



**HAL**  
open science

# **Les canaux ioniques, une cible de molécules pharmacologiquement actives d'origine naturelle ou synthétique - Relation structure-fonction**

César Mattei

► **To cite this version:**

César Mattei. Les canaux ioniques, une cible de molécules pharmacologiquement actives d'origine naturelle ou synthétique - Relation structure-fonction. Sciences du Vivant [q-bio]. Université d'Angers (UA), 2024. <tel-04952130>

**HAL Id: tel-04952130**

**<https://hal.science/tel-04952130v1>**

Submitted on 17 Feb 2025

**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.



HAL Authorization



**Les canaux ioniques, une cible de molécules pharmacologiquement actives  
d'origine naturelle ou synthétique**

**Relation structure-fonction**

**Dossier présenté pour l'obtention de l'HDR**

**César Mattei**

Maître de Conférences des Universités

Soutenance publique le 11.06.2024

**Rapporteurs**

Dr. Pierre Charnet, Université de Montpellier, IBMM, CNRS, ENCM, Montpellier  
Pr. Patrice Rat, Université Paris-Descartes, Faculté de Pharmacie, Paris  
Dr. Denis Servent, Université Paris-Saclay, CEA, SIMoS, Gif-sur-Yvette

**Examineurs**

Dr. Sylvie Diochot, CNRS, IPMC, UMR 7275, Valbonne  
Pr. Christian Legros, Mitovasc, UMR CNRS 6015 - INSERM 1083 - Angers

**Directeur**

Dr. Guy Lenaers, Mitovasc, UMR CNRS 6015 - INSERM 1083 - Angers

Laboratoire MitoVasc - UMR CNRS 6015 - INSERM 1083 - Bâtiment IRIS 2 - 3 rue Roger Amsler, 49100  
Angers





*Pour Ulysse, Achille et Virgile, qui donnent quotidiennement un sens à ma vie*

## Remerciements

*Je tiens à remercier très chaleureusement mon directeur d'HDR, Guy Lenaers, pour la qualité des échanges que nous avons depuis plusieurs années déjà. A la fois enrichissants et stimulants !*

*Je remercie et salue amicalement les membres de mon jury d'HDR. Sylvie Diochot, dont j'admire tout particulièrement le parcours, la grande qualité de travail et l'humilité. Denis Servent, que je côtoie sporadiquement depuis ma thèse et qui incarne à merveille cet axe « toxine/récepteur » qui m'inspire. Patrice Rat, avec lequel j'ai la chance de pouvoir travailler sur les aspects pédagogiques de la toxicologie. Pierre Charnet, que j'ai croisé à Sète en 2022 et qui incarne pour moi une forme de sagesse scientifique dans le domaine des canaux ioniques. Christian Legros, avec lequel je partage beaucoup, notamment en matière de culture de la pharmacologie des toxines et avec lequel j'ai pu commencer à encadrer des étudiant.es.*

*Je voudrais également saluer et remercier celles et ceux que je côtoie au quotidien, au laboratoire ou à l'Université. Hélène Tricoire-Leignel, pour le duo que nous formons autour de ce Master de Toxicologie qui nous tient tant à cœur. Daniel Henrion dont j'admire la bienveillance et l'excellence scientifique. Un grand merci à Mathilde Munier, Claire Legendre, Vincent Leignel, et bien sûr Sophie Tamareille qui m'apporte tant.*

*Je souhaite avoir un mot tout particulier pour les étudiantes et les étudiants qui accompagnent mes projets depuis plusieurs années. Sans elles et eux, je ne pourrais pas prétendre à cette HDR... Florian Beignon, tout naturellement, car il incarne véritablement tout ce qu'un directeur de thèse peut souhaiter partager avec un thésard. Christina Sahyoun, Léa Réthoré, Joohee Park, Jacinthe Frangieh, Zeineb Soualah, Léa Tuifua, je crois pouvoir dire que vous êtes des femmes de science qui incarnez à merveille la féminisation de la recherche : je vous souhaite à toutes de poursuivre (longtemps) dans cette voie...*

*Je salue également celles/ceux qui travaillent au labo et peuplent mon univers quotidien. Je vais certainement en oublier... qu'ils/elles me pardonnent. Merci à vous Emilie V, Anne-Laure G, Linda G, Agnès B, Marie C, Valentine S, Coralyne P, Céline F, Carole S, Laurent L, Louis G, Cyril LC, Flavien B, Bertrand T, Sylvain R, ainsi que les membres de Mitolab.*

