



HAL
open science

Neurotoxine botulique : mécanismes moléculaires et cellulaires de son action sur le système nerveux

Bernard Poulain, Michel R Popoff

► To cite this version:

Bernard Poulain, Michel R Popoff. Neurotoxine botulique : mécanismes moléculaires et cellulaires de son action sur le système nerveux. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 2020, 204 (4), pp.369-378. 10.1016/j.banm.2020.01.022 . hal-02933970

HAL Id: hal-02933970

<https://hal.science/hal-02933970>

Submitted on 8 Sep 2020

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

1 **Neurotoxine botulique : mécanismes moléculaires et cellulaires de son action sur le**
2 **système nerveux.**

3

4 **Bernard Poulain^{1,§} et Michel R. Popoff²**

5

6 ¹ CNRS et Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives,
7 Strasbourg ; poulain@inci-cnrs.unistra.fr

8 ² Bacterial Toxins, Institut Pasteur, Paris ; popoff2m@gmail.com

9

10 § corresponding author

11

12 **Résumé**

13 Les toxines botuliques sont des complexes de protéines formés d'une protéine
14 neuro-active, la neurotoxine botulique (BoNT), et de protéines associées non toxiques.
15 Toutes les indications médicales des toxines botuliques sont basées sur l'action inhibitrice
16 de très longue durée de la BoNT sur la libération de neurotransmetteur. La BoNT est une
17 protéine de 150 kDa qui se lie aux terminaisons nerveuses, est internalisée dans celles-ci
18 et bloque la machinerie d'exocytose des neurotransmetteurs. Selon son sérotype la BoNT
19 clive d'une des trois protéines SNARE impliquées dans la fusion des vésicules
20 synaptiques avec la membrane plasmique des terminaisons nerveuses, indistinctement du
21 type de transmetteur qu'elles contiennent. La très forte sélectivité d'action de la BoNT pour
22 les terminaisons des neurones est principalement due à sa liaison à des récepteurs
23 (synaptotagmine ou SV2 selon le sérotype de BoNT) qui sont des protéines des vésicules
24 synaptiques exposées en surface des terminaisons des neurones à l'occasion de
25 l'exocytose des neurotransmetteurs. La BoNT ne peut pas franchir la barrière hémato-
26 encéphalique. Ses effets sont majoritairement périphériques. Néanmoins, après une

27 injection de BoNT en périphérie, une petite fraction de la neurotoxine capturée par les
28 terminaisons nerveuses périphériques peut être transportée jusqu'aux corps cellulaires
29 des neurones moteurs et sensitifs. La spécificité neuronale des BoNT en fait un outil
30 thérapeutique utilisé dans de très nombreuses indications relevant de la médecine
31 physique et de réadaptation, la neurologie, l'ophtalmologie, l'urologie et la prise en charge
32 de la douleur.

33

34 **Mots clefs :**

35 Toxine botulique, neurotoxine botulique, protéines non-toxiques associées, récepteurs aux
36 neurotoxines botuliques, sélectivité d'action neuronale des neurotoxines botuliques, action
37 périphérique des neurotoxines botuliques, effet central des neurotoxines botuliques.

38

39

40 **Remerciements :** Les travaux des auteurs ont bénéficié du soutien financier de leurs
41 tutelles institutionnelles (CNRS, Université de Strasbourg et Institut Pasteur).

42 **Botulinum neurotoxin: molecular and cellular mechanisms of its action on the**
43 **nervous system.**

44

45 **Summary**

46 Botulinum toxins are protein complexes comprised of a neuroactive protein, botulinum
47 neurotoxin (BoNT), and several non-toxic associated proteins. All medical indications for
48 botulinum toxins are based on the very long-term inhibitory action of BoNT on the release
49 of neurotransmitter. BoNT is a 150 kDa protein that binds to nerve endings, is internalized
50 in them and blocks the vesicular neurotransmitter exocytosis machinery. Depending on its
51 serotype, BoNT cleaves one among the three SNARE proteins involved in the fusion of
52 synaptic vesicles with the plasma membrane of nerve endings, regardless of the type of
53 transmitter they contain. The very high selectivity of action of BoNT for neuron nerve
54 terminals is mainly due to its binding a protein receptor (synaptotagmin or SV2, depending
55 on the BoNT serotype), which is a synaptic vesicle membrane protein exposed on the
56 surface of neuron terminations during neurotransmitter exocytosis. BoNT cannot cross the
57 blood-brain barrier, therefore, its effects are mainly peripheral. Nevertheless, after an
58 injection of BoNT in the periphery, the neurotoxin captured by the peripheral nerve endings
59 can be retrogradely transported inside sensory neurons where it can act, thereby
60 modifying sensory information ascending to the central nervous system. The neuronal
61 specificity of BoNT makes it a therapeutic tool used in a wide range of indications in
62 physical and rehabilitation medicine, neurology, ophthalmology, urology and pain
63 management.

64

65 **Key words:** Botulinum toxin, botulinum neurotoxin, non-toxic associated proteins,
66 botulinum neurotoxin receptor, botulinum neurotoxin neuronal specificity, peripheral action
67 of botulinum neurotoxins, central effects of botulinum neurotoxins.

68 **1. Introduction**

69 Les préparations commerciales de toxine botulique sont largement utilisées comme
70 agents thérapeutiques depuis les travaux pionniers d'Alan Scott en 1980 [1]. Les
71 domaines médicaux concernés sont la médecine physique et de réadaptation, la
72 neurologie, l'ophtalmologie, l'urologie (pour revue [2]) et la prise en charge de la douleur
73 (pour revue [3] ; voyez les contributions de Danièle Ranoux et de Nadine Attal, dans ce
74 même volume). La toxine botulique (7 sérotypes majeurs répartis en plus de 40 sous-
75 types) est un complexe moléculaire comprenant une seule entité active sur les neurones :
76 la neurotoxine botulique (150 kDa, BoNT). Cette courte revue a pour but de faire le point
77 sur les BoNT, leur mécanisme d'action et sur leurs récepteurs neuronaux qui détermine
78 leur sélectivité d'action quasi exclusive sur les neurones. Nous commenterons rapidement
79 leur effet sur le système nerveux périphérique et les aspects fondamentaux à la base de
80 leur utilisation pour la prise en charge de la douleur. La littérature disponible étant très
81 vaste, seuls quelques articles originaux choisis et des articles de synthèse permettant
82 d'approfondir les propos sont cités (pour des revues générales voyez [4-8]).

83

84 **2. Les toxines botuliques**

85 **2.1. Les bactéries productrices de toxine botulique**

86 Les organismes qui produisent les toxine botulique (7 sérotypes majeurs) et leur
87 composant neuro-actif, la BoNT (7 toxinotypes majeurs) sont des bactéries anaérobies de
88 l'environnement. Bien que la production de BoNT ne semble pas apporter un quelconque
89 avantage aux bactéries qui la produisent, les gènes des BoNT se sont disséminés parmi
90 plus de 15 souches distinctes de bactéries anaérobies (principalement des *Clostridia* : *C.*
91 *botulinum*, *C. butyricum*, *C. baratii*, *C. argentinense*...) et aussi des bactéries aérobies
92 (pour revue [9]).

93

94 **2.2. La toxine botulique**

95 Les souches neurotoxigènes de *Clostridium* produisent généralement un seul
96 sous-type de BoNT (~150 kDa) et des protéines non toxiques (dites parfois protéines non-
97 toxiques associées (NAPs) en nombre variable suivant les souches bactériennes et les
98 conditions de culture. Il s'agit des protéines NTNH (pour non-toxique non-
99 hémagglutinante) et des protéines HA (en raison de leur propriété hémagglutinante qui est
100 un artefact de laboratoire). Dans certaines souches neurotoxigène de *Clostridium*, les
101 gènes codants pour les HA sont remplacés par des gènes codants d'autres protéines
102 (gènes *orfX*). L'existence de ces nouvelles NAPs (non-HA) a été confirmée
103 récemment [10].

104

105 Les protéines BoNT, NHHH et HA s'associent pour former la toxine botulique (dite
106 toxine progénitrice). NHHH et HA sont présentes notamment dans la plupart des
107 formulations commerciales de toxines de type A (AbobotulinumtoxinA,
108 OnobotulinumtoxinA) et B (RimabotulinumtoxinB) à l'exception de IncobotulinumtoxinA qui
109 est basée sur de la BoNT/A purifiée. ; Les NAPs non-HA s'associent avec le dimère
110 BoNT/NTNH, plus fréquemment avec la BoNT/E que la BoNT/A [10].

111

112 NTHN est la seule des protéines non-toxiques à être produite dans une
113 stœchiométrie stricte de 1:1 avec la BoNT. En effet, les gènes de BoNT et de NTNH sont
114 localisés sur le même opéron. La protéine NTNH dérive ancestralement d'une BoNT tant
115 par sa séquence en acides aminés que par sa structure tridimensionnelle. Néanmoins des
116 mutations lui ont fait perdre toute activité biologique sur les cellules [11]. Elle agit comme
117 une protéine chaperone qui protège la BoNT contre sa dégradation à pH acide ce qui
118 permet à la toxine (complexe toxinique) ingérée avec des aliments de traverser les étages
119 acides du tube digestif sans dégradation de la BoNT.

