

MODULATION DE LA CONTRACTION DU MUSCLE SQUELETTIQUE PAR LA FRACTION NON TOXIQUE DU VENIN DE *BUTHUS OCCITANUS TUNETANUS* VIA LES RÉCEPTEURS CHOLINERGIQUES

A. CHEIKH^{1,2}, C. COGNARD², D. POTREAU, J. BESCOND², G. RAYMOND²,
M. EL AYEB¹ ET R. BENKHALIFA*

¹ Laboratoire des Venins et Toxines, Institut Pasteur de Tunis, BP 74 - 1002 Tunis, Tunisie.

² Umr 6187 Ipbcc, 40, Avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers Cedex, France.

* Auteur Correspondant: Tél.: +216 71 843 755; Fax: +216 71 791 833; E-Mail: rym.benkhalifa@pasteur.rns.tn

RESUME

Les récepteurs cholinergiques ont un rôle physiologique essentiel dans le système nerveux central et au niveau de la jonction neuromusculaire, vus leurs implications dans de nombreuses fonctions cérébrales et d'autres fonctions impliquant le système nerveux périphérique en activant les récepteurs nicotiques (nAChRs) au niveau de la jonction neuromusculaire ou au niveau des terminaisons des fibres parasympathiques via les récepteurs muscariniques (mAChRs). En effet, les récepteurs cholinergiques pourraient être reconnus par des toxines animales isolées à partir des venins de serpents ou des alcaloïdes d'origine animale ou végétale. Dans ce contexte, nous envisageons l'identification de molécules similaires dans la fraction non toxique M1, du venin du scorpion *Buthus occitanus tunetanus*. Nous présentons une étude physiologique chez les cellules musculaires squelettiques regroupant des données récemment publiées par notre équipe¹ et que nous venons de confirmer par d'autres résultats. Pour déterminer l'effet global de M1, une première étude a été réalisée sur la jonction neuromusculaire en utilisant des préparations de type nerf-muscle. Sur les myotubes en culture, une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par M1¹ est bloquée après inhibition des récepteurs à la ryanodine ou ceux à l'inositol 1,4,5-triphosphate. De plus, nous avons observé que l'application de M1 sur les myotubes, induit une dépolarisation membranaire comparable à celle induite par l'acétylcholine. Le traitement des cellules avec l' α -bungarotoxine, bloque une grande partie de l'amplitude de cette dépolarisation. Ces résultats confirment la présence d'au moins une composante de M1 active sur les nAChRs.

Mots clés : Homéostasie calcique, récepteurs cholinergiques, récepteurs muscariniques, envenimation du muscle squelettique et cardiaque.

ABSTRACT

Cholinergic receptors have an essential physiological role in the central nervous system because of their implication in higher functions in the neuromuscular junction within the brain and also in the peripheral nervous system by activating nicotinic (nAChRs) or muscarinic (mAChRs) receptors.

Moreover, cholinergic receptors could be recognized by animal toxins isolated from snake venoms or alkaloids having animal or vegetal origin. In this context, we aim to find such molecules in a non toxic venom fraction of *Buthus occitanus tunetanus* scorpion, M1, which could therefore constitute promising medical tool. We present here a physiological study in skeletal muscle cells that regroups data that have been recently published and some new results reinforcing the last ones.

The global effect of M1, was firstly studied on isolated nerve-muscle preparation. In cultured myotubes, we have found that the intracellular calcium increase, induced by M1¹ was blocked when ryanodine or inositol 1,4,5 - triphosphate receptors are inhibited. Moreover, we have shown that M1 application on myotubes, induced a membrane depolarization as seen with acetylcholine. The treatment of myotubes with α -bungarotoxin blocked in most parts the depolarization amplitude. Thus, these results confirm the presence of at least one component in M1 active in nAChRs.

Key words: Calcium homeostasis, cholinergic receptors, muscarinic receptors, skeletal and cardiac muscle envenomation.

INTRODUCTION

La fonction contractile du muscle squelettique et/ou cardiaque est tributaire du maintien de l'homéostasie calcique dans la cellule. De nombreuses toxines de scorpion sont capables de modifier cette fonction. Ainsi, Silveira et collaborateurs, ont montré que le venin de *Tityus serrulatus*, appliqué sur le cœur de cobaye, modifie la force et la fréquence de la contraction en stimulant le relargage de l'acétylcholine et des catécholamines ².

La toxine α -like, BmK1, extraite du venin de *Buthus martensi Karsch* modifie l'activité électrique et mécanique du cœur isolé de rat adulte en agissant par une autre voie impliquant les canaux sodium dépendants du potentiel ³. D'autres toxines, comme les impératoxines (Iptx) du venin de scorpion *Pandinus imperator*, présentent respectivement un effet activateur et inhibiteur de la fixation de la ryanodine sur son récepteur au niveau du cardiomyocyte et sur les récepteurs squelettiques et cardiaques exprimés dans des vésicules bilipidiques ^{4,5}.