*Enfin, je souhaite avoir un mot particulier pour les personnes que j'ai côtoyées dans un passé récent ou ancien et qui m'ont mis le pied à l'étrier. Jordi Molgo et Evelyne Benoit que je prends toujours plaisir à côtoyer à la SFET ou au CEA et avec lesquels j'ai tant à partager. Fred Meunier, dont j'admire le parcours et la maestria scientifiques. Max Goyffon, dont je salue la mémoire, et sans lequel – à l'évidence – je ne serai pas là où je me trouve actuellement.*

*Last but not least, je salue toute ma famille : elle constitue – par son indéfectible soutien – la pierre angulaire des projets universitaires et extra-universitaires que j'entreprends. Rien n'est possible sans mes trois gars, mes sœurs et frère, ma mère, tout cet entourage familial qui structurent ma vie au quotidien. Enfin le souvenir inspirant de mon père Charles accompagne chaque jour mon cheminement intellectuel. Je lui dédie ces quelques pages.*

## Abréviations

ACE : acétamipride  
ACh : acétylcholine  
AID : Agence de l'innovation de défense  
AngII : angiotensine 2  
ANR : Agence nationale de la recherche  
ANT-a : anatoxine-a  
Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail  
Astrid : Accompagnement spécifique des travaux de recherches d'intérêt défense  
BTX, PbTx: brévatoxine(s)  
BZD : benzodiazépine  
BZP : bromazepam  
Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> : calcium intracellulaire  
CAP : capsaïcine  
CCE : coup de chaleur d'exercice  
CE<sub>50</sub>, CE<sub>10</sub> : concentration efficace 50%, concentration efficace 10%  
CES : comités d'experts spécialisés (Anses)  
CI<sub>50</sub> : concentration inhibitrice 50%  
CLO : clothianidine  
CTX : ciguatoxine(s)  
DGA : Direction générale de l'armement  
DL<sub>50</sub> : dose létale 50%  
EFX : étifoxine  
ERCA : évaluation des risques physico-chimiques dans les aliments  
FI : facteur d'impact  
FPN : fipronil  
GABA :  $\gamma$ -aminobutyric acid  
HEX : hexaméthonium  
IE : ingénieur d'études  
INFM : intoxication neurologique par fruits de mer  
ip : intrapéritonéale  
IP<sub>3</sub>R : récepteur de l'inositol-triphosphate  
IR : ingénieur de recherches  
IRBA : Institut de recherche biomédicale des armées  
IRSN : Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire  
iv : intraveineuse  
K<sub>d</sub> : constante de dissociation  
L2, L3 : Licence 2, Licence 3  
LMU : Le Mans Université  
M1, M2 : Master 1, Master 2  
MAM : mitochondria-associated membranes  
MAP : modulation allostérique positive  
MCU : mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter  
mitoTRPV1 : variant mitochondrial de TRPV1  
MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle

MTS : mitochondria-targeting sequence  
MTY : mito thermo yellow  
Nav : canaux Na<sup>+</sup> voltage-dépendants  
NeN : néonicotinoïdes  
NIC: nicotine  
NOAEL : no observable adverse effect level  
NRBC : Nucléaire, Radiologique, Biologique, Chimique  
OPEX : opérations extérieures  
PA : pression artérielle  
pmTRPV1 : forme plasmique de TRPV1  
PnTx : pinnatoxines  
PNRC : Parc Naturel Régional de Corse  
RGABA<sub>A</sub> : récepteur GABA de type A  
RE : réticulum endoplasmique  
RyR : récepteur de la ryanodine  
RTX : résinifératoxine  
SCAFOP : Service de Formation professionnelle et d'Alternance  
SFR : Structure fédérative de recherche  
SNC : système nerveux central  
SSA : service de de santé des armées  
TM : transmembranaire  
TTX : tétrodotoxine  
TRPV1 : transient receptor potential vallinoid 1  
UA : Université d'Angers  
VAE : validation des acquis par l'expérience  
VDAC : voltage-dependent anion-selective channel