120

121 Des protéines dites hémagglutinantes (HA) peuvent être aussi produites avec la
122 BoNT et NTNH. Les protéines HA ont des propriétés de type adhésine leur permettant de
123 se lier à divers types cellulaires dont les cellules épithéliales du tube digestif (pour revue
124 [5, 12]).

125

126 L'association d'une BoNT avec une NTNH et éventuellement plusieurs des autres
127 protéines non-toxiques (HA) permet de former une large variété de complexes toxiques
128 qui diffèrent entre eux par leur composition en protéines et leur masse moléculaire. Le
129 plus petit complexe produit (M, ~290 kDa) correspond à un hétérodimère formé d'1 BoNT
130 associée à 1 NTNH. Le plus gros complexe connu a une masse moléculaire de 900 kDa
131 ([13]; pour revue [8]). La résolution de la structure tridimensionnelle du complexe botulique
132 a montré qu'il est composé de deux sous-complexes. Le premier est l'hétérodimère BoNT-
133 NTNH [11, 13]. Le second est un complexe stable en forme de triskelion comprenant
134 toutes les HA de la toxine (par exemple un dodécamère de 470 kDa) [13]).

135

136 **2.3 La toxine botulique se dissocie à pH neutre et libère la BoNT.**

137 Le complexe toxique est très stable à pH acide (3,5 - 6,8) mais dès qu'il est
138 soumis à un pH physiologique (proche de la neutralité, entre 6,8 et 7,4) les différentes
139 formes de complexe toxique se dissocient [11, 13-14]. La cinétique de dissociation est
140 très rapide : le temps de demi-vie du complexe de 900 kDa de la toxine botulique de type
141 A est d'environ 1 h à pH 6.6 et inférieur à 1 min à pH = 6.9 [14]. Ceci signifie que l'injection
142 du complexe toxique dans le tissu (par exemple le parenchyme musculaire) dont le pH
143 physiologique est voisin de 7,4 entraîne la dissociation quasi immédiate du complexe qui
144 libère ainsi sa seule entité neuroactive : la BoNT. Les autres protéines, NTNH et HA, n'ont

145 pas d'action sur les terminaisons nerveuses. Rien n'indique qu'elles puissent modifier la
146 dissémination intra-tissulaire de la BoNT.

147

148 Dans le contexte de l'utilisation médicale, que la formulation commerciale soit
149 basée sur un complexe toxinique ou sur de la BoNT purifiée, ne modifie pas la disponibilité
150 de la BoNT puisque le complexe toxinique se dissocie en moins d'une minute au pH
151 physiologique des tissus injectés.

152

153 **3. Les neurotoxines botuliques.**

154 Les neurotoxines botuliques (BoNT, 150 kDa) sont synthétisées dans la bactérie
155 sous la forme d'une protoxine simple chaîne (environ 1300 acides aminés pour la BoNT/A)
156 qui est secondairement clivée en une chaîne légère (L, ~50 kDa) et une chaîne lourde (H,
157 ~100 kDa) reliées entre elles par un pont disulfure. Seule la forme double chaîne est
158 biologiquement active. Ce sont des neurotoxines spécifiques des vertébrés (pour revue
159 [4]). Les BoNT actives sur l'Homme sont les types A, B, C, E et F. De toutes les
160 substances toxiques connues la BoNT de type A (BoNT/A) est la substance toxique la plus
161 puissante que l'on connaisse. Sa dose létale (en injection parentérale) est de l'ordre de
162 0,2–0,3 ng/kg chez la souris et 1 ng/kg chez l'Homme (pour revue [15]).

163

164 La structure tridimensionnelle d'une première BoNT a été résolue il y a plus de 20
165 ans [16]. Globalement toutes les BoNT adoptent une organisation fonctionnelle semblable
166 (Fig. 1A). Cependant, celle de la BoNT/E diffère un peu de celle des BoNT/A et BoNT /B
167 (pour revue [17]). Toutes les BoNT sont organisées en trois grands domaines structuraux
168 distincts (Fig. 1A) : la chaîne L contient le domaine catalytique impliqué dans l'attaque
169 protéolytique des protéines SNARE (§4.4). La partie N-terminale de la chaîne H (H_N) est
170 impliquée dans le franchissement de la membrane vésiculaire (étape de translocation,

171 §4.3). La partie C-terminale de la chaîne H (H_C) est organisée en deux sous-domaines
172 distincts (H_{CN} et H_{CC}). Le domaine H_{CC} est impliqué dans la reconnaissance des
173 récepteurs membranaires (§4.2) des BoNT (pour revue [17-19]).

174

175 **4. Mécanismes moléculaires et cellulaires du blocage de la libération de** 176 **neurotransmetteur par la BoNT**

177 **4.1. Un mécanisme d'action global commun à toutes les BoNT**

178 Toutes les BoNT suivent un même mécanisme d'action comprenant 4 étapes i) la
179 liaison membranaire, ii) internalisation par endocytose, iii) translocation du domaine
180 catalytique dans le cytosol et iv) action intra-neuronale (Fig. 1B). De façon générale, à
181 chaque grande étape de son mécanisme d'action correspond l'intervention d'un domaine
182 particulier de sa structure. Tout ce qui a été établi du mode d'action cellulaire et
183 moléculaire des toxines botuliques, l'a été en utilisant des BoNT purifiées produites la
184 souche Hall A de *C. botulinum* (ATCC3502 ; qui est à l'origine notamment des produits
185 commerciaux approuvés en Europe AbobotulinumtoxinA, OnabotulinumtoxinA et
186 IncobotulinumtoxinA, ou de souches très proches (par exemple la souche NCTC7272), ou
187 de la toxine de type B produite par la souche de référence *bean* à l'origine de
188 RimabotulinumtoxinB. Donc, les mécanismes d'action cellulaire et moléculaire des BoNT
189 décrits ici s'appliquent aussi aux formulations commerciales.

190 **Figure 1 à placer ici**

191 **4.2 Liaison membranaire et identité des récepteurs membranaires.**

192 4.2.1 La liaison à haute affinité des BoNT à la membrane implique deux types de
193 corécepteurs.

194 La liaison de la BoNT à la membrane neuronale (Fig. 1Ba) implique le domaine le
195 plus C-terminal (H_{CC}) de sa chaîne lourde (pour revues [18-19]). Récemment le domaine
196 H_{CN} a aussi été impliqué dans la liaison de la BoNT [20]. La liaison des BoNT à la

197 membrane neuronale implique deux types de co-récepteurs, un polysialo-ganglioside et
198 une protéine [21]. Les premiers récepteurs proposés pour les BoNT sont des poly-sialo-
199 gangliosides (GD1a, GD1b et GT1b) présents dans tous les tissus des vertébrés mais
200 nettement plus abondants à la surface des cellules neuronales [22]. Les BoNT (mis à part
201 la BoNT/C) reconnaissent avec une haute affinité le domaine extracellulaire d'une protéine
202 exposée en surface des terminaisons nerveuses lors de l'exocytose des
203 neurotransmetteurs.

204

205 4.2.2 La synaptotagmine est un récepteur protéique pour la BoNT/B

206 Les synaptotagmines I et II (Syt I, Syt II) servent de récepteur protéique aux
207 BoNT/B, /DC et /G (pour revue [8, 18-19]). Les Syt-I et Syt-II détectent l'élévation de la
208 concentration calcique et répondent à ce signal en déclenchant les dernières étapes de
209 fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique synaptiques (pour revue
210 [23]). L'interaction de la BoNT/B avec Syt-II est très fortement augmentée par la liaison
211 simultanée à un poly-sialo-gangliosides [24]. Syt-I est largement distribué dans tous les
212 types de neurones alors que Syt-II est exprimé dans des populations neuronales limitées,
213 notamment les motoneurones [25].

214

215 4.2.3 La glycoprotéine SV2 est un récepteur protéique pour la BoNT/A

216 La glycoprotéine SV2 (Synaptic Vesicle protein 2 ; trois paralogues A, B et C) sert
217 de récepteur protéique aux BoNT/A, /E, et /F (pour revue [8, 18-19]). La N-glycosylation
218 des isoformes de SV2 augmentent l'affinité des BoNT pour cette protéine [26-27]. Ceci
219 pourrait expliquer pourquoi la présence de poly-sialo-gangliosides n'a pas d'effet
220 potentialisateur sur la liaison de BoNT/A à SV2C, car le résidu sucré nécessaire semble
221 apporté par la N-glycosylation de SV2 [24, 28]. SV2 est présente dans la membrane des
222 vésicules de sécrétion de tous les neurones et cellules neuroendocrines mais pas des

223 cellules exocrines (pour revue [29]). La BoNT/A a une meilleure affinité pour SV2C (par
224 rapport à SV2A et SV2B) qui est le paralogue principalement exprimé dans les
225 terminaisons nerveuses motrices [30]. SV2A est exprimée dans le système nerveux
226 périphérique humain, autonome et intestinal [31].