D'autres peptides proches des impératoxines ont été identifiés dans les venins de *Scorpio maurus* (maurocalcine) ^{6,7} et de *Buthus judaicus*, (BjTx-1 et 2) ⁸ et sont responsables de la stimulation de la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique en favorisant grâce à leur fixation, l'état ouvert des récepteurs à la ryanodine, RyR. Rares sont les molécules naturelles capables d'activer les récepteurs cholinergiques.

Dans le venin de *Buthus occitanus tunetanus*, la fraction toxique la plus étudiée, BotG50, renferme des toxines actives sur les canaux Na⁺ et K⁺. La fraction BotM1 est la première fraction éluee par filtration du venin de Bot sur une colonne sephadex G-50. Elle renferme majoritairement des protéines de haut poids moléculaire et ne présente pas de toxicité après injection intracérébroventriculaire aux souris ⁸. Elle possède la particularité d'activer la lipolyse hormono-sensible grâce à son interaction avec les récepteurs β -adrénergiques des adipocytes de rats ⁹ via deux protéines, lipolysis activating venom protein (LVP1 et 2) ¹⁰.

Sachant que M1 a été étudiée sur le cœur isolé de rat adulte et sur les cardiomyocytes en culture ¹, le présent travail étudie de l'effet de M1 sur la contraction musculaire. Nous avons utilisé deux modèles, la préparation nerf-muscle de grenouille pour le modèle jonction neuromusculaire et les myotubes de rats nouveau-nés en culture pour le modèle cellulaire.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique

Les animaux sont manipulés en respectant les instructions du Comité de Réflexion d'Ethique en Expérimentation Animale en France (Decret 2005-264).

• Préparation nerf-muscle

Les expérimentations ont été réalisées sur des préparations nerf sciatique-muscle gastrocnémien isolées de grenouilles, *Rana esculenta*. L'ensemble nerf-muscle est prélevé en sectionnant l'os péronéo-tibial et déposé dans la cuve. Cette opération est effectuée délicatement afin de préserver la jonction neuromusculaire en bon état; de plus du Ringer à 4°C est constamment ajouté permettant ainsi d'humidifier la préparation, (Ringer (mM): NaCl 10, Na₂HPO₄ 16, NaHCO₃ 25, KCl 7.75, KH₂PO₄ 1.18, D-Glucose 10, Saccharose 67, HEPES 10, pH 7.4 (NaOH)).

Pour l'enregistrement de l'activité contractile, le muscle est relié à un capteur (transducteur de force) par l'intermédiaire d'un crochet, connecté à un amplificateur (Powerlab 4/20) lui-même relié à un ordinateur via une interface (Powerlab 8/30).

Ce capteur sensible à la tension, détecte les variations de l'activité mécanique isométrique du muscle squelettique et permet l'enregistrement de cette tension en fonction du temps. Ce signal est enregistré informatiquement grâce au logiciel Chart.

• Culture primaire de myotubes de rats nouveau-nés

Nous procédons selon le protocole suivant dans la culture primaire des myotubes de rats nouveau-nés. Dans un premier temps, les muscles des membres postérieures sont coupés en plusieurs morceaux, puis sont rincés par du milieu de type spinner (116 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, H₂O, 22.6 mM NaHCO₃, GlucoseD 1g/l, 3 mM HEPES, rouge de phénol 10 mg/l). Ensuite, les cellules myogéniques sont obtenues après digestion enzymatique dans un milieu spinner renfermant de la trypsine (Seromed) sous agitation continue à 37° C. Les sur-nageants sont récupérés dans un milieu de prolifération (Hams' F12; Cambrex, Verviers, Belgique et 10% sérum de cheval; Invitrogen, Cergy Pontoise, France, 10% sérum de veau fœtal; Biowest, Nouille, France; 1% antibiotiques, 100 U/ml pénicilline G et 50 U/ml streptomycine ; Cambrex), puis sont centrifugés à 400 g, à 4°C, pendant 15 min. Les culots

contenant les précurseurs myogéniques sont suspendus dans du milieu de prolifération puis filtrés sur une membrane stérile (pore: $\varnothing = 25 \mu\text{m}$). Un comptage sur cellule de Malassez et une dilution dans du milieu de prolifération permettent d'aboutir à une concentration de 8.105 cellules/ml.

Les cellules sont pré-ensemencées 1h 15 dans des boîtes de Pétri et placées dans un incubateur (35,5°C, air à 5 % CO₂ saturé en vapeur d'eau) permettant l'adhésion préférentielle d'une majorité de fibroblastes au fond des boîtes. Les cellules myogéniques en suspension sont récupérées, ensemencées dans des boîtes de Pétri stériles ($\varnothing = 35 \text{ mm}$) contenant une lamelle de verre de 0.17 mm d'épaisseur et replacées dans l'incubateur.