## Sommaire

Remerciements	5
Abréviations	6
Préambule : quel cheminement ?	10
1. Parcours	13
1.1. Diplômes	14
1.2. Parcours	14
2 Enseignement	17
2.1. 2000-2010 : apprendre à enseigner la biologie	18
2.2. 2010-2024 : structurer un Master de Toxicologie/Ecotoxicologie	19
2.2.1. 2010-2017 : nouveaux enseignements en toxicologie	20
2.2.2. 2017-2024 : restructurer le Master THE	21
2.3. Enseignements à l'Université d'Angers	24
2.4. Comme professeur invité	25
2.5. Responsabilités pédagogiques	26
2.6. Formations suivies à l'Université	26
3 Activités de recherche	27
3.1. Projets scientifiques – Financements	28
3.1.1. Recherche	28
3.1.2. Pédagogie	29
3.1.3. Bourses	29
3.2. Collaborations scientifiques/éditoriales/pédagogiques	30
3.3. Encadrement	31
3.4. Alumni	34
3.5. Publications	35
3.5.1. Revues à comité de lecture	35
3.5.2. Chapitres d'ouvrages	38
4 Projets de recherche	40
4.1. Neurotoxines et perturbations fonctionnelles	41
4.2. Projet 1 : le canal Nav et les canalopathies acquises	43
4.2.1. Contexte scientifique : ciguatéra et INFM	43
4.2.2. Le canal Nav, une cible de nombreuses neurotoxines	46
4.2.3. Problématique de recherche : le brevénal et le concept de "liaison silencieuse"	49
4.2.4. Principaux résultats du Projet 1	50
4.2.5. Publications associées	51
4.3. Projet 2 : le récepteur nicotinique de l'acétylcholine, une cible d'insecticides	52
4.3.1. Contexte scientifique : implication des RnACh dans des intoxications humaines	53
4.3.2. Le RnACh, une cible majeure dans la perturbation du SNP	54
4.3.3. Problématique de recherche : les effets aigus des NeN sur mammifères	55
4.3.4. Principaux résultats du Projet 2	55
4.3.5. Publications/éditions associées	60

4.4.	Projet 3 : Récepteur GABA <sub>A</sub> , une cible allostérique d'agents thérapeutiques et phytosanitaires	60
4.4.1.	Contexte scientifique : un modulateur crucial de l'activité du SNC	61
4.4.2.	Problématique de recherche : l'influence de la structure sur la fonction	62
4.4.3.	Principaux résultats du Projet 3	63
4.4.3.1.	Le mode d'action du FPN est déterminé par la nature du récepteur GABA <sub>A</sub>	63
4.4.3.2.	L'anxiolyse médiée par l'EFX est pharmacologiquement différente de celle des BZD	67
4.4.4.	Publications/éditions associées	73
5	Projets développés	74
5.1.	Contexte scientifique : le coup de chaleur d'exercice	75
5.2.	TRPV1 et l'hypothèse mitochondriale	77
5.3.	Problématique et résultats actuels	80
5.4.	Axe de recherche 1 : valider l'hypothèse d'un « thermostat mitochondrial » dans des cellules natives	84
5.5.	Axe de recherche 2 : rechercher/créer des ligands spécifiques de mitoTRPV1 sans modifier la forme plasmique	84
5.6.	Axe de recherche 3 : caractériser les altérations physio-pharmacologiques des variants de mitoTRPV1	85
5.7.	Axe de recherche 4 : caractériser les variants de TRPV1 le long d'un gradient latitudinal	86
6	Activités éditoriales – Rayonnement	88
6.1.	Expertise scientifique avec l'ANSES	89
6.2.	Membre de jurys de thèse	90
6.3.	Membre de CSI de thèse	90
6.4.	Revue éditée	90
6.5.	Editeur associé	92
6.6.	Brevets/Logiciel	93
6.7.	Vulgarisation écrite	94
6.8.	Media radio/télé/internet	94
6.9.	Réseaux sociaux	95
	Références bibliographiques	96

## Préambule : quel cheminement ?

On dit parfois qu'il y a plusieurs vies dans une vie. C'est un petit peu mon cas. J'ai effectué des études assez classiques de biologie à l'Université Paris 7, avant de trouver dans la toxicologie matière à étancher ma soif de curiosité en Master 2 (1995-1996 au Muséum d'Histoire Naturelle). Une période bénie dans mon apprentissage scientifique, faite de nombreuses rencontres assez déterminantes pour l'avenir... J'ai donc effectué ma thèse (1996-1999) au laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire de Gif-sur-Yvette sur le mode d'action de neurotoxines à l'échelle cellulaire et moléculaire. Cela m'a permis de me familiariser avec le système nerveux périphérique, et des cibles moléculaires qui revêtent une importance considérable pour les effets délétères des neurotoxines : les canaux ioniques. Ubiquitaires, ils assurent les flux passifs d'ions à la membrane plasmique et entre les compartiments cellulaires. Lorsque leurs propriétés biophysiques sont modifiées par un agent pharmacologiquement actif, leur fonctionnement est perturbé et le flux ionique augmente ou diminue. La fluidité et la communication cellulaires sont alors anormales et l'organisme en subit des conséquences négatives. Réciproquement, il est possible de corriger un défaut induit par une pathologie en agissant sur le fonctionnement anormal d'un canal ionique pour rétablir ses caractéristiques biophysiques et physiologiques.

