figure 41 B**). Comme pour la fraction M2 et sa sous-fraction M2_15, les sous-fractions AahG50_2 et AahG50_6 ont montré un effet inhibiteur plus important que celui de leur fraction mère AahG50. En effet, l'AahG50_2 et l'AahG50_6 diminuent respectivement la viabilité cellulaire de $35 \pm 5 \%$ et $26 \pm 4 \%$ en comparaison avec la fraction AahG50 qui diminue seulement de $21 \pm 4 \%$.

Plusieurs travaux ont montré des changements dans la dynamique du Ca^{2+} intracellulaire dans différents types de cancer (Azimi *et al.*, 2014 ; Prevarskaya *et al.*, 2014). Les changements de l'homéostasie calcique sont souvent associés à la prolifération, la migration/invasion et/ou l'échappement à l'apoptose cellulaire (Azimi *et al.*, 2014 ; Prevarskaya *et al.*, 2014). Dans les cellules du cancer du sein, les niveaux intracellulaires de Ca^{2+} peuvent être augmentés suite à la libération du Ca^{2+} par les réserves intracellulaires ou par un flux extracellulaire de Ca^{2+} via les canaux calciques de la membrane plasmique régulés par la contenance en Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique appelés SOCs pour (Store-Operated Channels). L'entrée de type SOCE (Store-Operated Calcium Entry), correspond à l'entrée du calcium extracellulaire déclenchée suite l'épuisement des réserves intracellulaires de Ca^{2+} au niveau du réticulum endoplasmique est l'une des principales voies d'entrée du calcium via les canaux SOCs. Ce mécanisme joue un rôle important dans l'homéostasie du calcium intracellulaire. Il a été démontré que l'entrée de type SOCE est directement impliquée dans de multiples aspects de la progression du cancer, notamment la prolifération, la migration, l'invasion, l'angiogenèse et la résistance à l'apoptose (Azimi *et al.*, 2018 ; Jardin *et al.*, 2018).

Les composants clés de l'entrée SOCE sont la molécule d'interaction stromale 1 (STIM1) et les canaux perméables au Ca^{2+} de la famille ORAI dans la membrane plasmique (Yoast *et al.*, 2020). Le remodelage de l'homéostasie du Ca^{2+} peut être médié par la régulation à la hausse

dans l'expression de ces canaux et également des pompes à Ca^{2+} (Stewart *et al.*, 2015). Ainsi, dans les cellules cancéreuses du sein triple négative, telles que les cellules MDA MB-231, l'entrée SOCE est fortement dépendante de STIM1 et ORAI1 (Motiani *et al.*, 2010). Récemment, STIM1 et ORAI1 ont été rapportés comme modulateurs de viabilité, de migration et d'apoptose (Lopez *et al.*, 2021). Nos travaux montrent que les deux sous-fractions AahG50_2 et AahG50_6 n'ont aucun effet sur le niveau d'expression transcriptionnelle des canaux ORAI1 et STIM1 dans les cellules MDA-MB-231. Ces résultats n'empêchent dans aucun cas des éventuels effets au niveau fonctionnel du canal. Il est connu que les principales interactions des peptides de scorpion avec les canaux ioniques sont principalement des interactions de type protéine-protéine (Pringos *et al.*, 2011 ; Ksouri *et al.*, 2018 ; Clairfeuille *et al.*, 2019 ; Hmaidi *et al.*, 2022). Ces peptides agissent en bloquant les pores des canaux (effet bouchon) ou en interagissant avec un site actif sur le canal pour modifier sa fonction (Terlau *et al.*, 1991 ; Hmaidi *et al.*, 2022). Ceci peut être le cas des sous-fractions AahG50_2 et AahG50_6.

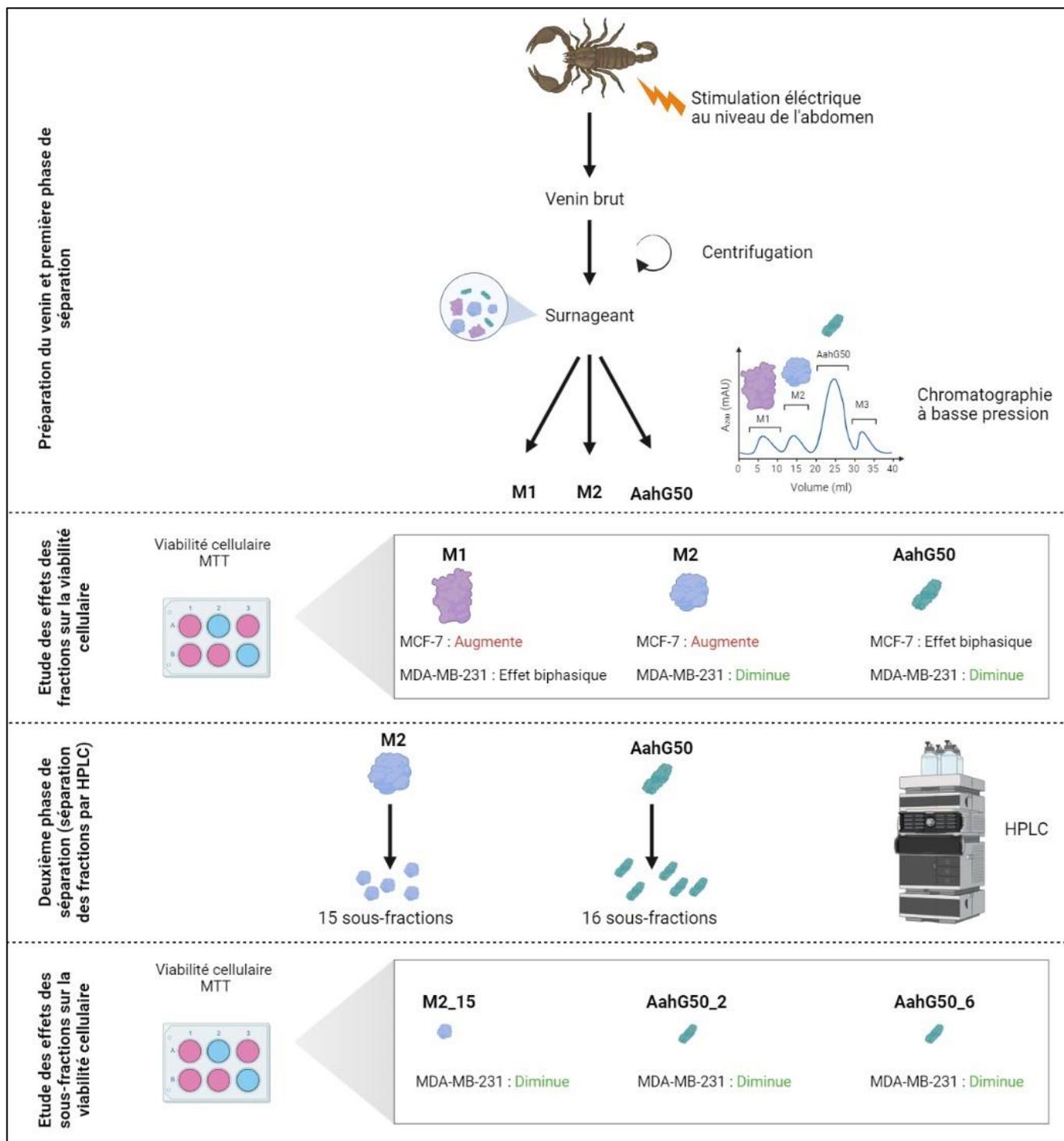


Figure 44 :Schéma de synthèse de l'évaluation des fractions issues du venin de scorpion Aah sur la viabilité des cellules cancéreuses mammaires humaines

Conclusion et perspectives

Dans ce travail de thèse nous avons investigué le venin de scorpion Aah pour apporter des avancées dans le traitement des envenimations par ce venin ainsi que l'isolement des nouvelles molécules qui peuvent limiter le développement du cancer du sein agressif. En effet, nos résultats mettent en évidence :

- Une caractérisation électrophysiologique, pharmacologique et structurale de l'interaction de la neurotoxine la plus active du venin, la toxine AahII avec le canal sodique Nav1.5.
 - AahII ralentit 4 fois l'inactivation rapide du canal Nav1.5 à 75 nM sans affecter l'amplitude du courant.
 - AahII se lie d'une façon extracellulaire au niveau du site 3 du canal Nav1.5, cette liaison est dynamique et fonctionnellement active.
 - AahII se lie au canal Nav1.5 par l'intermédiaire de sa boucle $\beta 2\beta 3$ et de son domaine C-terminal *via* les résidus Ala39 et Arg62 respectivement. Le résidu Ala39 de AahII interagit avec les résidus Gln1615 et Lys1616 du canal Nav1.5 par le biais des liaisons hydrogènes, tandis que le résidu Arg62 de AahII interagit avec le résidu Asp1553 situé sur la boucle extracellulaire entre S1-S2 du canal Nav1.5 par les mêmes types de liaisons.
 - Au niveau physiologique AahII augmente l'invasion des cellules MDA-MB-231 probablement par l'interaction avec le canal Nav1.5 qui module ce phénomène dans ce type cellulaire (Roger *et al.*, 2003).
- Une caractérisation électrophysiologique et pharmacologique de la modulation de l'interaction de AahII-Nav1.5 par le nanoanticorps Nb10 (anti-AahII) hautement neutralisant de l'effet de AahII *in vivo*.
 - Nb10 abolit totalement l'effet de la toxine AahII sur l'inactivation rapide du canal Nav1.5 avec un ratio de 1 :1 sans affecter l'amplitude du courant au pic.
 - le Nb10 déstabilise et dissocie le complexe AahII-Nav1.5 avec un ratio de 1 :1 en perfusion. Nous suggérons que Nb10 interagit avec une grande affinité à la toxine AahII ce qui bloque parfaitement les deux surfaces de liaison utilisées par AahII pour interagir avec le canal Nav1.5.
 - Au niveau physiologique, l'application du Nb10 à un ratio 1 :1 par rapport à la AahII, inhibe complètement l'effet pro-invasif de la toxine sur les cellules MDA-MB-231.

- Trois sous-fractions issues de multiples purifications du venin de scorpion Aah qui diminuent la viabilité des cellules MDA-MB-231.
 - Les 3 sous-fractions (M2_15, AahG50_2 et AahG50_6) issues d'une purification HPLC de la fraction M2 et de AahG50 respectivement, diminuent davantage la viabilité cellulaire en comparaison avec leurs fractions mères correspondantes.

Afin de compléter ce travail, des expériences complémentaires restent à réaliser, notamment :

Pour la partie 1 :

- La détermination de la concentration efficace médiane CE_{50} de l'interaction de AahII avec le canal $Nav1.5$ pour mieux déterminer l'efficacité de la toxine. Dans ce travail nous avons testé 3 concentrations de AahII (300 nM, 150 nM et 75 nM). Pour une meilleure caractérisation de la valeur de CE_{50} , nous souhaitons tester l'effet de AahII sur l'inactivation rapide du canal $Nav1.5$ par patch-clamp suivant une gamme de concentration plus importante allant de 1 nM jusqu'à 1 μ M (1 nM, 10 nM, 100 nM, 500 nM et 1 μ M).
- Le calcul de la constante de dissociation à l'équilibre K_d suite au calcul des valeurs de k_{on} et k_{off} de l'interaction du complexe AahII- $Nav1.5$ pour connaître l'affinité de la toxine par rapport au canal. Le calcul de la valeur de K_d peut être réalisé à l'aide de la technique de la résonance des plasmons de surface (SPR). L'affinité de l'interaction de AahII- $Nav1.5$ peut ensuite être comparée avec l'affinité d'interaction de AahII-Nb10 pour valider nos résultats.

Pour la partie 2 :

- Le calcul de la concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) des trois sous fractions M2_15, AahG50_2 et AahG50_6 pour évaluer leur toxicité *in vitro*. Pour cela nous proposons d'augmenter la gamme de concentration et tester à forte dose l'effet des sous-fractions sur la viabilité cellulaire pour évaluer CI_{50} .
- Evaluer l'effet des trois sous-fractions sur la mortalité cellulaire (apoptose, nécrose, autophagie ...) et sur la prolifération cellulaire (cycle cellulaire).
- Tester la cytotoxicité des 3 sous-fractions sur une lignée de cellules épithéliales mammaires humaines saines, notamment la MCF10A.
- Déterminer par spectroscopie de masse la composition exacte des sous-fractions et la séquence d'acides aminés du/des peptide(s) majoritaire(s) et la/les comparer avec

d'autres peptides homologues dans la base « Uniprot ». Nous sommes en collaboration avec l'institut Pasteur de Paris pour réaliser ce travail.

- Étudier fonctionnellement une potentielle implication des acteurs calciques dans l'effet inhibiteur des sous-fractions M2_15, AahG50_2 et AahG50_6 sur la viabilité des cellules MDA-MB-231. Etant donné que les canaux ORAI1, TRPC6 et la protéine STIM1 sont impliqués dans les processus de viabilité et de prolifération des cellules MDA-MB-231 (Jardin *et al.*, 2018), nous envisageons d'évaluer par la technique d'imagerie calcique :
 - L'entrée de type SOCE en suivant un protocole « SOCE » détaillé dans la partie Matériels et méthodes
 - Un effet potentiel sur l'entrée basale en suivant le protocole de Quench manganèse détaillé dans la partie Matériels et méthodes
- Faire des tests de cytotoxicité *in vivo* sur des souris pour déterminer la valeur de la DL₅₀.