227

228 **4.3. Internalisation et translocation des BoNT**

229 4.3.1 Internalisation.

230 Lors de l'exocytose, la face interne des vésicules synaptiques est exposée à la
231 surface des terminaisons neuronales permettant la liaison des BoNT. Le recyclage, par
232 endocytose, des vésicules synaptiques vides provoque l'internalisation (Fig. 1Ba) des
233 molécules de BoNT [32-33]. Les BoNT peuvent aussi entrer dans les terminaisons
234 neuronales par d'autres voies d'endocytose [34]. A ce stade les molécules de BoNT n'ont
235 pas d'activité biologique car elles sont confinées dans la lumière des vésicules recyclées
236 ou des endosomes.

237

238 4.3.2 Translocation de la chaîne L dans la terminaison nerveuse où elle a été
239 capturée.

240 La translocation de chaîne L des BoNT dans le compartiment cytoplasmique (Fig.
241 1Bb) est provoquée par l'acidification de la lumière vésiculaire due à l'activité de l'ATPase
242 vacuolaire. Le gradient de protons (ions H⁺) ainsi établi est nécessaire au fonctionnement
243 des transporteurs vésiculaires aux neurotransmetteurs qui re-remplissent les vésicules
244 synaptiques recyclées. Cette même acidification de la lumière vésiculaire provoque deux
245 phénomènes [35] :

246 1) La chaîne L de la BoNT perd sa structure tertiaire globulaire en se linéarisant et
247 perd l'atome de zinc de son site catalytique.

248 2) Le domaine H_N de sa chaîne lourde s'insère dans la bicouche lipidique de la
249 membrane vésiculaire formant une sorte de pore par lequel la chaîne L
250 linéarisée gagne le compartiment cytosolique.

251 En même temps, le pont disulfure reliant les deux chaînes est réduit ce qui sépare la
252 chaîne L de la chaîne H. Une fois dans le cytosol, la chaîne L diffuse librement dans le
253 cytosol (pH neutre) et retrouve sa structure tertiaire et réacquiert l'atome de zinc
254 nécessaire à son activité enzymatique

255

256 4.3.3 Les BoNT peuvent accéder au système nerveux central par transport
257 rétrograde axonal.

258 La masse moléculaire (150kDa) ne permet pas aux BoNT de franchir les jonctions
259 serrées de l'endothélium vasculaire qui forment la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE)
260 (pour revue [4-5]). Quand elles sont appliquées en périphérie, leur action est limitée aux
261 terminaisons nerveuses du système nerveux périphérique (moteur, autonome, intestinal,
262 et terminaisons nerveuses sensibles). Néanmoins, une faible fraction des molécules de
263 BoNT entre dans les terminaisons nerveuses par une voie différente du recyclage des
264 vésicules synaptiques [34]. Les molécules de BoNT se retrouvent confinées dans des
265 cargos-vésiculaires à pH neutre (ce qui évite la translocation de leur chaîne L) qui
266 s'engagent dans la voie du transport axonal rétrograde [36] qui les amène dans les corps
267 cellulaires des motoneurones localisés dans la corne ventrale de la moelle épinière et
268 dans les corps cellulaires des neurones sensitifs localisés dans les ganglions spinaux ou
269 les ganglions trigéminalés ([37]; pour revue [38]). Quand de très fortes concentrations de
270 BoNT sont utilisées, de façon analogue à ce qui a été établi pour la toxine tétanique, les
271 molécules de BoNT capturées en périphéries peuvent être libérées dans l'espace
272 extracellulaire et re-capturées par les terminaisons nerveuses voisines (passage trans-
273 synaptique) ([39-40]; pour revue [38]).

274

275 **4.4 L'attaque protéolytique des protéines SNARE par la chaîne L de la BoNT**
276 **bloque la machinerie d'exocytose.**

277 La VAMP est une protéine intégrale de la membrane des vésicules synaptiques
278 contenant les neurotransmetteurs. La syntaxine est une protéine intégrale de la membrane
279 plasmique. La SNAP-25 est associée à la face interne de la membrane plasmique. Ces
280 trois protéines ont pour nom collectif SNARE. Quand une vésicule accoste un site de
281 fusion membranaire, les 3 SNARE s'associent pour former un complexe dont la
282 condensation induit la pré-fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique.
283 L'activation des canaux ioniques sélectifs aux ions Ca^{2+} par l'arrivée d'un potentiel d'action
284 provoque l'élévation de la concentration intra-terminale en Ca^{2+} . La liaison des ions Ca^{2+}
285 aux synaptotagmines associées au complexe SNARE déclenche l'achèvement du
286 processus de fusion des membranes plasmique et vésiculaire. Le contenu vésiculaire est
287 alors libéré dans l'espace synaptique (pour revue [23]).

288

289 Quel que soit leur type, les BoNT bloque la libération de neurotransmetteur par une
290 action cytosolique [41]. Leur chaîne L est une métallo-protéase à zinc qui selon le
291 sérotype de toxine clive spécifiquement (Fig. 1Bc) une des trois protéines SNARE de la
292 machinerie d'exocytose. La BoNT/A attaque la protéine SNAP-25 [42], la BoNT/B clive les
293 VAMP-1 et VAMP-2 [43]. La BoNT/C attaque la syntaxine-1. Les BoNT/D, /F, et /G
294 attaquent les VAMP 1 et 2 en des sites distincts de celui clivé par la BoNT/B. La protéine
295 SNAP-25 est clivée par les BoNT/C et /E. D'autres isoformes des SNARE sont aussi
296 clivées par les BoNT. Des mutations ponctuelles peuvent conférer, chez certains
297 vertébrés, la résistance au clivage de certaines isoformes de SNARE (pour revue [8]).

298

299 Le clivage de SNAP-25 par la BoNT/A n'empêche pas son association aux autres
300 SNARE (VAMP et syntaxine) mais le seuil de déclenchement de la fusion vésiculaire en
301 réponse à l'entrée des ions Ca^{2+} est très fortement augmenté [44]. Le clivage de la VAMP
302 par la BoNT/B ne permet pas de former un complexe liant la vésicule synaptique à la
303 membrane (pour revue [4].

304

305 **4.5 Durée du blocage de la libération des neurotransmetteurs.**

306 La durée du blocage de la libération de neurotransmetteurs provoquée par les BoNT varie
307 avec le toxinotype considéré (très longue pour la BoNT/A et courte pour la BoNT/E) et
308 principalement déterminé par la durée de vie intracellulaire de leur chaîne L [45]. Tant que
309 toutes les molécules de la chaîne L de BoNT ne sont pas éliminées du cytosol neuronal,
310 elles clivent leur SNARE cible au fur et à mesure qu'il est apporté à la terminaison
311 empoisonnée. Ainsi la SNAP-25 clivée est détectée dans le muscle *detrusor* pendant
312 plusieurs mois après l'injection de BoNT/A [46]. La rémanence dans le cytosol des
313 fragments de SNARE clivés participe aussi au maintien du blocage de l'exocytose ([47];
314 pour revue [4, 6]).

315 La durée de vie cytosolique des chaînes L de BoNT est déterminée par la vitesse à
316 laquelle elles sont ubiquitinylées et dirigées vers le protéasome pour y être dégradées [48-
317 49]. Les déterminants moléculaires impliqués ont été identifiés [49-50] et il est possible
318 de modifier leur durée de vie en introduisant des mutations dans ces séquences [51].
319 Dans le cas de la BoNT/A, la chaîne L interagit avec une dés-ubiquitine ligase qui
320 empêche son ubiquitinylation durable et prévient ainsi son entrée dans le protéasome [49,
321 52] ce qui lui permet d'inhiber la libération de neurotransmetteur pendant plusieurs
322 semaines à plusieurs mois.

323

324 **5 Les BoNT ne sont pas spécifiques de la transmission cholinergique et n'ont**
325 **pas de spécificité absolue pour les terminaisons neuronales.**

326

327 **5.1 Les BoNT peuvent agir sur des cellules non neuronales**

328 L'action des BoNT sur nombre de cellules non neuronales a été rapportée (pour
329 revue [53]). Ces cellules parfois expriment les protéines SV2 et synaptotagmine et sont
330 toutes équipées d'une machinerie d'exocytose utilisant des SNARE clivables par les BoNT
331 (par exemple les kératinocytes de l'épiderme; les cellules de la muqueuse nasale; les
332 cellules de l'urothelium, voire des cellules impliquées dans les réactions inflammatoires,
333 etc.) (pour revue [53]). L'absence des récepteurs protéiques peut être compensée par la
334 seule présence sur la membrane des poly-sialo -gangliosides (GD1a, GD1b, GT1b) qui
335 permettent d'assurer une liaison membranaire et l'internalisation des BoNT [54-55].