Les cellules se multiplient jusqu'à atteindre un état de confluence où elles s'alignent et forment un tapis cellulaire. Dans nos conditions, cette étape de prolifération dure entre 2 et 3 jours. L'initiation expérimentale de la fusion permet aux cellules mononucléées de fusionner en myotubes polynucléés. A ce stade, le milieu de prolifération est remplacé par un milieu de fusion de type Dulbecco's modified Eagle (DMEM, Cambrex), 5% sérum de cheval (Invitrogen) et 1% d'antibiotique de type pénicilline et streptomycine (Cambrex)..

METHODES

MICROSCOPIE CONFOCALE

L'homéostasie calcique dans les cellules est suivie par un microscope inversé (Olympus IX 70, Japon): Les cellules sont visualisées à travers un objectif 1.3 NA (Olympus) à immersion d'eau 60X grâce à un microscope confocal (Bio-rad MRC 1024) équipé de gaz laser Ar/Kr, 15 mW. Les cellules sont chargées avec de la Fluo4-AM, (5.4 μM) (Sigma) qui sera déestérifiée dans le cytoplasme. Dans le cas de la cellule musculaire squelettique le milieu extracellulaire est composé par (en mM: 130 NaCl, 5.4 KCl, 2.5 CaCl₂, 0.8 MgCl₂, 10 HEPES, 5.6 glucose, 300 mOsm, pH 7.4) et dans le cas des cardiomyocytes, c'est du Tyrode.

PATCH-CLAMP

Mesure du potentiel membranaire de la cellule musculaire squelettique

Les enregistrements sont réalisés en mode courant imposé et en configuration cellule-entière à température ambiante (22-25°C), selon la technique de patch-clamp ¹¹. Les pipettes sont étirées à partir du

verre en borosilicate dont la résistance est comprise entre 25 et 35 M Ω . Le milieu intrapipette est composé par (en mM) 130 KCl, 0.37 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 EGTA, 5 ATP-Mg, 5 HEPES, (7.20 pH) et 280 mOsm. Le milieu extracellulaire est le même que celui utilisé en microscopie confocale. Les pipettes de patch sont connectées à un amplificateur patch clamp (Axopatch 200B, Axon Instruments). La configuration cellule entière est obtenue après rupture de la membrane. L'enregistrement du potentiel membranaire, l'acquisition et l'analyse des données sont effectués grâce à un logiciel pClamp (version 8, Axon Instruments).

RESULTATS

Effet de BotM1 sur la contraction du muscle squelettique

Le calcium est le déclencheur de l'activité contractile aussi bien dans le muscle squelettique que celui cardiaque. Une étude préliminaire a été menée sur des préparations nerf sciatique-muscle gastrocnémien de la grenouille *Rana esculenta*. Le muscle toujours relié au nerf est fixé par ses deux extrémités tendineuses, d'un côté à un point fixe et de l'autre à un capteur de force. Les variations de tension du muscle sont alors enregistrées au cours du temps dans les conditions isotoniques. Les substances pharmacologiques sont déposées au niveau de la liaison entre le nerf et le muscle. L'application de l'acétylcholine (Ach; 10 μM) entraîne, après 1 à 3 min généralement, des contractions musculaires plus ou moins isolées et assez brèves rappelant l'effet physiologique classique de l'Ach sur la jonction neuromusculaire. Ces premiers résultats ont été considérés comme un témoin positif de la fonctionnalité de la jonction (Figure 1A). Après lavage avec du milieu physiologique, l'application de BotM1 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) provoque des réponses mécaniques similaires, mais plus longues (de type tétanique) (Figure 1B). Ces observations supposent que BotM1, comme l'acétylcholine, est capable de provoquer la contraction musculaire comme a été décrit lors de l'étude effectuée à l'échelle cellulaire sur le modèle des myotubes de rats nouveau-nés en culture ⁵.

D'après les travaux de Cheikh et al. ¹, la perfusion du cœur isolé de rat adulte par 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BotM1, en utilisant la technique classique du Langendorff, diminue d'une manière assez rapide l'amplitude de la tension. La diminution de la fréquence est progressive et l'état d'équilibre est atteint après environ 5 min¹.

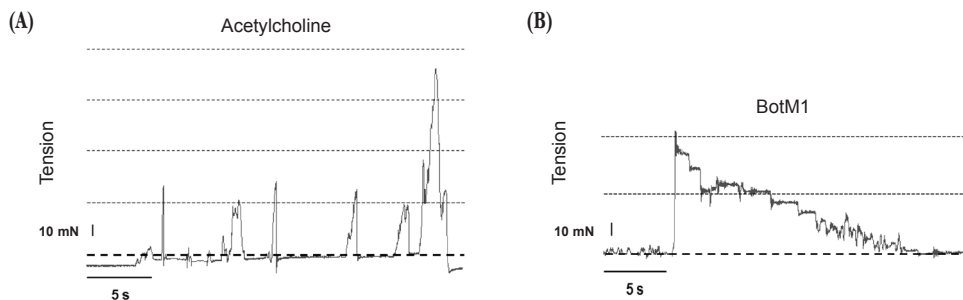


Figure 1. Effet de la fraction non toxique du venin de *Buthus occitanus tunetanus*, BotM1, sur la tension du muscle de la préparation nerf-muscle de grenouille *Rana esculenta*. (A) L'Ach (10 μ M) provoque des contractions musculaires isolées de 50 à 200 mN. (B) Un effet similaire (de l'ordre de 100 mN), mais plus durable, sur la tension est observé après application de BotM1 (20 μ g/mL).