Références bibliographiques

- Abderrazek, R.B., Hmila, I., Vincke, C., Benlasfar, Z., Pellis, M., Dabbek, H., Saerens, D., El Ayeb, M., Muyltermans, S., and Bouhaouala-Zahar, B. (2009). Identification of potent nanobodies to neutralize the most poisonous polypeptide from scorpion venom. *Biochem J* 424, 263-272.
- Ahern, C.A. (2013). What activates inactivation? *J Gen Physiol* 142, 97-100.
- Ahmadi, S., Knerr, J.M., Argemi, L., Bordon, K.C.F., Pucca, M.B., Cerni, F.A., Arantes, E.C., Caliskan, F., and Laustsen, A.H. (2020). Scorpion Venom: Detriments and Benefits. *Biomedicines* 8.
- Aissaoui, D., Mlayah-Bellalouna, S., Jebali, J., Abdelkafi-Koubaa, Z., Souid, S., Moslah, W., Othman, H., Luis, J., Elayeb, M., Marrakchi, N., Essafi-Benkhadir, K., and Srairi-Abid, N. (2018a). Functional role of Kv1.1 and Kv1.3 channels in the neoplastic progression steps of three cancer cell lines, elucidated by scorpion peptides. *Int J Biol Macromol* 111, 1146-1155.
- Aissaoui, D., Mlayah-Bellalouna, S., Jebali, J., Abdelkafi-Koubaa, Z., Souid, S., Moslah, W., Othman, H., Luis, J., Elayeb, M., Marrakchi, N., Essafi-Benkhadir, K., and Srairi-Abid, N.J.I.J.O.B.M. (2018b). Functional role of Kv1.1 and Kv1.3 channels in the neoplastic progression steps of three cancer cell lines, elucidated by scorpion peptides. 111, 1146-1155.
- Ait-Amara, D., Chavez-Olortegui, C., Romi, R., Mery, J., Brugidou, J., Albericio, F., Devaux, C., and Granier, C. (1993). Antibodies cross-reactive with the scorpion-toxin II from *Androctonus australis Hector* elicited in mice by a synthetic peptide. *Nat Toxins* 1, 255-262.
- Akopian, A.N., Sivilotti, L., and Wood, J.N. (1996). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 379, 257-262.
- Al-Asmari, A.K., Islam, M., and Al-Zahrani, A.M. (2016a). In vitro analysis of the anticancer properties of scorpion venom in colorectal and breast cancer cell lines. *Oncol Lett* 11, 1256-1262.
- Al-Asmari, A.K., Kunnathodi, F., Al Saadon, K., and Idris, M.M. (2016b). Elemental analysis of scorpion venoms. *J Venom Res* 7, 16-20.
- Al-Asmari, A.K., Riyasdeen, A., and Islam, M. (2018). Scorpion Venom Causes Apoptosis by Increasing Reactive Oxygen Species and Cell Cycle Arrest in MDA-MB-231 and HCT-8 Cancer Cell Lines. *J Evid Based Integr Med* 23, 2156587217751796.
- Almeida, D.D., Scortecci, K.C., Kobashi, L.S., Agnez-Lima, L.F., Medeiros, S.R., Silva-Junior, A.A., Junqueira-De-Azevedo Ide, L., and Fernandes-Pedrosa Mde, F. (2012). Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. *BMC Genomics* 13, 362.
- Altafaj, X., Cheng, W., Esteve, E., Urbani, J., Grunwald, D., Sabatier, J.M., Coronado, R., De Waard, M., and Ronjat, M. (2005). Maurocalcine and domain A of the II-III loop of the dihydropyridine receptor Cav 1.1 subunit share common binding sites on the skeletal ryanodine receptor. *J Biol Chem* 280, 4013-4016.
- Alvarenga, L., Moreau, V., Felicori, L., Nguyen, C., Duarte, C., Chavez-Olortegui, C., Molina, F., Martin-Eauclaire, M.F., and Granier, C. (2010). Design of antibody-reactive peptides from discontinuous parts of scorpion toxins. *Vaccine* 28, 970-980.
- Arcangeli, A., and Becchetti, A. (2006). Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels. *Trends Cell Biol* 16, 631-639.
- Armstrong, C.M. (2006). Na channel inactivation from open and closed states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17991-17996.
- Armstrong, C.M., and Bezanilla, F. (1973). Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 242, 459-461.
- Aroui, S., Dardevet, L., Ben Ajmia, W., De Boisvilliers, M., Perrin, F., Laajimi, A., Boumendjel, A., Kenani, A., Muller, J.M., and De Waard, M. (2015). A Novel Platinum-Maurocalcine Conjugate Induces Apoptosis of Human Glioblastoma Cells by Acting through the ROS-ERK/AKT-p53 Pathway. *Mol Pharm* 12, 4336-4348.
- Aroui, S., Dardevet, L., Najlaoui, F., Kammoun, M., Laajimi, A., Fetoui, H., De Waard, M., and Kenani, A. (2016). PTEN-regulated AKT/FoxO3a/Bim signaling contributes to Human cell glioblastoma apoptosis by platinum-maurocalcine conjugate. *Int J Biochem Cell Biol* 77, 15-22.
- Aroui, S., Ram, N., Appaix, F., Ronjat, M., Kenani, A., Pirollet, F., and De Waard, M. (2009). Maurocalcine as a non toxic drug carrier overcomes doxorubicin resistance in the cancer cell line MDA-MB 231. *Pharm Res* 26, 836-845.

- Artym, V.V., and Petty, H.R. (2002). Molecular proximity of Kv1.3 voltage-gated potassium channels and beta(1)-integrins on the plasma membrane of melanoma cells: effects of cell adherence and channel blockers. *J Gen Physiol* 120, 29-37.
- Aubrey, N., Devaux, C., Sizaret, P.Y., Rochat, H., Goyffon, M., and Billiald, P. (2003). Design and evaluation of a diabody to improve protection against a potent scorpion neurotoxin. *Cell Mol Life Sci* 60, 617-628.
- Azimi, I., Bong, A.H., Poo, G.X.H., Armitage, K., Lok, D., Roberts-Thomson, S.J., and Monteith, G.R. (2018). Pharmacological inhibition of store-operated calcium entry in MDA-MB-468 basal A breast cancer cells: consequences on calcium signalling, cell migration and proliferation. *Cell Mol Life Sci* 75, 4525-4537.
- Azimi, I., Roberts-Thomson, S.J., and Monteith, G.R. (2014). Calcium influx pathways in breast cancer: opportunities for pharmacological intervention. *Br J Pharmacol* 171, 945-960.
- Bachsais, N., Boussag-Abib, L., and Laraba-Djebari, F. (Year). "Assessment of Inflammatory response of developed vaccine against scorpion envenomation using attenuated venom".
- Bahraoui, E., El Ayeb, M., Granier, C., and Rochat, H. (1987a). Immunochemistry of scorpion toxins. Immunogenicity of peptide 19-28 a model of an accessible and relatively rigid region. *Eur J Biochem* 167, 371-375.
- Bahraoui, E., El Ayeb, M., Granier, C., Van Rietschoten, J., and Rochat, H. (1987b). Antigenicity of peptide 19-28 of toxin II from the scorpion *Androctonus australis* as measured by different solid-phase tests and characterization of specific antibodies purified by immunoaffinity on the peptide or the toxin. *Toxicon* 25, 957-964.
- Bahraoui, E., El Ayeb, M., Van Rietschoten, J., Rochat, H., and Granier, C. (1986a). Immunochemistry of scorpion alpha-toxins: study with synthetic peptides of the antigenicity of four regions of toxin II of *Androctonus australis* Hector. *Mol Immunol* 23, 357-366.
- Bahraoui, E., Pichon, J., Muller, J.M., Darbon, H., Elayeb, M., Granier, C., Marvaldi, J., and Rochat, H. (1988). Monoclonal antibodies to scorpion toxins. Characterization and molecular mechanisms of neutralization. *J Immunol* 141, 214-220.
- Bahraoui, E.M., Granier, C., Van Rietschoten, J., Rochat, H., and El Ayeb, M. (1986b). Specificity and neutralizing capacity of antibodies elicited by a synthetic peptide of scorpion toxin. *J Immunol* 136, 3371-3377.
- Bahring, R., and Covarrubias, M. (2011). Mechanisms of closed-state inactivation in voltage-gated ion channels. *J Physiol* 589, 461-479.
- Banasiak, K.J., Burenkova, O., and Haddad, G.G. (2004). Activation of voltage-sensitive sodium channels during oxygen deprivation leads to apoptotic neuronal death. *Neuroscience* 126, 31-44.
- Barres, B.A., Chun, L.L., and Corey, D.P. (1988). Ion channel expression by white matter glia: I. Type 2 astrocytes and oligodendrocytes. *Glia* 1, 10-30.
- Bawaskar, H.S., and Bawaskar, P.H. (2012). Scorpion sting: update. *J Assoc Physicians India* 60, 46-55.
- Bechokra, L., Laraba-Djebari, F., and Hammoudi-Triki, D. (2016). Cytotoxic activity of *Androctonus australis* hector venom and its toxic fractions on human lung cancer cell line. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 22, 29.
- Ben Abderrazek, R., Vincke, C., Hmila, I., Saerens, D., Abidi, N., El Ayeb, M., Muyltermans, S., and Bouhaouala-Zahar, B. (2011). Development of Cys38 knock-out and humanized version of NbAahIII10 nanobody with improved neutralization of AahII scorpion toxin. *Protein Eng Des Sel* 24, 727-735.
- Benaissa, R., Othman, H., Villard, C., Peigneur, S., Mlayah-Bellalouna, S., Abdelkafi-Koubaa, Z., Marrakchi, N., Essafi-Benkhadir, K., Tytgat, J., Luis, J., and Srairi-Abid, N. (2020). AaHIV a sodium channel scorpion toxin inhibits the proliferation of DU145 prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 521, 340-346.
- Benkhadir, K., Kharrat, R., Cestele, S., Mosbah, A., Rochat, H., El Ayeb, M., and Karoui, H. (2004). Molecular cloning and functional expression of the alpha-scorpion toxin BotIII: pivotal role of the C-terminal region for its interaction with voltage-dependent sodium channels. *Peptides* 25, 151-161.

- Benoit, E. (1998). [Mechanism of action of neurotoxins acting on the inactivation of voltage-gated sodium channels]. *C R Seances Soc Biol Fil* 192, 409-436.
- Berta, T., Poirot, O., Pertin, M., Ji, R.R., Kellenberger, S., and Decosterd, I. (2008). Transcriptional and functional profiles of voltage-gated Na⁺ channels in injured and non-injured DRG neurons in the SNI model of neuropathic pain. *Mol Cell Neurosci* 37, 196-208.
- Black, J.A., Liu, S., and Waxman, S.G. (2009). Sodium channel activity modulates multiple functions in microglia. *Glia* 57, 1072-1081.
- Black, J.A., Renganathan, M., and Waxman, S.G. (2002). Sodium channel Na(v)1.6 is expressed along nonmyelinated axons and it contributes to conduction. *Brain Res Mol Brain Res* 105, 19-28.
- Black, J.A., and Waxman, S.G. (2013). Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 80, 280-291.
- Black, J.A., Westenbroek, R.E., Catterall, W.A., and Waxman, S.G. (1995). Type II brain sodium channel expression in non-neuronal cells: embryonic rat osteoblasts. *Brain Res Mol Brain Res* 34, 89-98.
- Boiko, T., Rasband, M.N., Levinson, S.R., Caldwell, J.H., Mandel, G., Trimmer, J.S., and Matthews, G. (2001). Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon. *Neuron* 30, 91-104.
- Bontems, F., Roumestand, C., Boyot, P., Gilquin, B., Doljansky, Y., Menez, A., and Toma, F. (1991). Three-dimensional structure of natural charybdotoxin in aqueous solution by 1H-NMR. Charybdotoxin possesses a structural motif found in other scorpion toxins. *Eur J Biochem* 196, 19-28.
- Bortner, C.D., and Cidlowski, J.A. (2003). Uncoupling cell shrinkage from apoptosis reveals that Na⁺ influx is required for volume loss during programmed cell death. *J Biol Chem* 278, 39176-39184.
- Bosmans, F., and Tytgat, J. (2007). Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. *Toxicon* 49, 142-158.
- Brackenbury, W.J., and Djamgoz, M.B. (2006). Activity-dependent regulation of voltage-gated Na⁺ channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line. *J Physiol* 573, 343-356.
- Brackenbury, W.J., and Isom, L.L. (2011). Na Channel beta Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Front Pharmacol* 2, 53.
- Brooks, P.C., Stromblad, S., Sanders, L.C., Von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P., and Cheresch, D.A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85, 683-693.
- Burgess, D.L., Kohrman, D.C., Galt, J., Plummer, N.W., Jones, J.M., Spear, B., and Meisler, M.H. (1995). Mutation of a new sodium channel gene, Scn8a, in the mouse mutant 'motor endplate disease'. *Nat Genet* 10, 461-465.
- Campos, F.V., Chanda, B., Beirao, P.S., and Bezanilla, F. (2007). beta-Scorpion toxin modifies gating transitions in all four voltage sensors of the sodium channel. *J Gen Physiol* 130, 257-268.
- Cao, Z., Di, Z., Wu, Y., and Li, W. (2014). Overview of scorpion species from China and their toxins. *Toxins (Basel)* 6, 796-815.
- Carmo, A.O., Chatzaki, M., Horta, C.C., Magalhaes, B.F., Oliveira-Mendes, B.B., Chavez-Olortegui, C., and Kalapothakis, E. (2015). Evolution of alternative methodologies of scorpion antivenoms production. *Toxicon* 97, 64-74.
- Carrithers, M.D., Chatterjee, G., Carrithers, L.M., Offoha, R., Iheagwara, U., Rahner, C., Graham, M., and Waxman, S.G. (2009). Regulation of podosome formation in macrophages by a splice variant of the sodium channel SCN8A. *J Biol Chem* 284, 8114-8126.
- Carroll, S.B., Thalley, B.S., Theakston, R.D., and Laing, G. (1992). Comparison of the purity and efficacy of affinity purified avian antivenoms with commercial equine crotalid antivenoms. *Toxicon* 30, 1017-1025.
- Catterall, W.A. (1986). Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu Rev Biochem* 55, 953-985.
- Catterall, W.A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13-25.