336

337 **5.2 Les BoNT bloquent l'exocytose de nombreuses molécules.**

338 Comme les SNARE ciblés par les BoNT sont impliqués dans la libération de
339 nombreux transmetteurs, les BoNT bloquent l'exocytose de nombreuses molécules
340 comme l'acétylcholine, le glutamate, la glycine, le GABA, des catécholamines, des
341 purines, des peptides comme le CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide), la substance P
342 ainsi que l'insertion par exocytose de récepteurs membranaires (pour revue [56]). Des
343 exemples sont donnés au §6. Si une molécule n'est pas libérée par exocytose, sa
344 libération n'est pas sensible à l'action des BoNT. Ainsi, la libération de l'ATP cytosolique
345 par l'ouverture des héli-canaux ou pannexons membranaires [57] est insensible aux
346 BoNT alors qu'elle est inhibée par cette neurotoxine quand l'ATP est stocké dans des
347 vésicules synaptiques avec d'autres transmetteurs [58].

348

349 **6 L'action sur le système nerveux périphérique des BoNT injectées en périphérie.**

350

351 6.1 Système moteur, autonome et sensitif.

352 6.1.1 Effets sur le muscle

353 Les BoNT sont utilisées dans nombre d'indications par injection dans un muscle ou
354 dans une glande. Alors que chez les rongeurs les BoNT/A et BoNT/B sont équipotentes, la
355 BoNT/A s'avère nettement plus efficace que la BoNT/B pour induire une myorelaxation
356 chez l'humain (facteur ~40 [59]). Les terminaisons des motoneurones expriment fortement
357 Syt-II, ainsi que Syt-I (§4.2.2). Une mutation ponctuelle de la Syt-II humaine [60] réduit
358 l'affinité de la BoNT/B pour cette protéine. Par ingénierie moléculaire du domaine de
359 liaison H_{CC} de la BoNT/B, il a été possible de créer une BoNT/B modifiée à forte affinité
360 pour la Syt-II humaine [61]. Chez l'humain, la BoNT/B conserve une forte affinité pour la
361 Syt-I qui est exprimée par les terminaisons de tous les neurones (§4.2.2). Ceci explique
362 que les fortes doses de BoNT/B nécessaires pour obtenir une myorelaxation chez
363 l'homme peuvent provoquer des manifestations dys-autonomiques ([59]; pour revue [62]).

364

365 Le blocage de la libération d'acétylcholine à la jonction neuromusculaire est
366 accompagné de l'inhibition de la libération de CGRP [63], voire de l'agrine, ce qui induit
367 une forte atrophie des fibres musculaires squelettiques (pour revue [64]). L'atrophie des
368 fibres musculaires réduit fortement la force de contraction musculaire [1].

369

370 Les fibres motrices cholinergiques innervant les fuseaux intramusculaires sont
371 sensibles aux BoNT [65]. Néanmoins, la capsule fusale agit comme une barrière de
372 diffusion qui les expose moins à l'action inhibitrices des BoNT. De façon générale, près
373 une injection intramusculaire de BoNT, la proprioception musculaire est fortement modifiée
374 (pour revue [66]). Certains des effets centraux des BoNT pourraient donc résulter de la
375 modification des informations proprioceptives.

376

377 6.1.2 Effets généraux sur le système nerveux autonome

378 Les BoNT sont capturées par les terminaisons cholinergiques pré- et post
379 ganglionnaires du système nerveux autonome parasympathique et sympathique, affectant
380 ainsi la contraction des muscles lisses, la sécrétion par de nombreuses glandes exocrines,
381 et produisant des manifestations dys-autonomiques (pour revue [62, 67]). Ceci a donné
382 lieu à de nombreuses applications médicales.

383

384 6.1.3 L'effet bénéfique des BoNT en urologie démontre leur action sur des
385 terminaisons motrices et sensibles.

386 L'utilisation médicale de la BoNT en urologie (pour revue [68]) illustre comment ces
387 toxines peuvent être utilisées dans un but de myorelaxation et pour remodeler les
388 informations sensorielles. L'injection de BoNT/A dans le muscle *detrusor* produit une
389 diminution de la libération –selon les terminaisons nerveuses affectées- d'acétylcholine,
390 d'ATP, de substance P, de CGRP, et partiellement de β -NAD [69-71], s'ajoute aussi la
391 diminution de l'insertion membranaire par exocytose des récepteurs à l'ATP P2X3 et du
392 récepteur TRPV1 (récepteur multivalent servant de récepteur de la capsaïcine), tous deux
393 impliqués dans la nociception [58, 72]. L'activité inhibitrice de BoNT/A sur le réseau
394 sensitif contribue à la fois à l'effet myorelaxant vésical et au soulagement des symptômes
395 sensoriels et hyperalgiques chez les patients présentant un dysfonctionnement vésical ;
396 de plus la BoNT pourrait aussi agir sur les cellules de l'urothelium [68, 69, 74-75]. Une
397 partie des effets bénéfiques pourraient résulter d'une action dans le système nerveux
398 central après transport axonal rétrograde de la BoNT [37].

399 **6.2 Les effets anti-nociceptifs des BoNT.**

400 6.2.1 Rappels sur les neurones sensitifs.

401 Les corps cellulaires des neurones sensitifs et nociceptifs primaires innervant un
402 territoire périphérique sont localisés soit dans les ganglions spinaux (dits aussi ganglions
403 rachidiens) soit dans des ganglions céphaliques sensitifs (ex : ganglion du nerf trijumeau)
404 et sont protégés de la dissémination hématogène des BoNT par la BHE. Ces neurones ont
405 un axone à deux branches (axone en T, Fig. 2A) dont l'une innerve un territoire en
406 périphérie alors que l'autre projette dans les étages supérieurs du système nerveux
407 central (par exemple les couches supérieures de la corne dorsale de la moelle épinière).
408 Leur branche périphérique est un axone qui véhicule des informations ascendantes vers le
409 corps cellulaire mais ses terminaisons nerveuses peuvent libérer des neurotransmetteurs
410 par exocytose en réponse à une stimulation locale.

411 Les effets antalgiques des BoNT et les mécanismes impliqués ont fait l'objet de
412 revues [3, 76-77]; voyez aussi les contributions de Danièle Ranoux et de Nadine Attal
413 dans ce volume). Globalement la BoNT n'affecte pas directement les informations
414 sensibles à l'exception de celles véhiculées par les neurones nociceptifs primaires
415 suggérant que ces derniers sont des cibles privilégiées pour les BoNT (pour revue [77]).
416 Notamment ils expriment SV2A qui sert de récepteur protéique de la BoNT/A [31].

417

418 6.2.2 Effet antalgique indirect

419 L'effet myorelaxant et principalement atrophique (§6.1.1) de la BoNT/A injectée en
420 intramusculaire peut induire une diminution de la douleur liée à l'hyper-contraction d'un
421 muscle (cf. spasticité), d'un muscle hyper-sollicité comprimé dans ses aponévroses non-
422 extensibles (ex : syndrome des loges) ou des muscles comprimant un tronc nerveux
423 comme le syndrome du muscle *piriformis* (pour revue [3]).

424

425 6.2.3 Effet inhibiteur de l'inflammation neurogène

426 En réponse à des stimuli locaux (chute du pH, libération de bradykinine, d'ATP, de
427 prostaglandine E), les récepteurs des terminaisons périphériques des neurones
428 nociceptifs sont activés et produisent une dépolarisation locale donnant lieu
429 éventuellement à des potentiels d'actions propagés vers le corps cellulaire ganglionnaire.
430 La stimulation de la terminaison périphérique nociceptive provoque une augmentation
431 locale de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} qui déclenchent la libération de différents
432 transmetteurs (glutamate, substance P, CGRP) qui stimulent les cellules environnantes
433 (cellules de l'endothélium des capillaires, plaquettes sanguines, mastocytes...). Celles-ci,
434 répondent par une libération de bradykinine, de sérotonine, d'histamine qui stimulent les
435 terminaisons nociceptives. Ainsi s'amorce un effet auto-entretenu : l'inflammation
436 neurogène. Chez le rat, la BoNT injectée en sous-cutané est capturée par les
437 terminaisons nociceptives (Fig. 2Aa) où elle bloque l'exocytose de glutamate, de
438 substance P et de CGRP. Ceci interrompt la boucle d'inflammation neurogène ([78-79];
439 pour revue [76-77]).