Etude de l'effet de BotM1 sur la $[Ca^{2+}]_i$

La mesure du calcium intracellulaire dans les myotubes a été réalisée par microscopie confocale. Différentes concentrations de BotM1, allant de 2 à 30 μ g/ml ont été appliquées sur des myotubes de rats nouveau-nés en culture. Une variation de la fluorescence correspond aux changements de la

concentration du calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) dans des régions sélectionnées dans les cellules (Roi) ou hors de ces dernières (Bg). L'application de BotM1 à ces différentes concentrations, provoque une augmentation de l'intensité de fluorescence dans les myotubes au repos (Figure 2) suggérant un effet indépendant de la concentration.

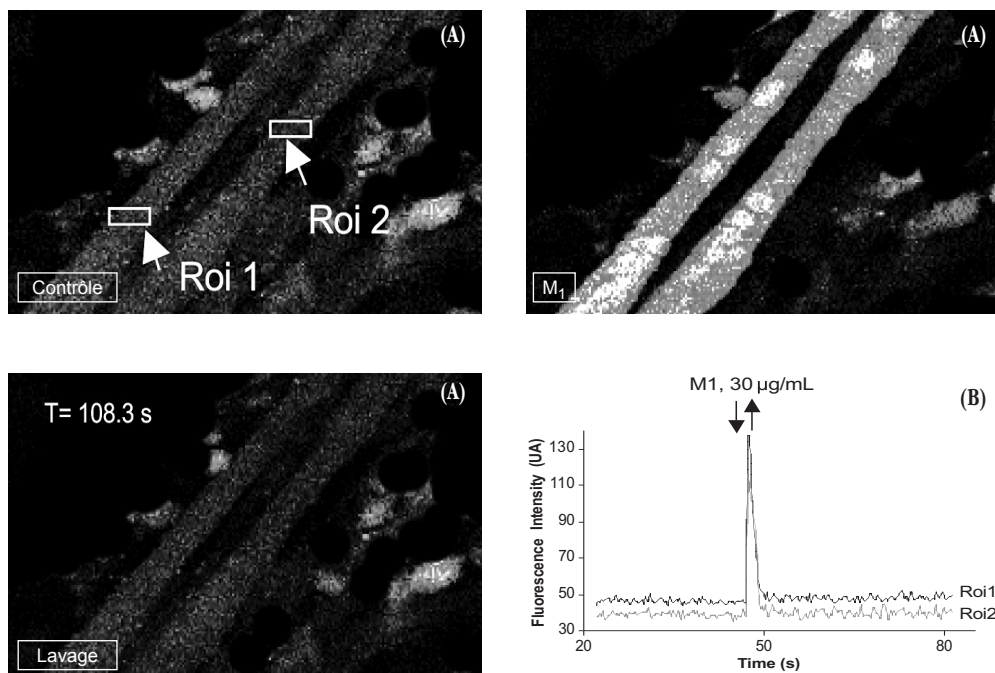


Figure 2. Etude du mode d'action de BotM1 sur le niveau du calcium intracellulaire dans les myotubes (A) Visualisation de l'effet de M1 (30 μ g/ml) par microscopie confocale sur le calcium dans les myotubes chargés par la sonde Fluo-4 (6 μ M). La fréquence d'acquisition est de 1 image toutes les 300 ms. (B) Représentation de tracés correspondants à l'amplitude moyenne de la fluorescence, en unité arbitraire (U.A.), calculée à partir de pixels appartenant aux régions (Roi1 et Roi2) choisies dans les myotubes en présence de BotM1 à 30 μ g/ml).

L'augmentation du calcium dans le cytosol peut s'expliquer soit par une entrée d'ions du milieu extracellulaire à travers les canaux calciques de type L, soit par son relargage à partir des sites de stockage intracellulaires essentiellement du réticulum sarcoplasmique, à travers les récepteurs à la ryanodine (RyR) ou ceux à l'inositol 1, 4, 5 triphosphateinositide (RIP3). D'après la figure 3A, la seule application de BotM1 (10 $\mu\text{g/ml}$, $T = 50$ s) stimule une augmentation transitoire de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. L'incubation des cellules en présence de la ryanodine 5 μM , bloqueur des RyR à l'état ouvert, est responsable de l'augmentation du niveau de calcium de base. Cependant, une deuxième application de BotM1 à la même concentration en présence de ce bloqueur ($T = 2000$ s) n'induit pas l'effet transitoire enregistré au départ ($T = 50$ s). D'après la figure 3B, l'incubation des

cellules en présence du 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), bloqueur des RIP3 induit des vagues calciques (voir à $T = 250$ s). La variation du niveau de calcium de base n'est pas significative. Cependant, une seconde application de la BotM1 seule ($T = 2200$ s) après blocage des RIP3 est sans effet. D'après ces résultats, le blocage respectif des RyR et des RIP3 inhibe l'effet stimulateur de BotM1, indiquant une provenance sarcoplasmique de l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ enregistrée en présence de M1.