- Catterall, W.A., Goldin, A.L., and Waxman, S.G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57, 397-409.
- Cestele, S., Qu, Y., Rogers, J.C., Rochat, H., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1998). Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron* 21, 919-931.
- Cestele, S., Yarov-Yarovoy, V., Qu, Y., Sampieri, F., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2006). Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin. *J Biol Chem* 281, 21332-21344.
- Chanda, B., and Bezanilla, F. (2002). Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation. *J Gen Physiol* 120, 629-645.
- Chavez-Olortegui, C., Amara, D.A., Rochat, H., Diniz, C., and Granier, C. (1991). In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. *Vaccine* 9, 907-910.
- Cheah, C.S., Yu, F.H., Westenbroek, R.E., Kalume, F.K., Oakley, J.C., Potter, G.B., Rubenstein, J.L., and Catterall, W.A. (2012). Specific deletion of NaV1.1 sodium channels in inhibitory interneurons causes seizures and premature death in a mouse model of Dravet syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 14646-14651.
- Chen, C., Bharucha, V., Chen, Y., Westenbroek, R.E., Brown, A., Malhotra, J.D., Jones, D., Avery, C., Gillespie, P.J., 3rd, Kazen-Gillespie, K.A., Kazarinova-Noyes, K., Shrager, P., Saunders, T.L., Macdonald, R.L., Ransom, B.R., Scheuer, T., Catterall, W.A., and Isom, L.L. (2002). Reduced sodium channel density, altered voltage dependence of inactivation, and increased susceptibility to seizures in mice lacking sodium channel beta 2-subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 17072-17077.
- Chen, C., Westenbroek, R.E., Xu, X., Edwards, C.A., Sorenson, D.R., Chen, Y., Mcewen, D.P., O'malley, H.A., Bharucha, V., Meadows, L.S., Knudsen, G.A., Vilaythong, A., Noebels, J.L., Saunders, T.L., Scheuer, T., Shrager, P., Catterall, W.A., and Isom, L.L. (2004). Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *J Neurosci* 24, 4030-4042.
- Cheng, Y., Zhao, J., Qiao, W., and Chen, K. (2014). Recent advances in diagnosis and treatment of gliomas using chlorotoxin-based bioconjugates. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 4, 385-405.
- Chiche, L., Gaboriaud, C., Heitz, A., Mornon, J.P., Castro, B., and Kollman, P.A. (1989). Use of restrained molecular dynamics in water to determine three-dimensional protein structure: prediction of the three-dimensional structure of Ecballium elaterium trypsin inhibitor II. *Proteins* 6, 405-417.
- Chippaux, J.P. (2012). Emerging options for the management of scorpion stings. *Drug Des Devel Ther* 6, 165-173.
- Chippaux, J.P., and Goyffon, M. (2008). Epidemiology of scorpionism: a global appraisal. *Acta Trop* 107, 71-79.
- Chiu, S.Y., Shrager, P., and Ritchie, J.M. (1984). Neuronal-type Na⁺ and K⁺ channels in rabbit cultured Schwann cells. *Nature* 311, 156-157.
- Chuang, R.S., Jaffe, H., Cribbs, L., Perez-Reyes, E., and Swartz, K.J. (1998). Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat Neurosci* 1, 668-674.
- Claes, L., Del-Favero, J., Ceulemans, B., Lagae, L., Van Broeckhoven, C., and De Jonghe, P. (2001). De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet* 68, 1327-1332.
- Clairfeuille, T., Cloake, A., Infield, D.T., Llongueras, J.P., Arthur, C.P., Li, Z.R., Jian, Y., Martin-Eauclaire, M.F., Bougis, P.E., Ciferri, C., Ahern, C.A., Bosmans, F., Hackos, D.H., Rohou, A., and Payandeh, J. (2019). Structural basis of alpha-scorpion toxin action on Nav channels. *Science* 363.
- Clot-Faybesse, O., Juin, M., Rochat, H., and Devaux, C. (1999). Monoclonal antibodies against the *Androctonus australis* hector scorpion neurotoxin I: characterisation and use for venom neutralisation. *FEBS Lett* 458, 313-318.
- Cohen-Inbar, O., and Zaaroor, M. (2016). Glioblastoma multiforme targeted therapy: The Chlorotoxin story. *J Clin Neurosci* 33, 52-58.

- Cohen, L., Ilan, N., Gur, M., Stuhmer, W., Gordon, D., and Gurevitz, M. (2007). Design of a specific activator for skeletal muscle sodium channels uncovers channel architecture. *J Biol Chem* 282, 29424-29430.
- Cox, J.J., Reimann, F., Nicholas, A.K., Thornton, G., Roberts, E., Springell, K., Karbani, G., Jafri, H., Mannan, J., Raashid, Y., Al-Gazali, L., Hamamy, H., Valente, E.M., Gorman, S., Williams, R., Mchale, D.P., Wood, J.N., Gribble, F.M., and Woods, C.G. (2006). An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 444, 894-898.
- Cuddapah, V.A., Robel, S., Watkins, S., and Sontheimer, H. (2014). A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci* 15, 455-465.
- Dabby, R., Sadeh, M., Broitman, Y., Yosovich, K., Dickman, R., and Leshinsky-Silver, E. (2016). Painful small fiber neuropathy with gastroparesis: A new phenotype with a novel mutation in the SCN10A gene. *J Clin Neurosci* 26, 84-88.
- Darbon, H. (1999). [Animal toxins and ion channels]. *J Soc Biol* 193, 445-450.
- Dardevet, L., Rani, D., Aziz, T.A., Bazin, I., Sabatier, J.M., Fadl, M., Brambilla, E., and De Waard, M. (2015). Chlorotoxin: a helpful natural scorpion peptide to diagnose glioma and fight tumor invasion. *Toxins (Basel)* 7, 1079-1101.
- Darvish, M., Ebrahimi, S.A., Shahbazzadeh, D., Bagheri, K.P., Behdani, M., and Shokrgozar, M.A. (2016). Camelid antivenom development and potential in vivo neutralization of Hottentotta saulcyi scorpion venom. *Toxicon* 113, 70-75.
- Davis, T.H., Chen, C., and Isom, L.L. (2004). Sodium channel beta1 subunits promote neurite outgrowth in cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* 279, 51424-51432.
- Debin, J.A., Maggio, J.E., and Strichartz, G.R. (1993). Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am J Physiol* 264, C361-369.
- Decaen, P.G., Yarov-Yarovoy, V., Sharp, E.M., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2009). Sequential formation of ion pairs during activation of a sodium channel voltage sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 22498-22503.
- Decaen, P.G., Yarov-Yarovoy, V., Zhao, Y., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2008). Disulfide locking a sodium channel voltage sensor reveals ion pair formation during activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15142-15147.
- Deshane, J., Garner, C.C., and Sontheimer, H. (2003). Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem* 278, 4135-4144.
- Detta, N., Frisso, G., and Salvatore, F. (2015). The multi-faceted aspects of the complex cardiac Nav1.5 protein in membrane function and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 1854, 1502-1509.
- Deuis, J.R., Wingerd, J.S., Winter, Z., Durek, T., Dekan, Z., Sousa, S.R., Zimmermann, K., Hoffmann, T., Weidner, C., Nassar, M.A., Alewood, P.F., Lewis, R.J., and Vetter, I. (2016). Analgesic Effects of GpTx-1, PF-04856264 and CNV1014802 in a Mouse Model of Nav1.7-Mediated Pain. *Toxins (Basel)* 8.
- Deuis, J.R., Zimmermann, K., Romanovsky, A.A., Possani, L.D., Cabot, P.J., Lewis, R.J., and Vetter, I. (2013). An animal model of oxaliplatin-induced cold allodynia reveals a crucial role for Nav1.6 in peripheral pain pathways. *Pain* 154, 1749-1757.
- Devaux, C., Clot-Faybesse, O., Juin, M., Mabrouk, K., Sabatier, J.M., and Rochat, H. (1997). Monoclonal antibodies neutralizing the toxin II from *Androctonus australis hector* scorpion venom: usefulness of a synthetic, non-toxic analog. *FEBS Lett* 412, 456-460.
- Devaux, C., Clot-Faybesse, O., Pugniere, M., Mani, J.C., Rochat, H., and Granier, C. (2002). A strategy for inducing an immune response against *Androctonus australis* scorpion venom toxin I in mice. Production of high-affinity monoclonal antibodies and their use in a sensitive two-site immunometric assay. *J Immunol Methods* 271, 37-46.
- Devaux, C., Juin, M., Mansuelle, P., and Granier, C. (1993). Fine molecular analysis of the antigenicity of the *Androctonus australis hector* scorpion neurotoxin II: a new antigenic epitope disclosed by the Pepsican method. *Mol Immunol* 30, 1061-1068.
- Di Tommaso, A., Juste, M.O., Martin-Eauclaire, M.F., Dimier-Poisson, I., Billiald, P., and Aubrey, N. (2012). Diabody mixture providing full protection against experimental scorpion envenoming with crude *Androctonus australis* venom. *J Biol Chem* 287, 14149-14156.
- Diaz-Garcia, A., Morier-Diaz, L., Frion-Herrera, Y., Rodriguez-Sanchez, H., Caballero-Lorenzo, Y., Mendoza-Llanes, D., Riquenes-Garlobo, Y., and Fraga-Castro, J.A. (2013). In vitro anticancer

- effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines. *J Venom Res* 4, 5-12.
- Diaz, C., Rivera, J., Lomonte, B., Bonilla, F., Diego-Garcia, E., Camacho, E., Tytgat, J., and Sasa, M. (2019). Venom characterization of the bark scorpion *Centruroides edwardsii* (Gervais 1843): Composition, biochemical activities and in vivo toxicity for potential prey. *Toxicon* 171, 7-19.
- Dib-Hajj, S.D., Yang, Y., Black, J.A., and Waxman, S.G. (2013). The Na(V)1.7 sodium channel: from molecule to man. *Nat Rev Neurosci* 14, 49-62.
- Ding, J., Chua, P.J., Bay, B.H., and Gopalakrishnakone, P. (2014). Scorpion venoms as a potential source of novel cancer therapeutic compounds. *Exp Biol Med (Maywood)* 239, 387-393.
- Diss, J.K., Archer, S.N., Hirano, J., Fraser, S.P., and Djamgoz, M.B. (2001). Expression profiles of voltage-gated Na(+) channel alpha-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. *Prostate* 48, 165-178.
- Diss, J.K., Stewart, D., Pani, F., Foster, C.S., Walker, M.M., Patel, A., and Djamgoz, M.B. (2005). A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 8, 266-273.
- Djoughri, L., Fang, X., Okuse, K., Wood, J.N., Berry, C.M., and Lawson, S.N. (2003). The TTX-resistant sodium channel Nav1.8 (SNS/PN3): expression and correlation with membrane properties in rat nociceptive primary afferent neurons. *J Physiol* 550, 739-752.
- Dufton, M.J., and Rochat, H. (1984). Classification of scorpion toxins according to amino acid composition and sequence. *J Mol Evol* 20, 120-127.
- Durek, T., Vetter, I., Wang, C.I., Motin, L., Knapp, O., Adams, D.J., Lewis, R.J., and Alewood, P.F. (2013). Chemical engineering and structural and pharmacological characterization of the alpha-scorpion toxin OD1. *ACS Chem Biol* 8, 1215-1222.
- Eberhardson, M., and Grapengiesser, E. (1999). Role of voltage-dependent Na⁺ channels for rhythmic Ca²⁺ signalling in glucose-stimulated mouse pancreatic beta-cells. *Cell Signal* 11, 343-348.
- El-Bitar, A.M., Sarhan, M.M., Aoki, C., Takahara, Y., Komoto, M., Deng, L., Moustafa, M.A., and Hotta, H. (2015). Virocidal activity of Egyptian scorpion venoms against hepatitis C virus. *Virol J* 12, 47.
- El-Ghlban, S., Kasai, T., Shigehiro, T., Yin, H.X., Sekhar, S., Ida, M., Sanchez, A., Mizutani, A., Kudoh, T., Murakami, H., and Seno, M. (2014). Chlorotoxin-Fc fusion inhibits release of MMP-2 from pancreatic cancer cells. *Biomed Res Int* 2014, 152659.
- El-Hayek, R., Antoniu, B., Wang, J., Hamilton, S.L., and Ikemoto, N. (1995). Identification of calcium release-triggering and blocking regions of the II-III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J Biol Chem* 270, 22116-22118.
- El Ayeb, M., Bahraoui, E.M., Granier, C., Delori, P., Van Rietschoten, J., and Rochat, H. (1984). Immunochemistry of scorpion alpha-toxins: purification and characterization of two functionally independent IgG populations raised against toxin II of *Androctonus australis Hector*. *Mol Immunol* 21, 223-232.
- El Ayeb, M., Bahraoui, E.M., Granier, C., and Rochat, H. (1986). Use of antibodies specific to defined regions of scorpion alpha-toxin to study its interaction with its receptor site on the sodium channel. *Biochemistry* 25, 6671-6678.
- El Ayeb, M., Martin, M.F., Delori, P., Bechis, G., and Rochat, H. (1983). Immunochemistry of scorpion alpha-neurotoxins. Determination of the antigenic site number and isolation of a highly enriched antibody specific to a single antigenic site of toxin II of *Androctonus australis Hector*. *Mol Immunol* 20, 697-708.
- Elfessi-Magouri, R., Peigneur, S., Othman, H., Srairi-Abid, N., Elayeb, M., Tytgat, J., and Kharrat, R. (2015). Characterization of Kbot21 Reveals Novel Side Chain Interactions of Scorpion Toxins Inhibiting Voltage-Gated Potassium Channels. *PLoS One* 10, e0137611.
- Erecinska, M., and Dagani, F. (1990). Relationships between the neuronal sodium/potassium pump and energy metabolism. Effects of K⁺, Na⁺, and adenosine triphosphate in isolated brain synaptosomes. *J Gen Physiol* 95, 591-616.
- Escalona, M.P., Batista, C.V., Cassulini, R.R., Rios, M.S., Coronas, F.I., and Possani, L.D. (2014). A proteomic analysis of the early secondary molecular effects caused by Cn2 scorpion toxin on neuroblastoma cells. *J Proteomics* 111, 212-223.