440

441 **Figure 2 à ce niveau**

442

443

6.2.4 Effet de la BoNT sur les neurones nociceptifs périphériques

444 L'effet anti-nociceptif de la BoNT injectée en périphérie est corrélé à la détection
445 des SNARE clivés dans les corps cellulaires de neurones nociceptifs périphériques suite
446 au transport axonal rétrograde de BoNT dans la branche sensitive périphérique (Fig.2Ab
447 et 2B). Il n'est pas clairement établi que la BoNT poursuive son transport dans la branche
448 centrale des neurones sensitifs [37] et si elle est suffisante pour agir sur les terminaisons
449 nerveuses centrales des neurones ganglionnaires (pour revue [77]). La SNAP25 clivée par
450 la BoNT/A ou les fragments de VAMP clivée par la BoNT/B a été détectée dans le noyau
451 trigéminal *caudalis*, mais pas dans les noyaux nociceptifs supérieurs [80-81]. L'effet anti-

452 nociceptif de la BoNT/A est associé à la réduction de l'expression membranaire (par
453 blocage de leur insertion membranaire par exocytose, Fig. 2B) de récepteurs tels que
454 TRPV1 (récepteur de la capsaïcine) [80, 82-83] ou P2X3 (un récepteur aux purines) [84]
455 dans les terminaisons nerveuses nociceptives périphériques et dans les ganglions qui
456 contiennent les corps cellulaires des neurones nociceptifs. Ces résultats ressemblent à ce
457 qui a été rapporté pour les neurones sensitifs de la vessie (§6.1.3). Comme la stimulation
458 des récepteurs TRPV1 conduit notamment à l'exocytose de CGRP (Fig. 2B), l'action
459 réductrice de la BoNT sur leur densité membranaire est synergique de l'action inhibitrice
460 qu'elle produit aussi sur l'exocytose du CGRP et de substance P (BoNT/A : [83, 85-86];
461 BoNT/B : [81]). Toutes ces observations montrent qu'une fraction des molécules de BoNT
462 capturées par les terminaisons nerveuses périphériques des neurones nociceptifs est
463 transportée de façon rétrograde (cf. §6.3.3) vers le corps cellulaire des neurones où elles
464 agissent concourant à modifier les informations nociceptives ascendantes.

465

466 6.2.5 La question des effets centraux directs de la BoNT demeure ouverte

467 L'injection périphérique unilatérale de BoNT/A produit un effet anti-nociceptif
468 bilatéral apparaissant quelques jours après l'injection (pour revue [76-77]). Le blocage du
469 transport axonal par la colchicine empêche le développement de cet effet [87] suggérant
470 que l'action anti-nociceptive bilatérale est due à l'action inhibitrice de la BoNT sur des
471 synapses du réseau neuronal spinal ([88]; pour revue [76-77]). Alors que le transport
472 rétrograde de BoNT dans la branche périphérique des neurones ganglionnaires est
473 démontré (§4.3.3 ; §6.2.4), le transport orthograde de BoNT dans la branche centrale des
474 neurones ganglionnaires ne l'est pas très clairement ([37]; pour revue [77]), peut être en
475 raison d'une sensibilité insuffisante des systèmes de détection de la BoNT. Aucune voie
476 directe avec une projection contra-latérale n'a été décrite pour les neurones nociceptifs
477 périphériques. De ce fait, l'effet anti-nociceptif contra-latéral nécessiterait le

478 franchissement de plusieurs synapses par les BoNT, mais au prix d'une « dilution » des
479 molécules de BoNT dans le réseau nerveux comme cela est observé avec la toxine
480 tétanique [89]. Le franchissement trans-synaptique entre un neurone post-synaptique et le
481 neurone présynaptique afférent par la BoNT été démontré dans le système nerveux
482 central [39] mais en utilisant de très fortes doses de BoNT incompatibles avec les
483 utilisations médicales. Le transport trans-synaptique d'un neurone présynaptique vers un
484 neurone post-synaptique n'a pas été démontré. De façon générale, le transport
485 contralatéral de BoNT n'est pas nécessaire pour expliquer les effets contralatéraux (pour
486 revue [77]).

487

488 **7 Conclusions**

489 Les effets bénéfiques produits par la BoNT injectée en périphérie sont
490 essentiellement dus à son action inhibitrice sur la libération de neurotransmetteur par les
491 terminaisons nerveuses voisines du site où elle a été injectée. Une partie de la BoNT
492 appliquée en périphérie, est transportée dans les ganglions spinaux et céphaliques qui
493 sont protégés par la BHE. Est-ce le cas aux concentrations thérapeutiques? Il n'est pas
494 établi que la BoNT soit transportée au-delà des ganglions et atteigne les terminaisons
495 nerveuses nociceptives faisant des synapses avec des neurones d'ordre supérieur.
496 Néanmoins, la BoNT injectée en périphérie induit des manifestations d'origine
497 « centrale ». Est-ce dû à son action protéolytique contre les SNARE dans les ganglions
498 sensitifs? Les applications de la BoNT (§6.1) montrent que le blocage de la
499 neurotransmission dans un territoire périphérique (induisant par exemple une
500 myorelaxation) modifie les informations sensibles remontées au système nerveux central.
501 Donc, sans exclure la possibilité d'une action directe de la BoNT injectée en périphérie
502 dans les neurones ganglionnaires sensitifs voire dans les synapses centrales sensitives
503 primaires, une partie des effets bénéfiques observés résulte le plus vraisemblablement du

504 traitement central d'informations proprioceptives, sensibles, et nociceptives modifiées par
505 l'action périphérique et ganglionnaires des BoNT.

506

507 **Liste des références citées**

508

509 [1] Scott AB. Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus. Trans Am
510 Ophthalmol Soc 1981;79:734-70.

511 [2] Jankovic J. Botulinum toxin: State of the art. Mov Disord 2017;32:1131-38.

512 [3] Safarpour Y, Jabbari B. Botulinum toxin treatment of pain syndromes -an evidence
513 based review. Toxicon 2018;147:120-8.

514 [4] Poulain B, Popoff MR, Molgo J. How do the botulinum neurotoxins block
515 neurotransmitter release: from botulism to the molecular mechanism of action. Botulinum
516 J. 2008;1:14-87.

517 [5] Simpson L. The life history of a botulinum toxin molecule. Toxicon 2013;68:40-59.

518 [6] Pantano S, Montecucco C. The blockade of the neurotransmitter release apparatus
519 by botulinum neurotoxins. Cell Mol Life Sci 2014;71:793-811.

520 [7] Pirazzini M, Rossetto O, Eleopra R, Montecucco C. Botulinum Neurotoxins: Biology,
521 Pharmacology, and Toxicology. Pharmacol Rev 2017, 69:200-35.

522 [8] Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, Austin JW, Bano L, Bradshaw M et al. Historical
523 Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. Toxins
524 (Basel) 2017;9 pii: E38. doi: 10.3390/toxins9010038.

- 525 [9] Poulain B, Popoff MR. Why Are Botulinum Neurotoxin-Producing Bacteria So
526 Diverse and Botulinum Neurotoxins So Toxic? *Toxins (Basel)* 2019;11 pii: E34. doi:
527 10.3390/toxins11010034.
- 528 [10] Kalb SR, Baudys J, Smith TJ, Smith LA, Barr JR. Characterization of Hemagglutinin
529 Negative Botulinum Progenitor Toxins. *Toxins (Basel)* 2017;9 pii: E193. doi:
530 10.3390/toxins9060193.
- 531 [11] Gu S, Rumpel S, Zhou J, Strotmeier J, Bigalke H, Perry K et al. Botulinum
532 neurotoxin is shielded by NTNHA in an interlocked complex. *Science* 2012;335:977-81.
- 533 [12] Fujinaga Y, Popoff MR. Translocation and dissemination of botulinum neurotoxin
534 from the intestinal tract. *Toxicon* 2018;147:13-8.
- 535 [13] Lee K, Gu S, Jin L, Le TT, Cheng LW, Strotmeier J, et al. Structure of a bimodular
536 botulinum neurotoxin complex provides insights into its oral toxicity. *PLoS Pathog*
537 2013;9:e1003690.
- 538 [14] Eisele KH, Fink K, Vey M, Taylor HV. Studies on the dissociation of botulinum
539 neurotoxin type A complexes *Toxicon* 2011;57:555-65.
- 540 [15] Johnson EA. Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits and nature's most
541 toxic proteins. *Annu Rev Microbiol* 1999;53:551-75.
- 542 [16] Lacy DB, Tepp W, Cohen AC, DasGupta BR, Stevens RC. Crystal structure of
543 botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol* 1998;5:898-902.
- 544 [17] Swaminathan S. Molecular structures and functional relationships in clostridial
545 neurotoxins. *Febs J* 2011;278:4467-85.