Sachant que, lors du mécanisme de couplage excitation-contraction, les canaux calcium dépendants du potentiel sont responsables du déclenchement du relargage du calcium à partir des sites de stockage intracellulaire, les résultats obtenus indiquent que BotM1 pourrait affecter l'afflux de calcium à travers ces canaux.

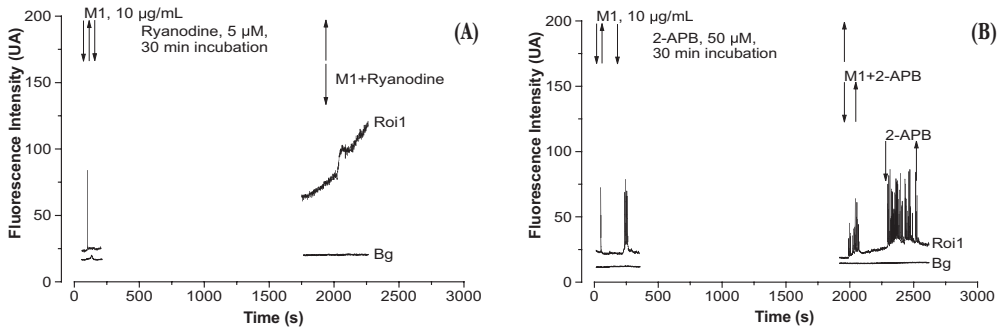


Figure 3. Implication des sites de stockage intracellulaires dans l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induite par BotM1 dans les myotubes. Dans (A) et (B), M1 a été brièvement appliquée sur les myotubes. (A) Les cellules sont ensuite incubées en présence de Ryanodine (durant 30 min à 5 μM) ou (B) avec du 2-APB (durant 30 min à 50 μM). En présence de l'un ou de l'autre de ces bloqueurs, l'effet stimulateur de BotM1 sur le calcium est inhibé. Roi: région d'intérêt sélectionnée dans la cellule. Bg: Région témoin sélectionnée hors de la cellule.

Détermination de la protéine membranaire cible de BotM1 dans les myotubes

Les récepteurs nicotiniques, protéines clés de l'activité contractile au niveau de la jonction neuromusculaire, sont fortement inhibés par l' α -bungarotoxine (α -BgTx) ¹². Toujours en microscopie confocale, nous avons pu montrer que l'incubation des myotubes en présence de α -BgTx (5 μM) inhibe l'effet stimulateur de BotM1 ¹³. Par conséquent, nous avons conclu à un effet activateur de BotM1 sur le calcium intracellulaire via une activation des récepteurs nicotiniques.

D'autre part, dans la cellule musculaire squelettique, l'activation des nAChR affecte le potentiel membranaire en induisant une variation locale de ce dernier. Cette variation, à un certain seuil, est à l'origine de

l'émission de potentiel d'action membranaire responsable à son tour de la contraction.

Afin de confirmer les résultats précédents et de savoir si les nAChR sont impliqués dans l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, nous avons étudié l'effet de BotM1 sur le potentiel membranaire de la cellule. Le potentiel membranaire des myotubes correspondant au potentiel de repos est maintenu dans les conditions physiologiques grâce à la répartition inégale des ions K^+ de part et d'autre de la membrane essentiellement par deux mécanismes, les canaux sélectifs au potassium et la pompe ATPasique Na^+/K^+ . Dans ce travail, le potentiel membranaire est mesuré par la technique de patch-clamp en mode courant imposé et configuration cellule entière.

BotM1 induit un déplacement du potentiel de membrane de -60 mV à environ -12 mV. Après lavage, le potentiel membranaire revient à sa valeur initiale (-60 mV) et les cellules sont de nouveau capables de répondre à une deuxième stimulation par BotM1 (Figure 4) ($n = 4$). Ces résultats confirment le rôle dépolarisant de la fraction M1 (Figure 4). L'incubation des cellules en présence d'abungarotoxine bloque 90% de la dépolarisation provoquée par BotM1 et le lavage permet une récupération de 70% environ de l'effet dépolarisant enregistré au départ.