- Escayg, A., Macdonald, B.T., Meisler, M.H., Baulac, S., Huberfeld, G., An-Gourfinkel, I., Brice, A., Leguern, E., Moulard, B., Chaigne, D., Buresi, C., and Malafosse, A. (2000). Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet* 24, 343-345.
- Esteve, E., Mabrouk, K., Dupuis, A., Smida-Rezgui, S., Altafaj, X., Grunwald, D., Platel, J.C., Andreotti, N., Marty, I., Sabatier, J.M., Ronjat, M., and De Waard, M. (2005). Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells. Evidence that the toxin crosses the plasma membrane. *J Biol Chem* 280, 12833-12839.
- Esteve, E., Smida-Rezgui, S., Sarkozi, S., Szegedi, C., Regaya, I., Chen, L., Altafaj, X., Rochat, H., Allen, P., Pessah, I.N., Marty, I., Sabatier, J.M., Jona, I., De Waard, M., and Ronjat, M. (2003). Critical amino acid residues determine the binding affinity and the Ca²⁺ release efficacy of maurocalcine in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 278, 37822-37831.
- Fabrichny, I.P., Mondielli, G., Conrod, S., Martin-Eauclaire, M.F., Bourne, Y., and Marchot, P. (2012). Structural insights into antibody sequestering and neutralizing of Na⁺ channel alpha-type modulator from old world scorpion venom. *J Biol Chem* 287, 14136-14148.
- Fajloun, Z., Kharrat, R., Chen, L., Lecomte, C., Di Luccio, E., Bichet, D., El Ayeub, M., Rochat, H., Allen, P.D., Pessah, I.N., De Waard, M., and Sabatier, J.M. (2000). Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca(2+) release channel/ryanodine receptors. *FEBS Lett* 469, 179-185.
- Fan, S., Sun, Z., Jiang, D., Dai, C., Ma, Y., Zhao, Z., Liu, H., Wu, Y., Cao, Z., and Li, W. (2010). BmKCT toxin inhibits glioma proliferation and tumor metastasis. *Cancer Lett* 291, 158-166.
- Feola, A., Perrone, M.A., Piscopo, A., Casella, F., Della Pietra, B., and Di Mizio, G. (2020). Autopsy Findings in Case of Fatal Scorpion Sting: A Systematic Review of the Literature. *Healthcare (Basel)* 8.
- Fertleman, C.R., Baker, M.D., Parker, K.A., Moffatt, S., Elmslie, F.V., Abrahamsen, B., Ostman, J., Klugbauer, N., Wood, J.N., Gardiner, R.M., and Rees, M. (2006). SCN9A mutations in paroxysmal extreme pain disorder: allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes. *Neuron* 52, 767-774.
- Fontecilla-Camps, J.C., Habersetzer-Rochat, C., and Rochat, H. (1988). Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis Hector*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7443-7447.
- Fraser, S.P., Diss, J.K., Chioni, A.M., Mycielska, M.E., Pan, H., Yamaci, R.F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W.J., Theodorou, D., Koyuturk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M.T., Slade, M.J., Tolhurst, R., Palmieri, C., Jiang, J., Latchman, D.S., Coombes, R.C., and Djamgoz, M.B. (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 11, 5381-5389.
- Fraser, S.P., Grimes, J.A., and Djamgoz, M.B. (2000). Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines. *Prostate* 44, 61-76.
- Fu, Y.J., Yin, L.T., Liang, A.H., Zhang, C.F., Wang, W., Chai, B.F., Yang, J.Y., and Fan, X.J. (2007). Therapeutic potential of chlorotoxin-like neurotoxin from the Chinese scorpion for human gliomas. *Neurosci Lett* 412, 62-67.
- Fukuoka, T., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Obata, K., Dai, Y., and Noguchi, K. (2008). Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons. *J Comp Neurol* 510, 188-206.
- Fuller, M.D., Thompson, C.H., Zhang, Z.R., Freeman, C.S., Schay, E., Szakacs, G., Bakos, E., Sarkadi, B., McMaster, D., French, R.J., Pohl, J., Kubanek, J., and McCarty, N.A. (2007). State-dependent inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by a novel peptide toxin. *J Biol Chem* 282, 37545-37555.
- Gaete, V., Núñez, M.T., Glass, J.J.J.O.B., and Biomembranes (1991). Cl⁻, Na⁺, and H⁺ fluxes during the acidification of rabbit reticulocyte endocytic vesicles. 23, 147-160.
- Garcia Y Perez, G., Martin, M.F., and Rochat, H. (1988). Preparation of a polyvalent antivenom against various Mexican scorpion *Centruroides* species. *Toxicon* 26, 1102-1106.
- Gardella, E., Becker, F., Moller, R.S., Schubert, J., Lemke, J.R., Larsen, L.H., Eiberg, H., Nothnagel, M., Thiele, H., Altmuller, J., Syrbe, S., Merckenschlager, A., Bast, T., Steinhoff, B., Nurnberg,

- P., Mang, Y., Bakke Moller, L., Gellert, P., Heron, S.E., Dibbens, L.M., Weckhuysen, S., Dahl, H.A., Biskup, S., Tommerup, N., Hjalgrim, H., Lerche, H., Beniczky, S., and Weber, Y.G. (2016). Benign infantile seizures and paroxysmal dyskinesia caused by an SCN8A mutation. *Ann Neurol* 79, 428-436.
- Gautier, M., Trebak, M., Fleig, A., Vandier, C., and Ouadid-Ahidouch, H. (2019). Ca(2+) homeostasis and cancer. *Cell Calcium* 84, 102084.
- Gazarian, K.G., Gazarian, T., Hernandez, R., and Possani, L.D. (2005). Immunology of scorpion toxins and perspectives for generation of anti-venom vaccines. *Vaccine* 23, 3357-3368.
- Goldberg, Y.P., Macfarlane, J., Macdonald, M.L., Thompson, J., Dube, M.P., Mattice, M., Fraser, R., Young, C., Hossain, S., Pape, T., Payne, B., Radomski, C., Donaldson, G., Ives, E., Cox, J., Younghusband, H.B., Green, R., Duff, A., Boltshauser, E., Grinspan, G.A., Dimon, J.H., Sibley, B.G., Andria, G., Toscano, E., Kerdraon, J., Bowsher, D., Pimstone, S.N., Samuels, M.E., Sherrington, R., and Hayden, M.R. (2007). Loss-of-function mutations in the Nav1.7 gene underlie congenital indifference to pain in multiple human populations. *Clin Genet* 71, 311-319.
- Goldin, A.L. (2003). Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr Opin Neurobiol* 13, 284-290.
- Goldin, A.L., Barchi, R.L., Caldwell, J.H., Hofmann, F., Howe, J.R., Hunter, J.C., Kallen, R.G., Mandel, G., Meisler, M.H., Netter, Y.B., Noda, M., Tamkun, M.M., Waxman, S.G., Wood, J.N., and Catterall, W.A. (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28, 365-368.
- Gomes, A., Bhattacharjee, P., Mishra, R., Biswas, A.K., Dasgupta, S.C., and Giri, B. (2010). Anticancer potential of animal venoms and toxins. *Indian J Exp Biol* 48, 93-103.
- Goral, R.O., Leipold, E., Nematian-Ardestani, E., and Heinemann, S.H. (2015). Heterologous expression of Nav1.9 chimeras in various cell systems. *Pflugers Arch* 467, 2423-2435.
- Gordon, D., Karbat, I., Ilan, N., Cohen, L., Kahn, R., Gilles, N., Dong, K., Stuhmer, W., Tytgat, J., and Gurevitz, M. (2007). The differential preference of scorpion alpha-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control. *Toxicon* 49, 452-472.
- Goudet, C., Chi, C.W., and Tytgat, J. (2002). An overview of toxins and genes from the venom of the Asian scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon* 40, 1239-1258.
- Graf, N., Mokhtari, T.E., Papayannopoulos, I.A., and Lippard, S.J. (2012). Platinum(IV)-chlorotoxin (CTX) conjugates for targeting cancer cells. *J Inorg Biochem* 110, 58-63.
- Granier, C., Bahraoui, E., Van Rietschoten, J., Rochat, H., and El Ayeb, M. (1984). Synthesis and immunological characterization of two peptides which are models for two of the four major antigenic sites of a scorpion toxin. *Int J Pept Protein Res* 23, 187-197.
- Granier, C., Novotny, J., Fontecilla-Camps, J.C., Fourquet, P., El Ayeb, M., and Bahraoui, E. (1989). The antigenic structure of a scorpion toxin. *Mol Immunol* 26, 503-513.
- Gu, Y., Liu, S.L., Ju, W.Z., Li, C.Y., and Cao, P. (2013). Analgesic-antitumor peptide induces apoptosis and inhibits the proliferation of SW480 human colon cancer cells. *Oncol Lett* 5, 483-488.
- Gur, M., Kahn, R., Karbat, I., Regev, N., Wang, J., Catterall, W.A., Gordon, D., and Gurevitz, M. (2011). Elucidation of the molecular basis of selective recognition uncovers the interaction site for the core domain of scorpion alpha-toxins on sodium channels. *J Biol Chem* 286, 35209-35217.
- Gurrola, G.B., Capes, E.M., Zamudio, F.Z., Possani, L.D., and Valdivia, H.H. (2010). Imperatoxin A, a Cell-Penetrating Peptide from Scorpion Venom, as a Probe of Ca-Release Channels/Ryanodine Receptors. *Pharmaceuticals (Basel)* 3, 1093-1107.
- Guy, H.R., and Seetharamulu, P. (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 508-512.
- Habersetzer-Rochat, C., and Sampieri, F. (1976). Structure-function relationships of scorpion neurotoxins. *Biochemistry* 15, 2254-2261.
- Hains, B.C., Saab, C.Y., Klein, J.P., Craner, M.J., and Waxman, S.G. (2004). Altered sodium channel expression in second-order spinal sensory neurons contributes to pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 24, 4832-4839.
- Hakim, M.A., Jiang, W., Luo, L., Li, B., Yang, S., Song, Y., and Lai, R. (2015). Scorpion Toxin, Bmp01, Induces Pain by Targeting TRPV1 Channel. *Toxins (Basel)* 7, 3671-3687.
- Hammoudi-Triki, D., Lefort, J., Rougeot, C., Robbe-Vincent, A., Bon, C., Laraba-Djebari, F., and Choumet, V. (2007). Toxicokinetic and toxicodynamic analyses of *Androctonus australis* hector venom in rats: optimization of antivenom therapy. *Toxicol Appl Pharmacol* 218, 205-214.