- 546 [18] Rummel A. Two Feet on the Membrane: Uptake of Clostridial Neurotoxins. *Curr Top*
547 *Microbiol Immunol* 2017;406:1-37.
- 548 [19] Rossetto O. The binding of botulinum neurotoxins to different peripheral neurons.
549 *Toxicon* 2018;147:27-31.
- 550 [20] Wang J, Meng J, Nugent M, Tang M, Dolly JO. Neuronal entry and high
551 neurotoxicity of botulinum neurotoxin A require its N-terminal binding sub-domain. *Sci Rep*
552 2017;7:44474. doi: 10.1038/srep44474.
- 553 [21] Montecucco C. How do tetanus and botulinum toxins to neuronal membranes?
554 *TIBS* 1986;11:314-17.
- 555 [22] Schnaar RL. Gangliosides of the Vertebrate Nervous System. *J Mol Biol* 2016;428:
556 3325-36.
- 557 [23] Jahn R, Fasshauer D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic
558 vesicles. *Nature* 2012;490:201-07.
- 559 [24] Desplantes R, Leveque C, Muller B, Lotierzo M, Ferracci G, Popoff M et al. Affinity
560 biosensors using recombinant native membrane proteins displayed on exosomes:
561 application to botulinum neurotoxin B receptor. *Sci Rep* 2017;7:1032. doi:
562 10.1038/s41598-017-01198-1.
- 563 [25] Pang ZP, Melicoff E, Padgett D, Liu Y, Teich AF, Dickey BF et al. Synaptotagmin-2
564 is essential for survival and contributes to Ca²⁺ triggering of neurotransmitter release in
565 central and neuromuscular synapses. *J Neurosci* 2006;26:13493-504.
- 566 [26] Benoit RM, Frey D, Hilbert M, Kevenaar JT, Wieser MM, Stirnimann CU et al.
567 Structural basis for recognition of synaptic vesicle protein 2C by botulinum neurotoxin A.
568 *Nature* 2014;505:108-11.

- 569 [27] Yao G, Zhang S, Mahrhold S, Lam KH, Stern D, Bagramyan K et al. N-linked
570 glycosylation of SV2 is required for binding and uptake of botulinum neurotoxin A. *Nat*
571 *Struct Mol Biol* 2016;23:656-62.
- 572 [28] Weisemann J, Stern D, Mahrhold S, Dorner BG, Rummel A. Botulinum Neurotoxin
573 Serotype A Recognizes Its Protein Receptor SV2 by a Different Mechanism than
574 Botulinum Neurotoxin B Synaptotagmin. *Toxins (Basel)* 2016;8 pii: E154. doi:
575 10.3390/toxins8050154.
- 576 [29] Bartholome O, Van den Ackerveken P, Sanchez Gil J, de la Brassinne Bonardeaux
577 O, Leprince P, Franzen R, Rogister B. Puzzling Out Synaptic Vesicle 2 Family Members
578 Functions. *Front Mol Neurosci* 2017;10:148. doi: 10.3389/fnmol.2017.00148. eCollection
579 02017.
- 580 [30] Dong M, Yeh F, Tepp WH, Dean C, Johnson EA, Janz R, Chapman ER. SV2 Is the
581 Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A. *Science* 2006;312:592-6.
- 582 [31] Yiangou Y, Anand U, Otto WR, Sinisi M, Fox M, Birch R et al. Increased levels of
583 SV2A botulinum neurotoxin receptor in clinical sensory disorders and functional effects of
584 botulinum toxins A and E in cultured human sensory neurons. *J Pain Res* 2011 ;4:347-55.
- 585 [32] Verderio C, Grumelli C, Raiteri L, Coco S, Paluzzi S, Caccin P et al. Traffic of
586 botulinum toxins A and E in excitatory and inhibitory neurons. *Traffic* 2007;8:142-53.
- 587 [33] Colasante C, Rossetto O, Morbiato L, Pirazzini M, Molgo J, Montecucco C.
588 Botulinum Neurotoxin Type A is Internalized and Translocated from Small Synaptic
589 Vesicles at the Neuromuscular Junction. *Mol Neurobiol* 2013;48:120-7.

- 590 [34] Harper CB, Papadopoulos A, Martin S, Matthews DR, Morgan GP, Nguyen TH et al.
591 Botulinum neurotoxin type-A enters a non-recycling pool of synaptic vesicles. *Sci Rep*
592 2016;6:19654 doi: 10.1038/srep19654.
- 593 [35] Fischer A, Montal M. Crucial role of the disulfide bridge between botulinum
594 neurotoxin light and heavy chains in protease translocation across membranes. *J Biol*
595 *Chem* 2007;282:29604-11.
- 596 [36] Wang T, Martin S, Papadopoulos A, Harper CB, Mavlyutov TA, Niranjana D et al.
597 Control of autophagosome axonal retrograde flux by presynaptic activity unveiled using
598 botulinum neurotoxin type A. *J Neurosci* 2015;35:6179-94.
- 599 [37] Papagiannopoulou D, Vardouli L, Dimitriadis F, Apostolidis A. Retrograde transport
600 of radiolabelled botulinum neurotoxin type A to the CNS after intradetrusor injection in rats.
601 *BJU Int* 2016;117:697-704.
- 602 [38] Surana S, Tosolini AP, Meyer IFG, Fellows AD, Novoselov SS, Schiavo G. The
603 travel diaries of tetanus and botulinum neurotoxins. *Toxicon* 2018;147:58-67.
- 604 [39] Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M. Long-distance
605 retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci* 2008;28:3689-96.
- 606 [40] Restani L, Giribaldi F, Manich M, Bercsenyi K, Menendez G, Rossetto O et al.
607 Botulinum neurotoxins A and E undergo retrograde axonal transport in primary motor
608 neurons. *PLoS Pathog* 2012;8:e1003087.
- 609 [41] Poulain B, Tauc L, Maisey EA, Wadsworth JD, Mohan PM; Dolly JO.
610 Neurotransmitter release is blocked intracellularly by botulinum neurotoxin, and this
611 requires uptake of both toxin polypeptides by a process mediated by the larger chain. *Proc*
612 *Natl Acad Sci U S A* 1988;85:4090-4.

- 613 [42] Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, De Camilli P et al. Botulinum
614 neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 1993;365:160-3.
- 615 [43] Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta
616 BR, Montecucco C. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release
617 by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 1992;359:832-5.
- 618 [44] Sakaba T, Stein A, Jahn R, Neher E. Distinct kinetic changes in neurotransmitter
619 release after SNARE protein cleavage. *Science* 2005 ;309:491-4.
- 620 [45] Foran PG, Mohammed N, Lisk GO, Nagwaney S, Lawrence GW, Johnson E et al.
621 Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinum neurotoxin B, C1, E and F compared
622 with the long lasting type A. *J Biol Chem* 2003;278:1363-71.
- 623 [46] Schulte-Baukloh H, Zurawski TH, Knispel HH, Miller K, Haferkamp A, Dolly JO.
624 Persistence of the synaptosomal-associated protein-25 cleavage product after
625 intradetrusor botulinum toxin A injections in patients with myelomeningocele showing an
626 inadequate response to treatment. *BJU Int* 2007;100:1075-80.
- 627 [47] Megighian A, Zordan M, Pantano S, Scorzeto M; Rigoni M; Zanini D et al. Evidence
628 for a radial SNARE super-complex mediating neurotransmitter release at the *Drosophila*
629 neuromuscular junction. *J Cell Sci* 2013;126:3134-40.
- 630 [48] Tsai YC, Maditz R, Kuo CL, Fishman PS, Shoemaker CB, Oyler GA, Weissman
631 AM. Targeting botulinum neurotoxin persistence by the ubiquitin-proteasome system. *Proc*
632 *Natl Acad Sci U S A* 2010;107:16554-9.
- 633 [49] Pellett S, Bradshaw M, Tepp WH, Pier CL, Whitemarsh RCM, Chen C et al. The
634 Light Chain Defines the Duration of Action of Botulinum Toxin Serotype A Subtypes. *MBio*
635 2018;9:e00089-00018.

- 636 [50] Wang J, Zurawski TH, Meng J, Lawrence G, Olango WM, Finn DP et al. A dileucine
637 in the protease of botulinum toxin A underlies its long-lived neuroparalysis: transfer of
638 longevity to a novel potential therapeutic. *J Biol Chem* 2011;286:6375-85.
- 639 [51] Dolly JO, Wang J, Zurawski TH, Meng J. Novel therapeutics based on recombinant
640 botulinum neurotoxins to normalize the release of transmitters and pain mediators. *Febs J*
641 2011;278:4454-66.
- 642 [52] Tsai YC, Kotiya A, Kiris E, Yang M, Bavari S, Tessarollo L et al. Deubiquitinating
643 enzyme VCIP135 dictates the duration of botulinum neurotoxin type A intoxication. *Proc*
644 *Natl Acad Sci U S A* 2017;114:E5158-66.
- 645 [53] Grando SA, Zachary CB. The non-neuronal and nonmuscular effects of botulinum
646 toxin: an opportunity for a deadly molecule to treat disease in the skin and beyond. *Br J*
647 *Dermatol* 2018;178:1011-9.
- 648 [54] Marxen P, Fuhrmann U, Bigalke H. Gangliosides mediate inhibitory effects of
649 tetanus and botulinum A neurotoxins on exocytosis in chromaffin cells. *Toxicon*
650 1989;27:849-59.
- 651 [55] Connan C, Voillequin M, Varela Chavez C, Mazuet C, Leveque C, Vitry S, et al.
652 Botulinum Neurotoxin Type B Uses a Distinct Entry Pathway Mediated By Cdc42 Into
653 Intestinal Cells Versus Neuronal Cells. *Cell Microbiol* 2017 ;19:e12738.
- 654 [56] Popoff MR, Poulain B. Bacterial toxins and the nervous system: neurotoxins and
655 multipotential toxins interacting with neuronal cells. *Toxins (Basel)* 2010;2:683-737.
- 656 [57] Abudara V, Retamal MA, Del Rio R, Orellana JA. Synaptic Functions of
657 Hemichannels and Pannexons: A Double-Edged Sword. *Front Mol Neurosci* 2018;11:435,
658 10.3389/fnmol.2018.00435. eCollection 02018.