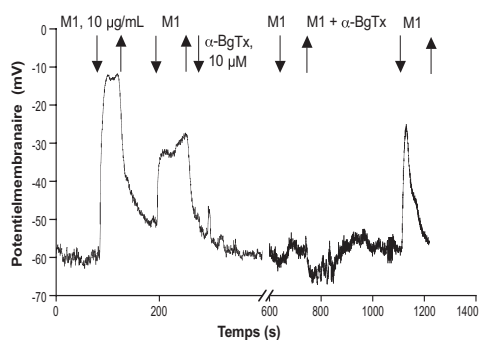


Figure 4. Effet de BotM1 sur le potentiel membranaire. Tracé traduisant la variation du potentiel membranaire d'un myotube en fonction du temps, enregistré par la technique de patch clamp en configuration cellule entière. L'application de BotM1 dépolarise la membrane d'environ 45 mV. En présence de α -Bungarotoxine (10 μ M), une grande partie de l'effet dépolarisant de BotM1 est bloqué. Le lavage permet la restauration de 70% de l'effet dépolarisant de BotM1 enregistré au départ.

DISCUSSION

Cette étude a montré que la fraction non toxique du venin de *Buthus occitanus tunetanus*, BotM1, induit la contraction du muscle gastrocnémien chez la grenouille via l'activation des nAChR. Des travaux antérieurs ont montré que cette même fraction diminue l'amplitude et la fréquence des battements cardiaques chez le rat adulte par modulation du calcium via les mAChR.

A l'échelle cellulaire, BotM1 appliquée sur des myotubes en culture à 10 μ g/mL, induit l'émission de vagues calciques. Sachant que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ pourrait être aussi bien d'origine extracellulaire qu'intracellulaire, nous avons recouru grâce à l'utilisation d'inhibiteurs agissant d'une manière sélective sur les protéines impliquées dans le mécanisme de couplage excitation contraction

(CEC). Le blocage des récepteurs à la ryanodine (RyR) par la ryanodine (5 μ M) inhibe l'effet de BotM1. L'augmentation progressive du niveau de calcium de base est expliquée par le fait, qu'à cette concentration, la ryanodine bloque les RyR dans une conformation ouverte ¹⁴ d'où la désensibilisation des récepteurs nicotiniques. D'autres expérimentations ont été réalisées en présence du 2-aminoéthoxydiphenyl borate (2-APB), un antagoniste des récepteurs à l'inositol 1,4,5 triphosphateinositide (RIP3) ¹⁵. Une fois appliquée sur les myotubes, le 2-APB est capable de générer des vagues calciques durant approximativement 2 min, ensuite les cellules récupèrent leur état de repos. Cependant, l'application de BotM1 après la perfusion de 2-APB n'a aucun effet sur le calcium. L'ensemble de ces résultats est en faveur d'un blocage de l'effet de BotM1 en présence du 2-APB ou de la ryanodine, suggérant ainsi une origine sarcoplasmique de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$.

Dans les cellules musculaires squelettiques, le calcium agit comme un messager intracellulaire essentiellement impliqué dans le mécanisme de CEC. C'est la stimulation des récepteurs nicotiniques (nAChR) qui est à l'origine de l'excitation de la cellule. Le nAChR est considéré comme étant la protéine clef transductrice de signal dans la jonction neuromusculaire, responsable de la génération de dépolarisations membranaires localisées. Nos résultats ont montré que l'induction de la dépolarisation du potentiel membranaire par BotM1 est bloquée en présence d' α -bungarotoxine, suggérant ainsi, la présence d'au moins un composé dans cette fraction qui interagit avec les nAChR et induit une dépolarisation membranaire.

Ces résultats sont prometteurs d'autant plus que dans le domaine thérapeutique, des efforts non négligeables ont été réalisés afin d'identifier et de caractériser de nouveaux ligands nAChR-spécifiques. En effet, la caractérisation d'agonistes agissant d'une manière sélective sur les nAChR neuronaux pourrait être d'une grande utilité thérapeutique dans le traitement de certaines maladies neurologiques, comme l'épilepsie ^{16, 17}. Jusqu'à présent, il a été rapporté un effet positif de certains venins sur le niveau du calcium myoplasmique, telle que la trachynilysine, une protéine toxique extraite du venin de poisson *Synanceja trachynis* qui agit via la libération massive l'acétylcholine (ACh) des terminaisons nerveuses au niveau des préparations neuromusculaires

isolées^{18, 19, 20}. Spande et al.²¹ ont isolé un alcaloïde à partir de la peau de grenouille *Epipedobates tricolor*, appelé épibatidine, capable d'induire la libération de l'Ach^{22, 20}. Jusqu'à présent, aucune molécule issue de venins de scorpions ne s'est révélée active sur les nAChR dans le muscle squelettique. Les travaux effectués par Nirthanan et al.²³ ont montré la présence d'un agoniste cholinergique dans le venin du scorpion *Heterometrus spinnifer* qui s'est avéré n'être autre que l'Ach.