- Hamon, A., Gilles, N., Sautiere, P., Martinage, A., Kopeyan, C., Ulens, C., Tytgat, J., Lancelin, J.M., and Gordon, D. (2002). Characterization of scorpion alpha-like toxin group using two new toxins from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. *Eur J Biochem* 269, 3920-3933.
- Han, C., Vasylyev, D., Macala, L.J., Gerrits, M.M., Hoeijmakers, J.G., Bekelaar, K.J., Dib-Hajj, S.D., Faber, C.G., Merkies, I.S., and Waxman, S.G. (2014). The G1662S NaV1.8 mutation in small fibre neuropathy: impaired inactivation underlying DRG neuron hyperexcitability. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85, 499-505.
- Hantson, P. (2019). Mechanisms of toxic cardiomyopathy. *Clin Toxicol (Phila)* 57, 1-9.
- Heinen, T.E., and Da Veiga, A.B. (2011). Arthropod venoms and cancer. *Toxicon* 57, 497-511.
- Heron, S.E., Crossland, K.M., Andermann, E., Phillips, H.A., Hall, A.J., Bleasel, A., Shevell, M., Mercho, S., Seni, M.H., Guiot, M.C., Mulley, J.C., Berkovic, S.F., and Scheffer, I.E. (2002). Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures. *Lancet* 360, 851-852.
- Hmaidi, R., Ksouri, A., Benabderrazek, R., Antonietti, V., Sonnet, P., Gautier, M., Bouhaouala-Zahar, B., and Ouadid-Ahidouch, H. (2022). The Pharmacological and Structural Basis of the AahII–NaV1.5 Interaction and Modulation by the Anti-AahII Nb10 Nanobody. 13.
- Hmed, B., Serria, H.T., and Mounir, Z.K. (2013). Scorpion peptides: potential use for new drug development. *J Toxicol* 2013, 958797.
- Hmila, I., Abdallah, R.B., Saerens, D., Benlasfar, Z., Conrath, K., Ayeb, M.E., Muyltermans, S., and Bouhaouala-Zahar, B. (2008). VHH, bivalent domains and chimeric Heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin AahI'. *Mol Immunol* 45, 3847-3856.
- Hmila, I., Cosyns, B., Tounsi, H., Roosens, B., Caveliers, V., Abderrazek, R.B., Boubaker, S., Muyltermans, S., El Ayeb, M., Bouhaouala-Zahar, B., and Lahoutte, T. (2012). Pre-clinical studies of toxin-specific nanobodies: evidence of in vivo efficacy to prevent fatal disturbances provoked by scorpion envenoming. *Toxicol Appl Pharmacol* 264, 222-231.
- Hmila, I., Saerens, D., Ben Abderrazek, R., Vincke, C., Abidi, N., Benlasfar, Z., Govaert, J., El Ayeb, M., Bouhaouala-Zahar, B., and Muyltermans, S. (2010). A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. *FASEB J* 24, 3479-3489.
- Hockaday, D.C., Shen, S., Fiveash, J., Raubitschek, A., Colcher, D., Liu, A., Alvarez, V., and Mamelak, A.N. (2005). Imaging glioma extent with 131I-TM-601. *J Nucl Med* 46, 580-586.
- Huang, J., Han, C., Estacion, M., Vasylyev, D., Hoeijmakers, J.G., Gerrits, M.M., Tyrrell, L., Lauria, G., Faber, C.G., Dib-Hajj, S.D., Merkies, I.S., Waxman, S.G., and Group, P.S. (2014). Gain-of-function mutations in sodium channel Na(v)1.9 in painful neuropathy. *Brain* 137, 1627-1642.
- Huang, X., and Jan, L.Y. (2014). Targeting potassium channels in cancer. *J Cell Biol* 206, 151-162.
- Huys, I., Waelkens, E., and Tytgat, J. (2004). Structure-function study of a chlorotoxin-chimer and its activity on Kv1.3 channels. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 803, 67-73.
- Inceoglu, B., Lango, J., Wu, J., Hawkins, P., Southern, J., and Hammock, B.D. (2001). Isolation and characterization of a novel type of neurotoxic peptide from the venom of the South African scorpion *Parabuthus transvaalicus* (Buthidae). *Eur J Biochem* 268, 5407-5413.
- Ismail, M. (1995). The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon* 33, 825-858.
- Ismail, M., and Abd-Elsalam, M.A. (1988). Are the toxicological effects of scorpion envenomation related to tissue venom concentration? *Toxicon* 26, 233-256.
- Isom, L.L., De Jongh, K.S., Patton, D.E., Reber, B.F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A.L., and Catterall, W.A. (1992). Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 256, 839-842.
- Isom, L.L., Ragsdale, D.S., De Jongh, K.S., Westenbroek, R.E., Reber, B.F., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1995). Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* 83, 433-442.
- Israel, M.R., Tay, B., Deuis, J.R., and Vetter, I. (2017). Sodium Channels and Venom Peptide Pharmacology. *Adv Pharmacol* 79, 67-116.
- Jackson, A.P., Timmerman, M.P., Bagshaw, C.R., and Ashley, C.C. (1987). The kinetics of calcium binding to fura-2 and indo-1. *FEBS Lett* 216, 35-39.
- Jahchan, N.S., Dudley, J.T., Mazur, P.K., Flores, N., Yang, D., Palmerton, A., Zmoos, A.F., Vaka, D., Tran, K.Q., Zhou, M., Krasinska, K., Riess, J.W., Neal, J.W., Khatri, P., Park, K.S., Butte, A.J., and Sage, J. (2013). A drug repositioning approach identifies tricyclic antidepressants as

- inhibitors of small cell lung cancer and other neuroendocrine tumors. *Cancer Discov* 3, 1364-1377.
- Jang, S.H., Choi, S.Y., Ryu, P.D., and Lee, S.Y. (2011). Anti-proliferative effect of Kv1.3 blockers in A549 human lung adenocarcinoma in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol* 651, 26-32.
- Jardin, I., Lopez, J.J., Salido, G.M., and Rosado, J.A. (2018). Store-Operated Ca(2+) Entry in Breast Cancer Cells: Remodeling and Functional Role. *Int J Mol Sci* 19.
- Jiang, D., Tonggu, L., Gamal El-Din, T.M., Banh, R., Pomes, R., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2021). Structural basis for voltage-sensor trapping of the cardiac sodium channel by a deathstalker scorpion toxin. *Nat Commun* 12, 128.
- Jordan, J., Galindo, M.F., Gonzalez-Garcia, C., and Cena, V. (2003). Role and regulation of p53 in depolarization-induced neuronal death. *Neuroscience* 122, 707-715.
- Jurkat-Rott, K., Holzherr, B., Fauler, M., and Lehmann-Horn, F. (2010). Sodium channelopathies of skeletal muscle result from gain or loss of function. *Pflugers Arch* 460, 239-248.
- Juste, M., Martin-Eauclaire, M.F., Devaux, C., Billiald, P., and Aubrey, N. (2007). Using a recombinant bispecific antibody to block Na⁺ -channel toxins protects against experimental scorpion envenoming. *Cell Mol Life Sci* 64, 206-218.
- Kampo, S., Ahmmed, B., Zhou, T., Owusu, L., Anabah, T.W., Doudou, N.R., Kuugbee, E.D., Cui, Y., Lu, Z., Yan, Q., and Wen, Q.P. (2019). Scorpion Venom Analgesic Peptide, BmK AGAP Inhibits Stemness, and Epithelial-Mesenchymal Transition by Down-Regulating PTX3 in Breast Cancer. *Front Oncol* 9, 21.
- Kharrat, R., Darbon, H., Rochat, H., and Granier, C. (1989). Structure/activity relationships of scorpion alpha-toxins. Multiple residues contribute to the interaction with receptors. *Eur J Biochem* 181, 381-390.
- Kischel, P., Girault, A., Rodat-Despoix, L., Chamli, M., Radoslavova, S., Abou Daya, H., Lefebvre, T., Foulon, A., Rybarczyk, P., Hague, F., Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., and Oquadid-Ahidouch, H. (2019). Ion Channels: New Actors Playing in Chemotherapeutic Resistance. *Cancers (Basel)* 11.
- Kitten, O., and Martineau, P. (2019). [Antibody alternative formats: antibody fragments and new frameworks]. *Med Sci (Paris)* 35, 1092-1097.
- Kohrman, D.C., Plummer, N.W., Schuster, T., Jones, J.M., Jang, W., Burgess, D.L., Galt, J., Spear, B.T., and Meisler, M.H. (1995). Insertional mutation of the motor endplate disease (med) locus on mouse chromosome 15. *Genomics* 26, 171-177.
- Koike, T., Tanaka, S., Oda, T., and Ninomiya, T. (2000). Sodium overload through voltage-dependent Na(+) channels induces necrosis and apoptosis of rat superior cervical ganglion cells in vitro. *Brain Res Bull* 51, 345-355.
- Kondratskyi, A., Kondratska, K., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2015). Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1848, 2532-2546.
- Kontis, K.J., Rounaghi, A., and Goldin, A.L. (1997). Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. *J Gen Physiol* 110, 391-401.
- Koppenhofer, E., and Schmidt, H. (1968). Incomplete sodium inactivation in nodes of Ranvier treated with scorpion venom. *Experientia* 24, 41-42.
- Kostyuk, P.G., Veselovsky, N.S., and Tsyndrenko, A.Y. (1981). Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-I. Sodium currents. *Neuroscience* 6, 2423-2430.
- Kovacs-Nolan, J., and Mine, Y. (2012). Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annu Rev Food Sci Technol* 3, 163-182.
- Ksouri, A., Ghedira, K., Ben Abderrazek, R., Shankar, B.a.G., Benkahla, A., Bishop, O.T., and Bouhaouala-Zahar, B. (2018). Homology modeling and docking of AahII-Nanobody complexes reveal the epitope binding site on AahII scorpion toxin. *Biochem Biophys Res Commun* 496, 1025-1032.
- Kuzmenkov, A.I., Nekrasova, O.V., Kudryashova, K.S., Peigneur, S., Tytgat, J., Stepanov, A.V., Kirpichnikov, M.P., Grishin, E.V., Feofanov, A.V., and Vassilevski, A.A. (2016). Fluorescent protein-scorpion toxin chimera is a convenient molecular tool for studies of potassium channels. *Sci Rep* 6, 33314.

- Lam, J., and Wulff, H. (2011). The Lymphocyte Potassium Channels Kv1.3 and KCa3.1 as Targets for Immunosuppression. *Drug Dev Res* 72, 573-584.
- Lan, Z.D., Dai, L., Zhuo, X.L., Feng, J.C., Xu, K., and Chi, C.W. (1999). Gene cloning and sequencing of BmK AS and BmK AS-1, two novel neurotoxins from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Toxicon* 37, 815-823.
- Lancelin, J.M., Kohda, D., Tate, S., Yanagawa, Y., Abe, T., Satake, M., and Inagaki, F. (1991). Tertiary structure of conotoxin GIIIA in aqueous solution. *Biochemistry* 30, 6908-6916.
- Landon, C., Sodano, P., Hetru, C., Hoffmann, J., and Ptak, M. (1997). Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. *Protein Sci* 6, 1878-1884.
- Lansu, K., and Gentile, S. (2013). Potassium channel activation inhibits proliferation of breast cancer cells by activating a senescence program. *Cell Death Dis* 4, e652.
- Leanza, L., Henry, B., Sassi, N., Zoratti, M., Chandy, K.G., Gulbins, E., and Szabo, I. (2012). Inhibitors of mitochondrial Kv1.3 channels induce Bax/Bak-independent death of cancer cells. *EMBO Mol Med* 4, 577-593.
- Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., Mccafferty, J., and Laustsen, A.H. (2018). Basics of Antibody Phage Display Technology. *Toxins (Basel)* 10.
- Lee, C.W., Lee, E.H., Takeuchi, K., Takahashi, H., Shimada, I., Sato, K., Shin, S.Y., Kim, D.H., and Kim, J.I. (2004). Molecular basis of the high-affinity activation of type 1 ryanodine receptors by imperatoxin A. *Biochem J* 377, 385-394.
- Legros, C., Kaabi, H., El Ayeb, M., Ceard, B., Vacher, H., Bougis, P.E., and Martin-Eauclaire, M.F. (2001). Use of fusion protein constructs to generate potent immunotherapy and protection against scorpion toxins. *Vaccine* 20, 934-942.
- Leo, S., D'hooge, R., and Meert, T. (2010). Exploring the role of nociceptor-specific sodium channels in pain transmission using Nav1.8 and Nav1.9 knockout mice. *Behav Brain Res* 208, 149-157.
- Li, C., and Kuemmerle, J.F. (2016). Genetic and epigenetic regulation of intestinal fibrosis. *United European Gastroenterol J* 4, 496-505.
- Lila, B.A., and Laraba-Djebari, F. (2011). Enhanced immune sera and vaccine: safe approach to treat scorpion envenoming. *Vaccine* 29, 8951-8959.
- Lindia, J.A., Kohler, M.G., Martin, W.J., and Abbadie, C. (2005). Relationship between sodium channel Nav1.3 expression and neuropathic pain behavior in rats. *Pain* 117, 145-153.
- Linford, N.J., Cantrell, A.R., Qu, Y., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1998). Interaction of batrachotoxin with the local anesthetic receptor site in transmembrane segment IVS6 of the voltage-gated sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13947-13952.
- Liu, M., Yang, K.C., and Dudley, S.C., Jr. (2016). Cardiac Sodium Channel Mutations: Why so Many Phenotypes? *Curr Top Membr* 78, 513-559.
- Liu, Y., Zhang, Z., Mao, Y., Cui, Y., Hu, N., Wang, Y., and Zhang, J. (2009). Production and antitumor efficacy of recombinant *Buthus martensii* Karsch AGAP. 4, 228-233.
- Liu, Y.F., Hu, J., Zhang, J.H., Wang, S.L., and Wu, C.F. (2002). Isolation, purification, and N-terminal partial sequence of an antitumor peptide from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Prep Biochem Biotechnol* 32, 317-327.
- Logan, M.M., Toma, T., Thomas-Tran, R., and Du Bois, J. (2016). Asymmetric synthesis of batrachotoxin: Enantiomeric toxins show functional divergence against NaV. *Science* 354, 865-869.
- Lopez, J.J., Siegfried, G., Cantonero, C., Soulet, F., Descarpentrie, J., Smani, T., Badiola, I., Pernot, S., Evrard, S., Rosado, J.A., and Khatib, A.M. (2021). Furin Prodomain ppFurin Enhances Ca(2+) Entry Through Orai and TRPC6 Channels' Activation in Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 13.
- Lui, V.C.H., Lung, S.S.S., Pu, J.K.S., Hung, K.N., and Leung, G.K.K.J.a.R. (2010). Invasion of human glioma cells is regulated by multiple chloride channels including ClC-3. *30*, 4515-4524.
- Luo, Q., Wu, T., Wu, W., Chen, G., Luo, X., Jiang, L., Tao, H., Rong, M., Kang, S., and Deng, M. (2020). The Functional Role of Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5 in Metastatic Breast Cancer. *Front Pharmacol* 11, 1111.
- Mabrouk, K., Ram, N., Boisseau, S., Strappazon, F., Rehaïm, A., Sadoul, R., Darbon, H., Ronjat, M., and De Waard, M. (2007). Critical amino acid residues of maurocalcine involved in pharmacology, lipid interaction and cell penetration. *Biochim Biophys Acta* 1768, 2528-2540.