A la suite de ma thèse, j'ai eu l'occasion d'effectuer mon service militaire (2000) comme scientifique du contingent, où j'ai découvert ce qu'était le risque NRBC : des toxines encore, mais pas seulement. L'univers des agents de guerre biologique et chimique est aussi passionnant qu'effrayant. J'ignorais alors que j'y serai confronté de nouveau pendant mon parcours professionnel. L'année 2000, que j'appréhendais, fut un moment agréable : je me suis confronté à des thématiques duales (civiles/militaires) en toxicologie – neurotoxines, organophosphorés et autres agents du risque... – et j'ai pu assez sereinement préparer la suite ou plutôt le début de ma carrière scientifique.

J'ai continué à travailler sur les canaux ioniques au cours de mon stage postdoctoral en Angleterre à Harlow (2000-2002). Les canaux TRP venaient d'émerger comme de nouveaux acteurs du fonctionnement des cellules, dans tous les organes. Et il y avait de bonnes raisons de penser qu'il puisse s'agir de nouvelles cibles thérapeutiques. Et, pourquoi pas, de récepteurs pour de nouvelles toxines. L'approche que j'ai développée s'est avérée assez triviale : surexprimer des canaux dans un modèle hétérologue et en caractériser le fonctionnement avec deux méthodes de référence : l'électrophysiologie et l'imagerie calcique. A la suite de mes aventures britanniques, je suis parti une courte année aux Etats-Unis, à l'Université du Maryland à Baltimore. En cette année 2003, les Etats-Unis venaient d'envahir (à nouveau) l'Irak pour des motifs assez peu justifiables, liées à un risque NRBC (l'anthrax avait bon dos cette fois-là...). J'ai eu la chance de pouvoir continuer de travailler sur un canal

TRP (TRPC2) avec une vision bien plus physiologique qu'en Angleterre, puisque la fonction associée était clairement désignée : l'olfaction.

A l'été 2003, à l'occasion d'un passage en Corse, pour visiter ma famille paternelle, j'ai reçu tout à fait par hasard une proposition d'emploi : chef de projet pour un programme de conservation faunistique dans le Parc Naturel Régional de la Corse. Drôle d'opportunité. Adolescent, je rêvais de vivre et de travailler en Corse, car c'est une région à laquelle je suis viscéralement attaché. Par les lieux, la famille, les gens, les images... cet « immense édifice du souvenir », ce chemin parsemé de pierres blanches qui consolident la mémoire et construisent votre personnalité. J'ai accepté et je me suis retrouvé à la fin de l'année 2003 à programmer un « kick-off meeting » pour le programme LIFE mouflon avec des partenaires chercheurs et gestionnaires de la grande faune. J'ai déménagé de Baltimore, une grande ville de la côte-est des Etats-Unis, à Soveria, un village de la région cortenaise. Pendant trois années, j'ai appris à gérer un groupe, un budget, à anticiper des dépenses, à dialoguer avec des financeurs européens et à me confronter à une problématique de recherche très concrète : préserver une espèce animale emblématique de la montagne corse (Figure 1). Une période de ma vie consacrée autant à travailler devant mon ordinateur qu'à découvrir mon nouveau laboratoire : le massif corse, dans les réserves de chasse d'Ascu et de Bavella. Autant de tâches qui allaient devenir des atouts pour mes fonctions actuelles.



*Figure 1: Dans la vallée d'Ascu [réserve nationale de chasse] - hiver 2004-2005 avec surpantalons et raquettes... Un mouflon mâle (Ovis gemilini musimon var. corsicana) d'une dizaine d'années, vient d'être capturé. Il est masqué et attaché... avant de retrouver sa liberté.*

Des raisons familiales et professionnelles (la Corse peut s'avérer aussi paradisiaque qu'inférieure...) m'ont fait rejoindre en 2010 la Délégation Générale pour l'Armement (qui n'était pas encore la « Direction » Générale pour l'Armement) comme chef de projets. Revenir à la toxicologie des agents NRBC (surtout B et C finalement) a été un nouveau changement, comme un retour aux sources, avec des visages croisés pendant mon service militaire. Suivre les programmes de l'Etat français dans le domaine des contre-mesures médicales, des projets financés par la DGA, les thèses... m'a autant relancé en toxicologie que convaincu que ma place était dans un laboratoire de recherches pour tenter, humblement, de faire avancer la science au sein d'un collectif. J'ai donc obtenu un poste d'enseignant-chercheur en 2010 à l'Université d'Angers. Je partage donc mon temps entre l'enseignement et la recherche. Les canaux ioniques sont logiquement revenus au centre de mon attention.