- 659 [58] Lawrence GW, Aoki KR, Dolly JO. Excitatory cholinergic and purinergic signaling in
660 bladder are equally susceptible to botulinum neurotoxin a consistent with co-release of
661 transmitters from efferent fibers. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 334:1080-6.
- 662 [59] Sloop RR, Cole BA, Escutin RO. Human response to botulinum toxin injection: type
663 B compared with type A. *Neurology* 1997;49:189-94.
- 664 [60] Peng L, Berntsson RP, Tepp WH, Pitkin RM, Johnson EA, Stenmark P, Dong M.
665 Botulinum neurotoxin D-C uses synaptotagmin I/II as receptors and human synaptotagmin
666 II is not an effective receptor for type B, D-C, and G toxins. *J Cell Sci* 2012;125:3233-42.
- 667 [61] Tao L, Peng L, Berntsson RP, Liu SM, Park S, Yu F et al. Engineered botulinum
668 neurotoxin B with improved efficacy for targeting human receptors. *Nat Commun* 2017;8:
669 53. doi: 10.1038/s41467-017-00064-y.
- 670 [62] Dressler D. Botulinum toxin therapy: its use for neurological disorders of the
671 autonomic nervous system. *J Neurol* 2013;260:701-13.
- 672 [63] Meunier FA, Colasante C, Faille L, Gastard M, Molgo J. Upregulation of calcitonin
673 gene-related peptide at mouse motor nerve terminals poisoned with botulinum type-A
674 toxin. *Pflugers Arch* 1996;431:R297-298.
- 675 [64] Cisterna BA, Cardozo C, Sáez JC. Neuronal involvement in muscular atrophy. *Front*
676 *Cell Neurosci* 2014;8:405. doi: 10.3389/fncel.2014.00405. eCollection 2014.
- 677 [65] Rosales RL, Arimura K, Takenaga S, Osame M. Extrafusal and intrafusal muscle
678 effects in experimental botulinum toxin-A injection. *Muscle Nerve* 1996;19:488-96.
- 679 [66] Rosales RL, Dressler D. On muscle spindles, dystonia and botulinum toxin. *Eur J*
680 *Neurol* 2010;17:71-80.

- 681 [67] Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. Current gaps in basic science knowledge
682 of botulinum neurotoxin biological actions. *Toxicon* 2015 ;107:59-63.
- 683 [68] Chancellor MB, Elovic E, Esquenazi A, Naumann M, Segal KR, Schiavo G et al.
684 Evidence-based review and assessment of botulinum neurotoxin for the treatment of
685 urologic conditions. *Toxicon* 2013;67:129-40.
- 686 [69] Rapp DE, Turk KW, Bales GT, Cook SP. Botulinum toxin type A inhibits calcitonin
687 gene-related peptide release from isolated rat bladder. *J Urol* 2006 ;175:1138-42.
- 688 [70] Coelho A, Cruz F, Cruz CD, Avelino A. Spread of onabotulinumtoxinA after bladder
689 injection. Experimental study using the distribution of cleaved SNAP-25 as the marker of
690 the toxin action. *Eur Urol* 2012;61:1178-84.
- 691 [71] Coelho A, Oliveira R, Cruz F, Cruz CD. Impairment of sensory afferents by
692 intrathecal administration of botulinum toxin A improves neurogenic detrusor overactivity in
693 chronic spinal cord injured rats. *Exp Neurol* 2016 ;285:159-66.
- 694 [72] Liu HT, Chen SH, Chancellor MB, Kuo HC. Presence of Cleaved Synaptosomal-
695 Associated Protein-25 and Decrease of Purinergic Receptors P2X3 in the Bladder
696 Urothelium Influence Efficacy of Botulinum Toxin Treatment for Overactive Bladder
697 Syndrome. *PLoS One* 2015;10:e0134803.
- 698 [73] Dolly JO, Lawrence GW. Molecular basis for the therapeutic effectiveness of
699 botulinum neurotoxin type A. *Neurourol Uodyn* 2014;33 Suppl 3:S14-20.
- 700 [74] Coelho A, Oliveira R, Rossetto O, Cruz CD, Cruz F, Avelino A. Intrathecal
701 administration of botulinum toxin type A improves urinary bladder function and reduces
702 pain in rats with cystitis. *Eur J Pain* 2014;18:1480-9.

- 703 [75] Ikeda Y, Zabbarova IV, Birder LA, de Groat WC, McCarthy CJ, Hanna-Mitchell AT,
704 Kanai AJ. Botulinum neurotoxin serotype A suppresses neurotransmitter release from
705 afferent as well as efferent nerves in the urinary bladder. *Eur Urol* 2012;62:1157-64.
- 706 [76] Matak I, Lacković Z. Botulinum toxin A, brain and pain. *Prog Neurobiol* 2014;119-
707 120:39-59.
- 708 [77] Matak I, Bölcseki K, Bach-Rojecky L, Helyes Z. Mechanisms of Botulinum Toxin
709 Type A Action on Pain. *Toxins (Basel)* 2019;11. pii: E459.
- 710 [78] Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR. Subcutaneous administration of botulinum
711 toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain* 2004;107:125-33.
- 712 [79] Meng J, Wang J, Lawrence G, Dolly JO. Synaptobrevin I mediates exocytosis of
713 CGRP from sensory neurons and inhibition by botulinum toxins reflects their anti-
714 nociceptive potential. *J Cell Sci* 2007;120:2864-74.
- 715 [80] Matak I, Rossetto O, Lacković Z. Botulinum toxin type A selectivity for certain types
716 of pain is associated with capsaicin-sensitive neurons. *Pain* 2014;155:1516-26.
- 717 [81] Meng J, Dolly JO, Wang J. Selective Cleavage of SNAREs in Sensory Neurons
718 Unveils Protein Complexes Mediating Peptide Exocytosis Triggered by Different Stimuli.
719 *Mol Neurobiol* 2014;50:574-88.
- 720 [82] Shimizu T, Shibata M, Toriumi H, Iwashita T, Funakubo M, Sato H et al. Reduction
721 of TRPV1 expression in the trigeminal system by botulinum neurotoxin type-A. *Neurobiol*
722 *Dis* 2012;48:367-78.
- 723 [83] Fan C, Chu X, Wang L, Shi H, Li T. Botulinum toxin type A reduces TRPV1
724 expression in the dorsal root ganglion in rats with adjuvant-arthritis pain. *Toxicon*
725 2017;133:116-22.

- 726 [84] Xiao L, Cheng J, Dai J, Zhang D. Botulinum toxin decreases hyperalgesia and
727 inhibits P2X3 receptor over-expression in sensory neurons induced by ventral root
728 transection in rats. *Pain Med* 2011;12:1385-94.
- 729 [85] Apostolidis A, Popat R, Yiangou Y, Cockayne D, Ford AP, Davis JB et al.
730 Decreased sensory receptors P2X3 and TRPV1 in suburothelial nerve fibers following
731 intradetrusor injections of botulinum toxin for human detrusor overactivity. *J Urol*
732 2005;174:977-82.
- 733 [86] Meng J, Ovsepien SV, Wang J, Pickering M, Sasse A, Aoki KR et al. Activation of
734 TRPV1 mediates calcitonin gene-related peptide release, which excites trigeminal sensory
735 neurons and is attenuated by a retargeted botulinum toxin with anti-nociceptive potential. *J*
736 *Neurosci* 2009;29:4981-92.
- 737 [87] Bach-Rojecky L, Lacković Z. Central origin of the antinociceptive action of botulinum
738 toxin type A. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;94:234-8.
- 739 [88] Filipovic B, Matak I, Bach-Rojecky L, Lacković Z. Central action of peripherally
740 applied botulinum toxin type A on pain and dural protein extravasation in rat model of
741 trigeminal neuropathy. *PLoS One* 2012;7:e29803.
- 742 [89] Maskos U, Kissa K, St Cloment C, Brûlet P. Retrograde trans-synaptic transfer of
743 green fluorescent protein allows the genetic mapping of neuronal circuits in transgenic
744 mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10120-5.