- Maduwage, K., Buckley, N.A., De Silva, H.J., Lalloo, D.G., and Isbister, G.K. (2015). Snake antivenom for snake venom induced consumption coagulopathy. *Cochrane Database Syst Rev*, CD011428.
- Mamelak, A.N., Rosenfeld, S., Bucholz, R., Raubitschek, A., Nabors, L.B., Fiveash, J.B., Shen, S., Khzaaeli, M.B., Colcher, D., Liu, A., Osman, M., Guthrie, B., Schade-Bijur, S., Hablitz, D.M., Alvarez, V.L., and Gonda, M.A. (2006). Phase I single-dose study of intracavitary-administered iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma. *J Clin Oncol* 24, 3644-3650.
- Mantegazza, M., Gambardella, A., Rusconi, R., Schiavon, E., Annesi, F., Cassulini, R.R., Labate, A., Carrideo, S., Chifari, R., Canevini, M.P., Canger, R., Franceschetti, S., Annesi, G., Wanke, E., and Quattrone, A. (2005). Identification of an Nav1.1 sodium channel (SCN1A) loss-of-function mutation associated with familial simple febrile seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18177-18182.
- Marino, A.A., Morris, D.M., Schwalke, M.A., Iliev, I.G., and Rogers, S. (1994). Electrical potential measurements in human breast cancer and benign lesions. *Tumour Biol* 15, 147-152.
- Martin-Eauclaire, M.F., Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F., and Bougis, P.E. (2019). Serotherapy against Voltage-Gated Sodium Channel-Targeting alphaToxins from *Androctonus Scorpion Venom*. *Toxins (Basel)* 11.
- Martin-Eauclaire, M.F., Alami, M., Giamarchi, A., Missimilli, V., Rosso, J.P., and Bougis, P.E. (2006). A natural anatoxin, Amm VIII, induces neutralizing antibodies against the potent scorpion alpha-toxins. *Vaccine* 24, 1990-1996.
- Martin-Eauclaire, M.F., Ceard, B., Bosmans, F., Rosso, J.P., Tytgat, J., and Bougis, P.E. (2005). New "Birtoxin analogs" from *Androctonus australis* venom. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 524-530.
- Meddeb-Mouelhi, F., Bouhaouala-Zahar, B., Benlasfar, Z., Hammadi, M., Mejri, T., Moslah, M., Karoui, H., Khorchani, T., and El Ayeb, M. (2003). Immunized camel sera and derived immunoglobulin subclasses neutralizing *Androctonus australis* hector scorpion toxins. *Toxicon* 42, 785-791.
- Michael, G., Dempster, J., Kane, K.A., and Coker, S.J. (2007). Potentiation of E-4031-induced torsade de pointes by HMR1556 or ATX-II is not predicted by action potential short-term variability or triangulation. *Br J Pharmacol* 152, 1215-1227.
- Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R., and Phillips, M. (1985). Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313, 316-318.
- Miranda, F., Kupeyan, C., Rochat, H., Rochat, C., and Lissitzky, S. (1970). Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions *Androctonus australis hector*, *Buthus occitanus tunetanus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *Eur J Biochem* 16, 514-523.
- Misra, S.N., Kahlig, K.M., and George, A.L., Jr. (2008). Impaired Nav1.2 function and reduced cell surface expression in benign familial neonatal-infantile seizures. *Epilepsia* 49, 1535-1545.
- Molina, F., Laune, D., Gougat, C., Pau, B., and Granier, C. (1996). Improved performances of spot multiple peptide synthesis. *Pept Res* 9, 151-155.
- Morgan, K., Stevens, E.B., Shah, B., Cox, P.J., Dixon, A.K., Lee, K., Pinnock, R.D., Hughes, J., Richardson, P.J., Mizuguchi, K., and Jackson, A.P. (2000). beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2308-2313.
- Mosbah, A., Kharrat, R., Fajloun, Z., Renisio, J.G., Blanc, E., Sabatier, J.M., El Ayeb, M., and Darbon, H. (2000). A new fold in the scorpion toxin family, associated with an activity on a ryanodine-sensitive calcium channel. *Proteins* 40, 436-442.
- Motiani, R.K., Abdullaev, I.F., and Trebak, M. (2010). A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J Biol Chem* 285, 19173-19183.
- Mousli, M., Devaux, C., Rochat, H., Goyffon, M., and Billiald, P. (1999). A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. *FEBS Lett* 442, 183-188.
- Murthy, K.R.J.W.J.O.C.D. (2014). Cardiac Sarcolemmal Defects in Acute Myocarditis Due to Scorpion Envenoming Syndrome. 04, 432-454.

- Mycielska, M.E., Fraser, S.P., Szatkowski, M., and Djamgoz, M.B. (2003). Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: II. Secretory membrane activity. *J Cell Physiol* 195, 461-469.
- Nadjia, B., and Fatima, L.D. (2015). Beneficial effects of *Androctonus australis hector* venom and its non-toxic fraction in the restoration of early hepatocyte-carcinogenesis induced by FB1 mycotoxin: Involvement of oxidative biomarkers. *Exp Mol Pathol* 99, 198-206.
- Nakajima, T., Kubota, N., Tsutsumi, T., Oguri, A., Imuta, H., Jo, T., Oonuma, H., Soma, M., Meguro, K., Takano, H., Nagase, T., and Nagata, T. (2009). Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells. *Br J Pharmacol* 156, 420-431.
- Narahashi, T. (1972). Mechanism of action of tetrodotoxin and saxitoxin on excitable membranes. *Fed Proc* 31, 1124-1132.
- Narahashi, T. (1977). Toxic chemicals as probes of nerve membrane function. *Adv Exp Med Biol* 84, 407-445.
- Narat, M.J.F.T., and Biotechnology (2003). Production of Antibodies in Chickens. 41, 259-267.
- Newcombe, C., and Newcombe, A.R. (2007). Antibody production: polyclonal-derived biotherapeutics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 848, 2-7.
- Nilges, M., Habazettl, J., Brunger, A.T., and Holak, T.A. (1991). Relaxation matrix refinement of the solution structure of squash trypsin inhibitor. *J Mol Biol* 219, 499-510.
- Noda, M., Kettenmann, H., and Wada, K. (2006). Anti-inflammatory effects of kinins via microglia in the central nervous system. *Biol Chem* 387, 167-171.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., and Et Al. (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312, 121-127.
- Norton, R.S., and Pallaghy, P.K. (1998). The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon* 36, 1573-1583.
- Nouri, A., and Laraba-Djebari, F. (2015). Enhancement of long-lasting immunoprotective effect against *Androctonus australis hector* envenomation using safe antigens: Comparative role of MF59 and Alum adjuvants. *Vaccine* 33, 5756-5763.
- Novotny, J., and Haber, E. (1986). Static accessibility model of protein antigenicity: the case of scorpion neurotoxin. *Biochemistry* 25, 6748-6754.
- O'brien, B.J., Caldwell, J.H., Ehring, G.R., Bumsted O'brien, K.M., Luo, S., and Levinson, S.R. (2008). Tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channels Na(v)1.8 and Na(v)1.9 are expressed in the retina. *J Comp Neurol* 508, 940-951.
- Olamendi-Portugal, T., Csoti, A., Jimenez-Vargas, J.M., Gomez-Lagunas, F., Panyi, G., and Possani, L.D. (2017). Pi5 and Pi6, two undescribed peptides from the venom of the scorpion *Pandinus imperator* and their effects on K(+) channels. *Toxicon* 133, 136-144.
- Onganer, P.U., and Djamgoz, M.B. (2005). Small-cell lung cancer (human): potentiation of endocytic membrane activity by voltage-gated Na(+) channel expression in vitro. *J Membr Biol* 204, 67-75.
- Ortiz, E., Gurrola, G.B., Schwartz, E.F., and Possani, L.D. (2015). Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon* 93, 125-135.
- Othman, H., Wieninger, S.A., Elayeb, M., Nilges, M., and Srairi-Abid, N. (2017). In Silico prediction of the molecular basis of CITx and AaCTx interaction with matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) to inhibit glioma cell invasion. *J Biomol Struct Dyn* 35, 2815-2829.
- Papadatos, G.A., Wallerstein, P.M., Head, C.E., Ratcliff, R., Brady, P.A., Benndorf, K., Saumarez, R.C., Trezise, A.E., Huang, C.L., Vandenberg, J.I., Colledge, W.H., and Grace, A.A. (2002). Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6210-6215.
- Park, H.J., Lyons, J.C., Ohtsubo, T., and Song, C.W. (1999). Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *Br J Cancer* 80, 1892-1897.
- Payandeh, J., Gamal El-Din, T.M., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2012). Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* 486, 135-139.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475, 353-358.

- Pedraza Escalona, M., and Possani, L.D. (2013). Scorpion beta-toxins and voltage-gated sodium channels: interactions and effects. *Front Biosci (Landmark Ed)* 18, 572-587.
- Pierce, B.G., Wiehe, K., Hwang, H., Kim, B.H., Vreven, T., and Weng, Z. (2014). ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics* 30, 1771-1773.
- Pintar, A., Possani, L.D., and Delepierre, M. (1999). Solution structure of toxin 2 from centruroides noxius Hoffmann, a beta-scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *J Mol Biol* 287, 359-367.
- Planells-Cases, R., Caprini, M., Zhang, J., Rockenstein, E.M., Rivera, R.R., Murre, C., Masliah, E., and Montal, M. (2000). Neuronal death and perinatal lethality in voltage-gated sodium channel alpha(II)-deficient mice. *Biophys J* 78, 2878-2891.
- Prevarskaya, N., Ouadid-Ahidouch, H., Skryma, R., and Shuba, Y. (2014). Remodelling of Ca²⁺ transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20130097.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., and Shuba, Y. (2018). Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies? *Physiol Rev* 98, 559-621.
- Pringos, E., Vignes, M., Martinez, J., and Rolland, V. (2011). Peptide neurotoxins that affect voltage-gated calcium channels: a close-up on omega-agatoxins. *Toxins (Basel)* 3, 17-42.
- Qin, C., He, B., Dai, W., Lin, Z., Zhang, H., Wang, X., Wang, J., Zhang, X., Wang, G., Yin, L., and Zhang, Q. (2014). The impact of a chlorotoxin-modified liposome system on receptor MMP-2 and the receptor-associated protein CIC-3. *Biomaterials* 35, 5908-5920.
- Quintero-Hernandez, V., Jimenez-Vargas, J.M., Gurrola, G.B., Valdivia, H.H., and Possani, L.D. (2013). Scorpion venom components that affect ion-channels function. *Toxicon* 76, 328-342.
- Ragsdale, D.S., McPhee, J.C., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1994). Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science* 265, 1724-1728.
- Ram, N., Weiss, N., Texier-Nogues, I., Aroui, S., Andreotti, N., Pirollet, F., Ronjat, M., Sabatier, J.M., Darbon, H., Jacquemond, V., and De Waard, M. (2008). Design of a disulfide-less, pharmacologically inert, and chemically competent analog of Maurocalcine for the efficient transport of impermeant compounds into cells. *J Biol Chem* 283, 27048-27056.
- Raman, I.M., Sprunger, L.K., Meisler, M.H., and Bean, B.P. (1997). Altered subthreshold sodium currents and disrupted firing patterns in Purkinje neurons of Scn8a mutant mice. *Neuron* 19, 881-891.
- Rao, V.R., Perez-Neut, M., Kaja, S., and Gentile, S. (2015). Voltage-gated ion channels in cancer cell proliferation. *Cancers (Basel)* 7, 849-875.
- Remacle, A.G., Kumar, S., Motamedchaboki, K., Cieplak, P., Hullugundi, S., Dolkas, J., Shubayev, V.I., and Strongin, A.Y. (2015). Matrix Metalloproteinase (MMP) Proteolysis of the Extracellular Loop of Voltage-gated Sodium Channels and Potential Alterations in Pain Signaling. *J Biol Chem* 290, 22939-22944.
- Ren, D., Navarro, B., Xu, H., Yue, L., Shi, Q., and Clapham, D.E. (2001). A prokaryotic voltage-gated sodium channel. *Science* 294, 2372-2375.
- Restano-Cassulini, R., Garcia, W., Paniagua-Solis, J.F., and Possani, L.D. (2017). Antivenom Evaluation by Electrophysiological Analysis. *Toxins (Basel)* 9.
- Restrepo-Angulo, I., De Vizcaya-Ruiz, A., and Camacho, J. (2010). Ion channels in toxicology. *J Appl Toxicol* 30, 497-512.
- Rjeibi, I., Mabrouk, K., Mosrati, H., Berenguer, C., Mejdoub, H., Villard, C., Laffitte, D., Bertin, D., Ouafik, L., Luis, J., Elayeb, M., and Srairi-Abid, N. (2011). Purification, synthesis and characterization of AaCtx, the first chlorotoxin-like peptide from *Androctonus australis* scorpion venom. *Peptides* 32, 656-663.
- Rodriguez De La Vega, R.C., and 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.
- Rodriguez De La Vega, R.C., Schwartz, E.F., and Possani, L.D. (2010). Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon* 56, 1155-1161.
- Roger, S., Besson, P., and Le Guennec, J.Y. (2003). Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* 1616, 107-111.