L'étude ayant porté sur les cardiomyocytes a permis d'attribuer les effets chronotropes et inotropes négatifs de cette fraction, au moins en partie à l'inhibition du courant calcique de type-L dans la cellule ventriculaire de rat adulte¹. Sachant que, l'Ach a un effet inotrope négatif sur les myocytes ventriculaires de rat²⁴. Actuellement, il est bien démontré que la régulation de l'activité électrique des canaux ioniques via l'activation des mAChR en empruntant la voie directe des protéines G ou indirecte, après modulation (inhibition ou facilitation) des réponses dépendantes de l'AMPC dépend aussi bien du type de myocyte ainsi que des conditions expérimentales^{25, 26}. En effet, concernant une possible implication de l'oxyde nitrique (NO) et du GMPc dans l'inhibition muscarinique du ICaL, d'autres expérimentations seront envisagées, afin de déterminer si cette voie est empruntée par BotM1. Cependant, bien que ce mécanisme de signalisation soit suggéré dans les myocytes ventriculaires et a été bien élucidé dans les cellules nodales et atrioventriculaires¹¹, le fait que l'effet des mAChR sur ICaL a été observé chez la souris NOS-KO^{27, 28}, écarte cette hypothèse.

Dans ce travail, les résultats obtenus sur le muscle squelettique et ceux déjà obtenus avec le muscle cardiaque démontrent la présence d'au moins, une molécule dans la fraction non toxique du venin du scorpion jaune *Buthus occitanus tunetanus*, interagissant avec les AChR. L'identification et la caractérisation de cette molécule devraient être d'un grand intérêt, étant donnée que les agonistes des AChR sont considérés comme des analgésiques potentiels et des outils thérapeutiques dans le traitement de certaines maladies neurologiques et des désordres mentaux relatifs à une diminution de l'activité cholinergique²⁰.

De ce fait, les expérimentations sont en cours pour isoler et caractériser la ou les protéine(s) responsable(s) de la modulation du courant ICa(L) dans le cardiomyocyte et du calcium intracellulaire dans les myo-

tubes, afin de mieux étudier l'affinité pour leur récepteur et de les exploiter éventuellement dans le domaine thérapeutique.

REFERENCES

- 1- **A. Cheikh, R. Benkhalifa, J. Bescond, M. El Ayeb, G. Raymond, C. Cognard et D. Potreau** (2006). Depression of cardiac L-type calcium current by a scorpion venom fraction M1 following muscarinic receptors interaction involving adenylate cyclase pathway. *Toxicon*, **48**, 373-387.
- 2- **N.P. Silveira, T. Moraes-Santos, A.D. Azevedo et L. Freire-Maia** (1991). Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and one of its purified toxins (toxin gamma) on the isolated guinea-pig heart. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **98**, 329-336.
- 3- **C.P. Sun, Y. Li et X.F. Liu** (2003). Quasi-Spin-Wave Quantum Memories with a Dynamical Symmetry. *Phys. Rev. Lett.*, **91**, 147903.
- 4- **R. El-Hayek, A.J. Lokuta, C. Arevalo et H.H. Valdivia** (1995). Peptide probe of ryanodine receptor function. Imperatoxin A, a peptide from the venom of the scorpion *Pandinus imperator*, selectively activates skeletal-type ryanodine receptor isoforms. *J. Biol. Chem.*, **270**, 28696-28704.
- 5- **H.H. Valdivia, M.S. Kirby, W.J. Lederer et R. Coronado** (1992). Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 12185-12189.
- 6- **Z. Fajloun, R. Kharat, L. Chen, C. Lecomte, E. Di Luccio, D. Bichet, M. El Ayeb, H. Rochat, P.D. Allen, I.N. Pessah, M. De Waard et J.M. Sabatier** (2000). Chemical synthesis and characterization of maurocalcin, a scorpion toxin that activates Ca²⁺ release channel/ryanodine receptors. *FEBS Lett.*, **469**, 179-185.
- 7- **L. Chen, E. Estève, J.M. Sabatier, M. Ronjat, M. De Waard, P.D. Allen et I.N. Pessah** (2003). Maurocalcin and peptide A stabilize distinct subconductance states of ryanodine receptor type 1, revealing a proportional gating mechanism. *J. Biol. Chem.*, **278**, 16095-16106.
- 8- **X. Zhu, F.Z. Zamudio, B.A. Olbinski, L.D. Possani et H.H. Valdivia** (2004). Activation of skeletal ryanodine receptors by two novel scorpion toxins from *Buthotus judaicus*. *J. Biol.*