745

746 **Légendes des Figures**

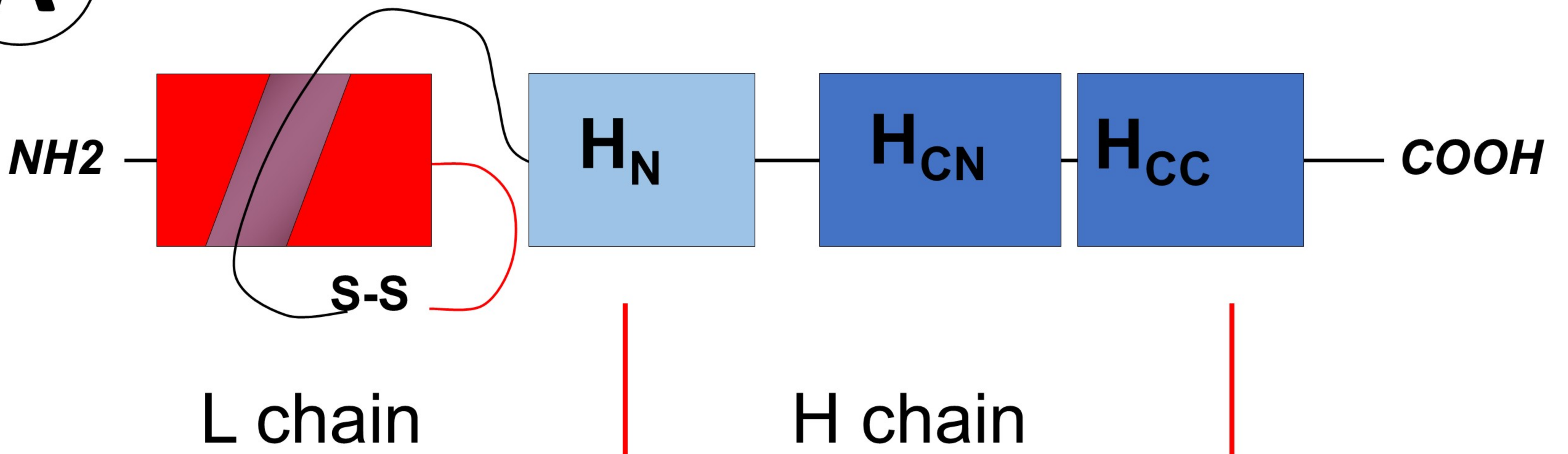
747

748 **Figure 1. Chaque domaine de BoNT joue rôle particulier dans le mécanisme**
 749 **d'action.** A) Organisation en domaines fonctionnels distincts de la BoNT. La chaîne légère
 750 (L, 50 kDa) est contient le domaine catalytique alors que la chaîne lourde (H, 100 kDa)
 751 comprend les domaines de liaison (H_{CC}) et de translocation (H_N). B) La BoNT représentée
 752 sous forme de rubans bleu et rouge commence par se lier (principalement via son
 753 domaine H_{CC} à un récepteur membranaire (a) apporté à la membrane par la fusion des
 754 vésicules synaptiques (VS). Le recyclage par endocytose de la vésicule vide internalise la
 755 BoNT. L'acidification de cette vésicule entraîne la translocation (b) de la chaîne L dans le
 756 cytosole selon un mécanisme qui implique le domaine H_N . Dans le cytosole, la chaîne L
 757 clive un des SNARE de l'exocytose (c) ce qui bloque l'exocytose.

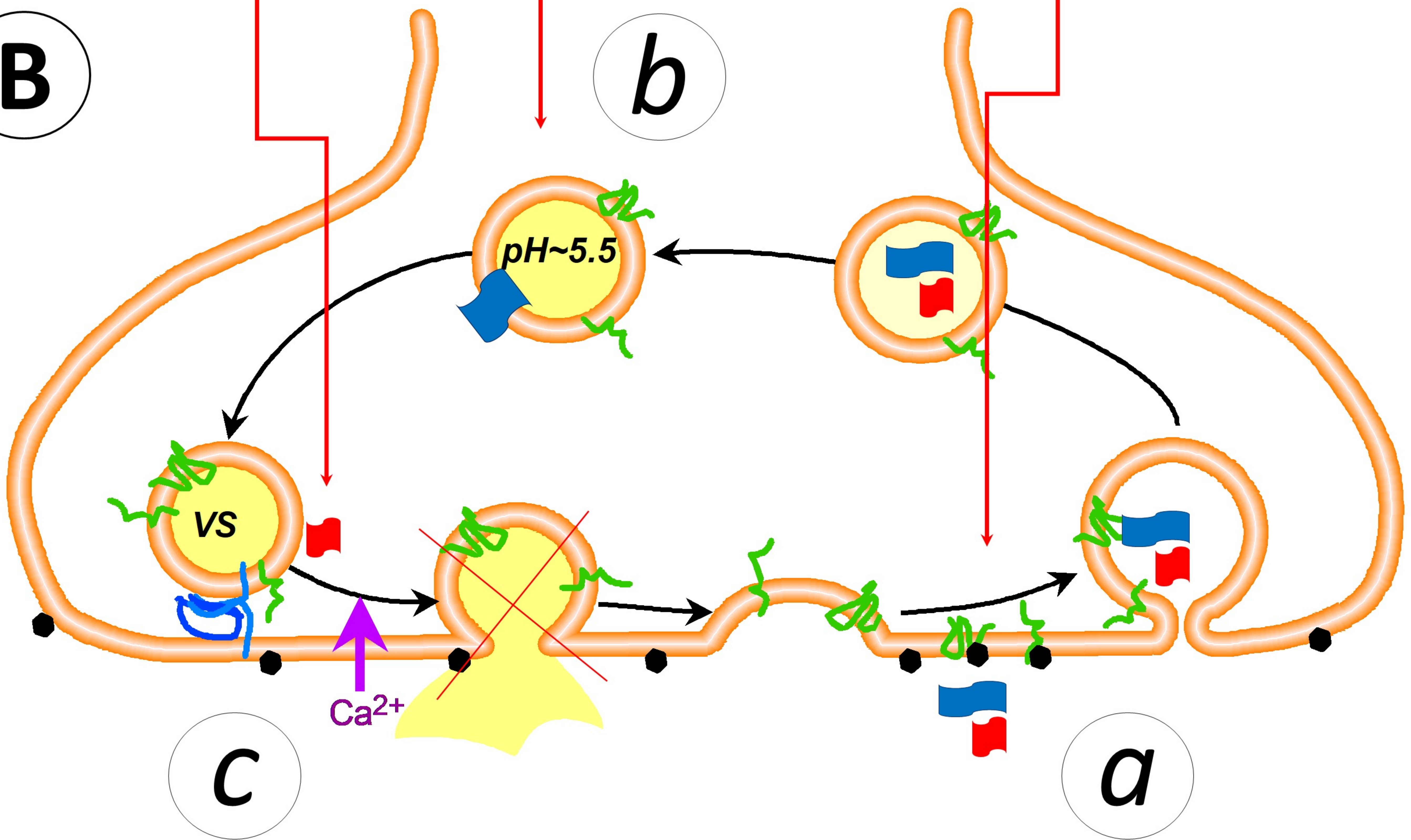
758

759 **Figure 2. Les sites d'actions neuronaux ciblés par la BoNT impliqués dans son**
 760 **action antalgique.** A) représentation schématique des neurones sensitifs primaires. (a) la
 761 BoNT entre dans les terminaisons nociceptives (et probablement pas dans les autres
 762 types de terminaisons sensibles) où elle peut bloquer la libération de glutamate, d'ATP,
 763 de substance P et de CGRP. Par transport axonal rétrograde elle peut gagner les corps
 764 cellulaires des neurones nociceptifs (b) où elle peut agir (voyez le schéma agrandi en B). Il
 765 a été proposé qu'une fraction des molécules de BoNT capturées en périphérie pourrait
 766 aussi gagner les terminaisons nerveuses des neurones ganglionnaires et qui forment des
 767 synapses avec les premiers neurones relais du système nerveux central (c). B) La BoNT
 768 transportée dans la branche périphérique, non myélinisée, des axones en T des neurones
 769 ganglionnaires, bloque les mécanismes d'exocytose (étoile rouge) qui permette d'insérer
 770 des récepteurs comme les récepteurs TRPV1, P2X3 ou au CGRP et de libérer différents
 771 transmetteurs comme le glutamate, l'ATP ou le CGRP.

A



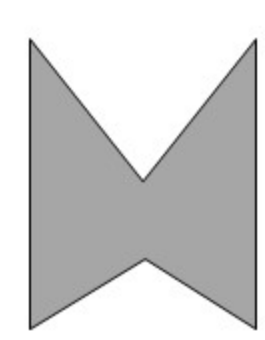
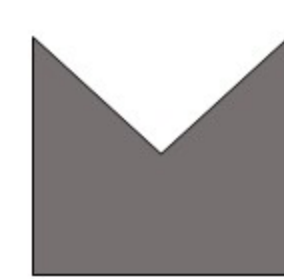
B



A*BoNT**a**b***C, A δ** **β , δ** **c****B***BoNT***CGRP***BoNT*

?

?

**P2X3****TRPV1****CGRP-R***BoNT**BoNT*