- Rogers, J.C., Qu, Y., Tanada, T.N., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1996). Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na⁺ channel alpha subunit. *J Biol Chem* 271, 15950-15962.
- Romero-Gutierrez, T., Peguero-Sanchez, E., Cevallos, M.A., Batista, C.V.F., Ortiz, E., and Possani, L.D. (2017). A Deeper Examination of Thorellius atrox Scorpion Venom Components with Omic Technologies. *Toxins (Basel)* 9.
- Roy, M.L., and Narahashi, T. (1992). Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 12, 2104-2111.
- Sadeghian, H. (2003). Transient ophthalmoplegia following envenomation by the scorpion *Mesobuthus eupeus*. 60, 346-347.
- Saidani, C., Hammoudi-Triki, D., Laraba-Djebari, F., and Taub, M. (2016). In vitro studies with renal proximal tubule cells show direct cytotoxicity of Androctonus australis hector scorpion venom triggered by oxidative stress, caspase activation and apoptosis. *Toxicon* 120, 29-37.
- Sangameswaran, L., Fish, L.M., Koch, B.D., Rabert, D.K., Delgado, S.G., Ilnicka, M., Jakeman, L.B., Novakovic, S., Wong, K., Sze, P., Tzoumaka, E., Stewart, G.R., Herman, R.C., Chan, H., Eglén, R.M., and Hunter, J.C. (1997). A novel tetrodotoxin-sensitive, voltage-gated sodium channel expressed in rat and human dorsal root ganglia. *J Biol Chem* 272, 14805-14809.
- Sarfo-Poku, C., Eshun, O., and Lee, K.H. (2016). Medical application of scorpion venom to breast cancer: A mini-review. *Toxicon* 122, 109-112.
- Satin, J., Kyle, J.W., Chen, M., Bell, P., Cribbs, L.L., Fozzard, H.A., and Rogart, R.B. (1992). A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science* 256, 1202-1205.
- Schaller, K.L., Krzemien, D.M., Yarowsky, P.J., Krueger, B.K., and Caldwell, J.H. (1995). A novel, abundant sodium channel expressed in neurons and glia. *J Neurosci* 15, 3231-3242.
- Schiavon, E., Sacco, T., Cassulini, R.R., Gurrola, G., Tempia, F., Possani, L.D., and Wanke, E. (2006). Resurgent current and voltage sensor trapping enhanced activation by a beta-scorpion toxin solely in Nav1.6 channel. Significance in mice Purkinje neurons. *J Biol Chem* 281, 20326-20337.
- Schilling, T., Stock, C., Schwab, A., and Eder, C. (2004). Functional importance of Ca²⁺-activated K⁺ channels for lysophosphatidic acid-induced microglial migration. *Eur J Neurosci* 19, 1469-1474.
- Scholl, U.I., Goh, G., Stolting, G., De Oliveira, R.C., Choi, M., Overton, J.D., Fonseca, A.L., Korah, R., Starker, L.F., Kunstman, J.W., Prasad, M.L., Hartung, E.A., Mauras, N., Benson, M.R., Brady, T., Shapiro, J.R., Loring, E., Nelson-Williams, C., Libutti, S.K., Mane, S., Hellman, P., Westin, G., Akerstrom, G., Bjorklund, P., Carling, T., Fahlke, C., Hidalgo, P., and Lifton, R.P. (2013). Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nat Genet* 45, 1050-1054.
- Schwab, A., Reinhardt, J., Schneider, S.W., Gassner, B., Schuricht, B.J.C.P., and Biochemistry (1999). K⁺ Channel-Dependent Migration of Fibroblasts and Human Melanoma Cells. 9, 126 - 132.
- Schwartz, E.F., Capes, E.M., Diego-Garcia, E., Zamudio, F.Z., Fuentes, O., Possani, L.D., and Valdivia, H.H. (2009). Characterization of hadrucalcin, a peptide from Hadrurus gertschi scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors. *Br J Pharmacol* 157, 392-403.
- Shahbazzadeh, D., Srairi-Abid, N., Feng, W., Ram, N., Borchani, L., Ronjat, M., Akbari, A., Pessah, I.N., De Waard, M., and El Ayeb, M. (2007). Hemicalcin, a new toxin from the Iranian scorpion Hemiscorpius lepturus which is active on ryanodine-sensitive Ca²⁺ channels. *Biochem J* 404, 89-96.
- Shalabi, A., Zamudio, F., Wu, X., Scaloni, A., Possani, L.D., and Villereal, M.L. (2004). Tetrapandins, a new class of scorpion toxins that specifically inhibit store-operated calcium entry in human embryonic kidney-293 cells. *J Biol Chem* 279, 1040-1049.
- Shao, J.H., Cui, Y., Zhao, M.Y., Wu, C.F., Liu, Y.F., and Zhang, J.H. (2014). Purification, characterization, and bioactivity of a new analgesic-antitumor peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Peptides* 53, 89-96.
- Shapiro, L., Doyle, J.P., Hensley, P., Colman, D.R., and Hendrickson, W.A. (1996). Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron* 17, 435-449.

- Shaya, D., Findeisen, F., Abderemane-Ali, F., Arrigoni, C., Wong, S., Nurva, S.R., Loussouarn, G., and Minor, D.L., Jr. (2014). Structure of a prokaryotic sodium channel pore reveals essential gating elements and an outer ion binding site common to eukaryotic channels. *J Mol Biol* 426, 467-483.
- Shen, M.Y., and Sali, A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci* 15, 2507-2524.
- Shim, H. (2017). Antibody Phage Display. *Adv Exp Med Biol* 1053, 21-34.
- Sidach, S.S., and Mintz, I.M. (2002). Kurtoxin, a gating modifier of neuronal high- and low-threshold Ca channels. *J Neurosci* 22, 2023-2034.
- Sifi, A., Adi-Bessalem, S., and Laraba-Djebari, F. (2018). Development of a new approach of immunotherapy against scorpion envenoming: Avian IgYs an alternative to equine IgGs. *Int Immunopharmacol* 61, 256-265.
- Silva, J. (2014). Slow inactivation of Na⁺ channels. *Handb Exp Pharmacol* 221, 33-49.
- Simkin, D., and Bendahhou, S. (2011). Skeletal muscle Na channel disorders. *Front Pharmacol* 2, 63.
- Singh, M., and O'hagan, D. (1999). Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotechnol* 17, 1075-1081.
- Sivilotti, L., Okuse, K., Akopian, A.N., Moss, S., and Wood, J.N. (1997). A single serine residue confers tetrodotoxin insensitivity on the rat sensory-neuron-specific sodium channel SNS. *FEBS Lett* 409, 49-52.
- Soli, R., Kaabi, B., Barhoumi, M., El-Ayeb, M., and Srairi-Abid, N. (2009). Bioinformatic characterizations and prediction of K⁺ and Na⁺ ion channels effector toxins. *BMC Pharmacol* 9, 4.
- Sontheimer, H. (2008). An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis. *Exp Biol Med (Maywood)* 233, 779-791.
- Soroceanu, L., Manning, T.J., and Sontheimer, H. (1999). Modulation of Glioma Cell Migration and Invasion Using Cl⁻ and K⁺ Ion Channel Blockers. 19, 5942-5954.
- Srairi-Abid, N., Guijarro, J.I., Benkhalifa, R., Mantegazza, M., Cheikh, A., Ben Aissa, M., Haumont, P.Y., Delepierre, M., and El Ayeb, M. (2005). A new type of scorpion Na⁺-channel-toxin-like polypeptide active on K⁺ channels. *Biochem J* 388, 455-464.
- Srairi-Abid, N., Othman, H., Aissaoui, D., and Benaissa, R. (2019). Anti-tumoral effect of scorpion peptides: Emerging new cellular targets and signaling pathways. *Cell Calcium* 80, 160-174.
- Srinivasan, J., Schachner, M., and Catterall, W.A. (1998). Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15753-15757.
- Stevens, M., Peigneur, S., and Tytgat, J. (2011). Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Front Pharmacol* 2, 71.
- Stewart, T.A., Yapa, K.T., and Monteith, G.R. (2015). Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1848, 2502-2511.
- Strachan, L.C., Lewis, R.J., and Nicholson, G.M. (1999). Differential actions of pacific ciguatoxin-1 on sodium channel subtypes in mammalian sensory neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 288, 379-388.
- Striessnig, J., Glossmann, H., and Catterall, W.A. (1990). Identification of a phenylalkylamine binding region within the alpha 1 subunit of skeletal muscle Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9108-9112.
- Stuhmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X.D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., and Numa, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339, 597-603.
- Tan, J., Liu, Z., Wang, R., Huang, Z.Y., Chen, A.C., Gurevitz, M., and Dong, K. (2005). Identification of amino acid residues in the insect sodium channel critical for pyrethroid binding. *Mol Pharmacol* 67, 513-522.
- Tanaka, B.S., Zhao, P., Dib-Hajj, F.B., Morisset, V., Tate, S., Waxman, S.G., and Dib-Hajj, S.D. (2016). A gain-of-function mutation in Nav1.6 in a case of trigeminal neuralgia. *Mol Med* 22, 338-348.
- Tejedor, F.J., and Catterall, W.A. (1988). Site of covalent attachment of alpha-scorpion toxin derivatives in domain I of the sodium channel alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8742-8746.
- Terlau, H., Heinemann, S.H., Stuhmer, W., Pusch, M., Conti, F., Imoto, K., and Numa, S. (1991). Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* 293, 93-96.

- Thalley, B.S., and Carroll, S.B. (1990). Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens. *Biotechnology (N Y)* 8, 934-938.
- Tobassum, S., Tahir, H.M., Arshad, M., Zahid, M.T., Ali, S., and Ahsan, M.M. (2020). Nature and applications of scorpion venom: an overview. *Toxin Reviews* 39, 214-225.
- Toledo-Aral, J.J., Moss, B.L., He, Z.J., Koszowski, A.G., Whisenand, T., Levinson, S.R., Wolf, J.J., Silos-Santiago, I., Halegoua, S., and Mandel, G. (1997). Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1527-1532.
- Tomaselli, G.F., Chiamvimonvat, N., Nuss, H.B., Balser, J.R., Perez-Garcia, M.T., Xu, R.H., Orias, D.W., Backx, P.H., and Marban, E. (1995). A mutation in the pore of the sodium channel alters gating. *Biophys J* 68, 1814-1827.
- Tong-Ngam, P., Roytrakul, S., and Sritanaudomchai, H. (2015). BmKn-2 scorpion venom peptide for killing oral cancer cells by apoptosis. *Asian Pac J Cancer Prev* 16, 2807-2811.
- Trainer, V.L., Baden, D.G., and Catterall, W.A. (1994). Identification of peptide components of the brevetoxin receptor site of rat brain sodium channels. *J Biol Chem* 269, 19904-19909.
- Trudeau, M.M., Dalton, J.C., Day, J.W., Ranum, L.P., and Meisler, M.H. (2006). Heterozygosity for a protein truncation mutation of sodium channel SCN8A in a patient with cerebellar atrophy, ataxia, and mental retardation. *J Med Genet* 43, 527-530.
- Ullrich, N., Bordey, A., Gillespie, G.Y., and Sontheimer, H. (1998). Expression of voltage-activated chloride currents in acute slices of human gliomas. *Neuroscience* 83, 1161-1173.
- Ullrich, N., Gillespie, G.Y., and Sontheimer, H. (1996). Human astrocytoma cells express a unique chloride current. *J Biol Chem* 271, 1020-1024.
- Urrego, D., Tomczak, A.P., Zahed, F., Stuhmer, W., and Pardo, L.A. (2014). Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20130094.
- Utkin, Y.N. (2015). Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World J Biol Chem* 6, 28-33.
- Valdivia, H.H., Martin, B.M., Escobar, L., and Possani, L.D. (1992). Noxiustoxin and leiurutoxin III, two homologous peptide toxins with binding properties to synaptosomal membrane K⁺ channels. *Biochem Int* 27, 953-962.
- Van Wart, A., Trimmer, J.S., and Matthews, G. (2007). Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *J Comp Neurol* 500, 339-352.
- Varga, Z., Gurrola-Briones, G., Papp, F., Rodriguez De La Vega, R.C., Pedraza-Alva, G., Tajhya, R.B., Gaspar, R., Cardenas, L., Rosenstein, Y., Beeton, C., Possani, L.D., and Panyi, G. (2012). Vm24, a natural immunosuppressive peptide, potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells. *Mol Pharmacol* 82, 372-382.
- Vargas, E., Yarov-Yarovoy, V., Khalili-Araghi, F., Catterall, W.A., Klein, M.L., Tarek, M., Lindahl, E., Schulten, K., Perozo, E., Bezanilla, F., and Roux, B. (2012). An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations. *J Gen Physiol* 140, 587-594.
- Veeramah, K.R., O'Brien, J.E., Meisler, M.H., Cheng, X., Dib-Hajj, S.D., Waxman, S.G., Talwar, D., Girirajan, S., Eichler, E.E., Restifo, L.L., Erickson, R.P., and Hammer, M.F. (2012). De novo pathogenic SCN8A mutation identified by whole-genome sequencing of a family quartet affected by infantile epileptic encephalopathy and SUDEP. *Am J Hum Genet* 90, 502-510.
- Vilin, Y.Y., and Ruben, P.C. (2001). Slow inactivation in voltage-gated sodium channels: molecular substrates and contributions to channelopathies. *Cell Biochem Biophys* 35, 171-190.
- Wang, C.G., Gilles, N., Hamon, A., Le Gall, F., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Xiong, Y.M., Wang, D.C., and Chi, C.W. (2003). Exploration of the functional site of a scorpion alpha-like toxin by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 42, 4699-4708.
- Wang, C.G., He, X.L., Shao, F., Liu, W., Ling, M.H., Wang, D.C., and Chi, C.W. (2001). Molecular characterization of an anti-epilepsy peptide from the scorpion *Buthus martensi* Karsch. *Eur J Biochem* 268, 2480-2485.
- Wang, J., Yarov-Yarovoy, V., Kahn, R., Gordon, D., Gurevitz, M., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2011). Mapping the receptor site for alpha-scorpion toxins on a Na⁺ channel voltage sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 15426-15431.