- Chem.*, **279**, 26588-26596
- 9- **S. Drira-Chaabane, M. El Ayeb, J. Torresani et J. Gharbi-Chihi** (1996). Lipolytic action of *Buthus occitanus tunetanus* venom: involvement of the beta adrenergic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**, 280-286.
 - 10- **N. Soudani, J. Gharbi-Chihi, N. Srairi-Abid, C.M. Yazidi, R. Planells, A. Margotat, J. Torresani et M. El Ayeb** (2005). Isolation and molecular characterization of LVP1 lipolysis activating peptide from scorpion *Buthus occitanus tunetanus*. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1747**, 47-56.
 - 11- **O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann et F.J. Sigworth** (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, **391**, 85-100.
 - 12- **F. Rangwala, R.C. Drisdell, S. Rakhilin, E. Ko, P. Atluri, A.B. Harkins et al.** (1997). Neuronal alpha-bungarotoxin receptors differ structurally from other nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.*, **17**, 8201-8212.
 - 13- **A. Cheikh, R. Benkhalifa, M. El Ayeb, G. Raymond, D. Potreau et C. Cognard** (2007). A novel depolarizing activity of scorpion venom agonizing nicotinic receptors in skeletal muscle cells. *Toxicon*, **49**, 117-122.
 - 14- **S. Fleischer, E.M. Ogunbunmi, M.C. Dixon et E.A.M. Fleer** (1985). Localization of Ca^{2+} release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 7256-7259.
 - 15- **T. Maruyama, T. Kanaji, S. Nakade, T. Kanno et K. Mikoshiba** (1997). 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins (1,4,5)P₃-induced Ca^{2+} release. *J. Biochem.*, **122**, 498-505.
 - 16- **A.F. Dulhunty** (1992). The voltage-activation of contraction in skeletal muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **57**, 181-223.
 - 17- **M.W. Holladay, M.J. Dart et J.K. Lynch** (1997). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as targets for drug discovery. *J. Med. Chem.*, **40**, 4169-4194.
 - 18- **N.H. Lin, D.E. Gunn, Y. Li, Y. He, H. Bai, K.B. Ryther, T. Kuntzweiler, D.L. Donnelly-Roberts, D.J. Anderson, J.E. Campbell, J.P. Sullivan, S.P. Arneric et M.W. Holladay** (1998). Synthesis and structure-activity relationships of pyridine-modified analogs of 3-[2-((S)-pyrrolidinyl)methoxy]pyridine, A-84543, a potent nicotinic acetylcholine receptor agonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 249-254.
 - 19- **C. Colasante, F.A. Meunier, A.S. Kreger et J. Molgo**, (1996). Selective depletion of clear synaptic vesicles and enhanced quantal transmitter release at frog motor nerve endings produced by trachynilysin, a protein toxin isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom. *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 2149-2156.
 - 20- **S. Meunier, S. Pol, J.L. Houeto et M. Vidailhet** (2000). Abnormal reciprocal inhibition between antagonist muscles in Parkinson's disease. *Brain.*, **123**, 1017-1026.
 - 21- **T.F. Spande, H.M. Garraffo, H.J. Yeh, Q.L. Pu, L.K. Pannell et J.W. Daly**, (1992). A new class of alkaloids from a dendrobatid poison frog: a structure for alkaloid 251F. *J. Nat. Prod.*, **55**, 707-722.
 - 22- **D.W. Bonhaus, K.R. Bley, C.A. Broka, D.J. Fontana, E. Leung, R. Lewis, A. Shieh et E.H. Wong** (1995). Characterization of the electrophysiological, biochemical and behavioral actions of epibatidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**, 1199-1203.
 - 23- **S. Nirthanan, J.S. Joseph, P. Gopalakrishnakone, H.E. Khoo, L.S. Cheah et M.C. Gwee** (2002). Biochemical and pharmacological characterization of the venom of the black scorpion *Heterometrus spinifer*. *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 49-55.
 - 24- **S.O. McMorn, S.M. Harrison, W.J. Zang, X.J. Yu et M.R. Boyett** (1993). A direct negative inotropic effect of acetylcholine on rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.*, **265**, 393-400.
 - 25- **J.E. Tonder et P.H. Olesen** (2001). Agonists at the alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors: structure-activity relationships and molecular modeling. *Curr. Med. Chem.*, **8**, 651-674.
 - 26- **P. Abrams, K.E. Andersson, J.J. Buccafusco, C. Chapple, W.C. de Groat, A.D. Fryer, G. Kay, A. Laties, N.M. Nathanson, P.J. Pasricha et A.J. Wein** (2006). Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br. J. Pharmacol.*, **148**, 565-578.
 - 27- **G. Vandecasteele, T. Eschenhagen, H. Scholz, B. Stein et R. Fischmeister** (1999).

Muscarinic and beta-adrenergic regulation of heart rate, force of contraction and calcium current is preserved in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.*, **5**, 331-334.

- 28- **A.E. Belevych et R.D. Harvey** (2000). Muscarinic inhibitory and stimulatory regulation of the L-type Ca^{2+} current is not altered in cardiac ventricular myocytes from mice lacking endothe-

lial nitric oxide synthase. *J. Physiol.*, **528**, 279-289.

- 29- **S. Bartual, H. Seifert, C. Hippler, M. Angeles Dominguez Luzon, H. Wisplinghoff and F. Rodriguez-Valera** (2005). Development of a multilocus sequence typing scheme for characterisation of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.*, **43** (9), 4382-4390.