- Watanabe, E., Fujikawa, A., Matsunaga, H., Yasoshima, Y., Sako, N., Yamamoto, T., Saegusa, C., and Noda, M. (2000). Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. *J Neurosci* 20, 7743-7751.
- Waxman, S.G., Kocsis, J.D., and Black, J.A. (1994). Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol* 72, 466-470.
- Weaver, A.K., Liu, X., and Sontheimer, H. (2004). Role for calcium-activated potassium channels (BK) in growth control of human malignant glioma cells. *J Neurosci Res* 78, 224-234.
- Weitzner, B.D., Jeliaskov, J.R., Lyskov, S., Marze, N., Kuroda, D., Frick, R., Adolf-Bryfogle, J., Biswas, N., Dunbrack, R.L., Jr., and Gray, J.J. (2017). Modeling and docking of antibody structures with Rosetta. *Nat Protoc* 12, 401-416.
- Wendruff, A.J., Babcock, L.E., Wirkner, C.S., Kluessendorf, J., and Mikulic, D.G. (2020). A Silurian ancestral scorpion with fossilised internal anatomy illustrating a pathway to arachnid terrestrialisation. *Sci Rep* 10, 14.
- Westenbroek, R.E., Bischoff, S., Fu, Y., Maier, S.K., Catterall, W.A., and Scheuer, T. (2013). Localization of sodium channel subtypes in mouse ventricular myocytes using quantitative immunocytochemistry. *J Mol Cell Cardiol* 64, 69-78.
- Westenbroek, R.E., Merrick, D.K., and Catterall, W.A. (1989). Differential subcellular localization of the RI and RII Na⁺ channel subtypes in central neurons. *Neuron* 3, 695-704.
- Wu, W., Dong, M.Q., Wu, X.G., Sun, H.Y., Tse, H.F., Lau, C.P., and Li, G.R. (2012). Human ether-a-go-go gene potassium channels are regulated by EGFR tyrosine kinase. *Biochim Biophys Acta* 1823, 282-289.
- Xiang, S., Dauchy, R.T., Hauch, A., Mao, L., Yuan, L., Wren, M.A., Belancio, V.P., Mondal, D., Frasc, T., Blask, D.E., and Hill, S.M. (2015). Doxorubicin resistance in breast cancer is driven by light at night-induced disruption of the circadian melatonin signal. *J Pineal Res* 59, 60-69.
- Xiao, L., Gurrola, G.B., Zhang, J., Valdivia, C.R., Sanmartin, M., Zamudio, F.Z., Zhang, L., Possani, L.D., and Valdivia, H.H. (2016). Structure-function relationships of peptides forming the calcin family of ryanodine receptor ligands. *J Gen Physiol* 147, 375-394.
- Xu, T., Fan, Z., Li, W., Dietel, B., Wu, Y., Beckmann, M.W., Wrosch, J.K., Buchfelder, M., Eyupoglu, I.Y., Cao, Z., and Savaskan, N.E. (2016). Identification of two novel Chlorotoxin derivatives CA4 and CTX-23 with chemotherapeutic and anti-angiogenic potential. *Sci Rep* 6, 19799.
- Yahi, N., Devaux, C., Mansuelle, P., Defendini, M.L., and Granier, C. (1992). Monoclonal antibodies to toxin II from the scorpion *Androctonus australis* Hector: further characterization of epitope specificities and neutralizing capacities. *Toxicon* 30, 723-731.
- Yang, Y., Wang, Y., Li, S., Xu, Z., Li, H., Ma, L., Fan, J., Bu, D., Liu, B., Fan, Z., Wu, G., Jin, J., Ding, B., Zhu, X., and Shen, Y. (2004). Mutations in SCN9A, encoding a sodium channel alpha subunit, in patients with primary erythromalgia. *J Med Genet* 41, 171-174.
- Yoast, R.E., Emrich, S.M., and Trebak, M. (2020). The anatomy of native CRAC channel(s). *Curr Opin Physiol* 17, 89-95.
- Yu, F.H., and Catterall, W.A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 4, 207.
- Yu, F.H., Westenbroek, R.E., Silos-Santiago, I., McCormick, K.A., Lawson, D., Ge, P., Ferreira, H., Lilly, J., Distefano, P.S., Catterall, W.A., Scheuer, T., and Curtis, R. (2003). Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci* 23, 7577-7585.
- Zabihollahi, R., Pooshang Bagheri, K., Keshavarz, Z., Motevalli, F., Bahramali, G., Siadat, S.D., Momen, S.B., Shahbazzadeh, D., and Aghasadeghi, M.R. (2016). Venom Components of Iranian Scorpion *Hemiscorpius lepturus* Inhibit the Growth and Replication of Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1). *Iran Biomed J* 20, 259-265.
- Zakon, H.H. (2012). Adaptive evolution of voltage-gated sodium channels: the first 800 million years. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 Suppl 1, 10619-10625.
- Zenouaki, I., Kharrat, R., Sabatier, J.M., Devaux, C., Karoui, H., Van Rietschoten, J., El Ayeb, M., and Rochat, H. (1997). In vivo protection against *Androctonus australis* hector scorpion toxin and venom by immunization with a synthetic analog of toxin II. *Vaccine* 15, 187-194.

- Zhan, R.Z., Fujiwara, N., Tanaka, E., and Shimoji, K. (1998). Intracellular acidification induced by membrane depolarization in rat hippocampal slices: roles of intracellular Ca²⁺ and glycolysis. *Brain Res* 780, 86-94.
- Zhang, D.Y., Wang, Y., Lau, C.P., Tse, H.F., and Li, G.R. (2008). Both EGFR kinase and Src-related tyrosine kinases regulate human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *Cell Signal* 20, 1815-1821.
- Zhang, J.Z., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., Karbat, I., Cohen, L., Gordon, D., Gurevitz, M., and Catterall, W.A. (2011). Structure-function map of the receptor site for beta-scorpion toxins in domain II of voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem* 286, 33641-33651.
- Zhang, X., Ren, W., Decaen, P., Yan, C., Tao, X., Tang, L., Wang, J., Hasegawa, K., Kumasaka, T., He, J., Wang, J., Clapham, D.E., and Yan, N. (2012). Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel. *Nature* 486, 130-134.
- Zhao, P., Barr, T.P., Hou, Q., Dib-Hajj, S.D., Black, J.A., Albrecht, P.J., Petersen, K., Eisenberg, E., Wymer, J.P., Rice, F.L., and Waxman, S.G. (2008). Voltage-gated sodium channel expression in rat and human epidermal keratinocytes: evidence for a role in pain. *Pain* 139, 90-105.
- Zhao, Y., Cai, X., Ye, T., Huo, J., Liu, C., Zhang, S., and Cao, P. (2011). Analgesic-antitumor peptide inhibits proliferation and migration of SHG-44 human malignant glioma cells. *J Cell Biochem* 112, 2424-2434.
- Zhu, H.L., Wassall, R.D., Cunnane, T.C., and Teramoto, N. (2009). Actions of kurtotoxin on tetrodotoxin-sensitive voltage-gated Na⁺ currents, NaV1.6, in murine vas deferens myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379, 453-460.
- Zhu, S., Darbon, H., Dyason, K., Verdonck, F., and Tytgat, J. (2003). Evolutionary origin of inhibitor cysteine knot peptides. *FASEB J* 17, 1765-1767.
- Zhu, X., Zamudio, F.Z., Olbinski, B.A., Possani, L.D., and Valdivia, H.H. (2004). Activation of skeletal ryanodine receptors by two novel scorpion toxins from *Buthotus judaicus*. *J Biol Chem* 279, 26588-26596.
- Zsiros, E., Kis-Toth, K., Hajdu, P., Gaspar, R., Bielanska, J., Felipe, A., Rajnavolgyi, E., and Panyi, G. (2009). Developmental switch of the expression of ion channels in human dendritic cells. *J Immunol* 183, 4483-4492.

Résumé

Les produits d'origine naturelle sont de plus en plus recherchés et testés pour leur potentiel thérapeutique. Les peptides issus de venins de scorpions capables de moduler l'activité des canaux ioniques constituent de robustes outils biologiques essentiels pour une meilleure compréhension des mécanismes de fonctionnement de ces canaux transmembranaires, sélectifs notamment au sodium. Ils représentent parfois les molécules majeures du venin responsables de son effet hautement toxique qui se manifeste par des syndromes cardiogéniques et d'un œdème pulmonaire souvent fatal pour l'Homme.

En modulant l'activité des canaux ioniques ces molécules sont potentiellement capables d'agir sur les processus cellulaires qui leur sont associés. Dans une première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés au mécanisme d'interaction de la toxine AahII du venin du scorpion *Androctonus australis hector* (Aah) avec le canal sodique voltage-dépendant $Na_v1.5$ et de son effet sur l'activité électrophysiologique de ce canal. Nous avons en particulier étudié la capacité du nanoanticorps anti-AahII (NbAahII 10 ou Nb10) à neutraliser l'interaction AahII/ $Na_v1.5$. Dans une seconde partie, nous avons investigué l'effet de différentes fractions peptidiques issues du venin de Aah sur la viabilité des cellules cancéreuses mammaires humaines.

La toxine AahII est considérée comme l' α -toxine la plus active du venin de scorpion Aah. Elle a notamment été décrite pour ralentir l'inactivation des canaux Na_v . Le nanoanticorps Nb10 a été développé afin de neutraliser l'effet de la toxine AahII. L'efficacité du Nb10 a été évaluée in-vivo sur des souris, mais son mécanisme d'action au niveau cellulaire reste inconnu.

Nos travaux ont confirmé que AahII ralentit de manière dose dépendante l'inactivation des canaux $Na_v1.5$ surexprimés dans des cellules HEK293, sans modifier l'amplitude du courant au pic d'une part et ont montré que le Nb10 neutralise l'effet de la toxine AahII sur la cinétique d'inactivation du canal d'autre part. L'analyse bioinformatique du complexe d'interaction de $Na_v1.5$ /AahII montre que la AahII partage la même surface d'interaction avec le Nb10, ce qui suggère fortement que ce dernier déplace dynamiquement la toxine AahII de son site de liaison sur le canal $Na_v1.5$. Au niveau physiopathologique, nous avons montré que le traitement des cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231 avec le Nb10 prévient l'augmentation de l'invasion cellulaire induite par AahII.

Dans la seconde partie de ce travail, les 3 majeures fractions issues du venin de scorpion Aah, préalablement isolées par chromatographie à basse pression (M1, M2 et AahG50), ont été testées sur la viabilité et la migration des lignées cellulaires cancéreuses mammaires humaines, MCF-7 et MDA-MB-231. Ces fractions n'ont pas eu d'effet sur la migration cellulaire mais ont induit des effets très biphasiques sur la viabilité cellulaire, démontrant de manière intéressante des effets synergiques ou antagonistes des peptides qui les composent. Afin de purifier les peptides d'intérêts, une purification supplémentaire des fractions a été réalisée par chromatographie à haute pression (HPLC). Au total, trois polypeptides ont été identifiés pour induire une diminution de la viabilité des cellules cancéreuses mammaires et feront l'objet d'investigation plus poussée.

En conclusion, nos résultats ont permis d'élucider les mécanismes physiologiques et moléculaires de neutralisation de l' α -toxine AahII par le nanoanticorps Nb10. De plus, nous avons pu identifier trois molécules peptidiques issues du venin de scorpion Aah possédant des propriétés anticancéreuses. Ces travaux se poursuivront par une étude structurale permettant d'élucider à une échelle tridimensionnelle, les topologies moléculaires sous-jacentes.

Mots clés : Toxines de scorpion, Canaux ioniques, Cancer du sein, Nanoanticorps

Abstract

Natural molecules are increasingly being researched and tested for their therapeutic potential. Scorpion venoms derived peptides modulating ion channels activity are robust biological essential tools for a better understanding of the action mechanisms of these transmembrane channels, particularly sodium channels. They represent sometimes the major molecules of the venom responsible for its highly toxic effect which manifests with cardiogenic syndromes and pulmonary edema often fatal for humans.

By modulating ion channels activity, these molecules are potentially able to act on the cellular processes associated with them. In the first part of this work, we have studied the mechanism of interaction of the AahII toxin from the scorpion venom of *Androctonus australis hector* (Aah), with the voltage-gated sodium channel $Na_v1.5$ and its effect on the electrophysiological activity of this channel. In particular, we studied the ability of the anti-AahII nanoantibody (NbAahII 10 or Nb10) to neutralize the AahII/ $Na_v1.5$ interactions. In the second part, we investigated the effect of different peptide fractions from Aah venom on the viability of human breast cancer cells.

The toxin AahII is the most active α -toxin from the North African scorpion *Androctonus australis hector* that slows the fast inactivation of Na_v channels. To fight scorpion envenomation, an anti-AahII nanobody named NbAahII10 (Nb10) was developed. The efficiency of this nanobody has been evaluated in vivo on mice, but its mechanism of action at the cellular level remains unknown.

Our work confirmed that the AahII toxin slows the fast inactivation of the adult cardiac $Na_v1.5$ channels, expressed in HEK293 cells, in a dose-dependent manner, while current amplitude was not affected, and showed that Nb10 can fully reverse the effect of the AahII toxin on the channel inactivation kinetics. Bioinformatic analysis of the $Na_v1.5$ /AahII interaction complex shows that AahII shares the same interaction surface with Nb10, which strongly suggests that Nb10 dynamically replaces the AahII toxin from its binding site on the $Na_v1.5$ channel. At the pathophysiological level, we showed that treatment of human breast cancer cells MDA-MB-231 with Nb10 prevents the increase in cell invasion induced by AahII.

In the second part of this work, the 3 major fractions from Aah scorpion venom, previously isolated by low-pressure chromatography (M1, M2, and AahG50), were tested on the viability and migration of human breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231. These fractions did not affect cell migration but induced very biphasic effects on cell viability, interestingly demonstrating synergistic or antagonistic effects of their component peptides. To purify the peptides of interest, additional purification of the fractions was performed by high-pressure chromatography (HPLC). In total, three polypeptides were identified to induce a decrease in breast cancer cell viability and will be further investigated.

In conclusion, our results elucidated the physiological and molecular mechanisms of α -toxin AahII neutralization by the Nb10 nanoantibody. In addition, we were able to identify three peptide molecules from the scorpion venom Aah with anticancer properties. This work will continue with a structural study to elucidate the underlying molecular topologies at a three-dimensional scale.

Keywords : Scorpion toxin, Ion Channels, Breast cancer, Nanobody