Aujourd'hui, en 2023, je consacre mon énergie à l'enseignement que je dispense très majoritairement à l'UFR des Sciences de l'Université d'Angers ; au Master de Toxicologie/Écotoxicologie dont je partage la responsabilité et aux projets de recherche dans lesquels j'ai choisi de m'investir.

Je pense, compte-tenu de mon parcours, pouvoir présenter l'habilitation à diriger des recherches.

# 1. Parcours

# Curriculum vitae

## César MATTEI

Maître de conférences Hors Classe à l'Université d'Angers

Né le 30-11-1973 à St Germain en Laye (78), nationalité française

Laboratoire MitoVasc – UMR CNRS 6015 - INSERM 1083

Bâtiment IRIS 2

3 rue Roger Amsler

49100 Angers

[cesar.mattei@univ-angers.fr](mailto:cesar.mattei@univ-angers.fr)

<https://orcid.org/0000-0002-2214-2611>

<https://www.researchgate.net/profile/Cesar-Mattei>

### 1.1. Diplômes

**1999** : Doctorat en Toxicologie, Université Paris 7-Denis Diderot (France).

**1996** : DEA de Toxicologie, Muséum National d'Histoire Naturelle (France).

**1995** : Maîtrise de Biochimie, Université Paris 7-Denis Diderot (France).

**1994** : Licence de Biochimie, Université Paris 7-Denis Diderot (France).

**1993** : DEUG Sciences de la Vie, Université Paris 7-Denis Diderot (France).

### 1.2. Parcours

**Depuis 2013** : Maître de conférences des Universités Hors-Classe, UFR de Sciences, Université d'Angers. Responsable du Master 2 Toxicologie Humaine et Environnementale

Equipe CarMe – Unité MitoVasc – UMR CNRS 6015 - INSERM 1083, dirigée par Daniel Henrion (équipe) et Guy Lenaers (unité)

Projet de recherche : implication des canaux ioniques comme cibles de molécules pharmacologiquement actives – conséquences physiopathologiques

**2010-2012** : Maître de conférences des Universités, UFR de Sciences, Université d'Angers (<https://www.univ-angers.fr/fr/index.html>)

Equipe RCIM – UPRES EA 2647/USC INRA 1330, dirigée par Bruno Lapied

Projet de recherche : mode d'action d'insecticides sur des canaux ioniques et récepteurs membranaires

**2007-2010** : Chef de projet, Direction Générale de l'Armement, ministère de la Défense, Bagnoux (<https://www.defense.gouv.fr/dga>)

Unité de Management NBC, Risque Biologique et Chimique, équipe dirigée par Dominique Esquivier

Projets : soutien à la politique de recherche du ministère de la Défense. Projet NRBC/télémédecine

**2004-2006** : Chef de projet européen en Biologie animale, chargé d'enseignement, Corse (<https://www.pnr.corsica/>)

Parc Naturel régional de Corse – équipe Grande Faune dirigée par Gérard Feracci

Université de Corse/Pascal Paoli

Projet de recherche : Conservation et extension des populations de mouflons corses en Corse

**2003**: Assistant-professeur, University of Maryland Medical School (Baltimore – Etats-Unis),

Department of Anatomy and Neurobiology, équipe dirigée par Frank Zufall

Projet de recherche : Caractérisation du canal ionique TRPC2 dans l'organe voméronasal de souris

**2000 – 2002** : Chercheur post-doctoral, Center of Excellence for Drug Discovery – Neurology, GSK (Harlow, Grande-Bretagne),

Department of Neuropharmacology, équipe dirigée par Menelas Pangalos

Projet de recherche : Identification de canaux ioniques TRP comme cibles thérapeutiques potentielles (TRPC7, TRPM2)

**1996-1999** : Etudiant en thèse, UPR 9040, CNRS, Gif-sur-Yvette/Université Paris 7

Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, équipe « Neurotoxines » dirigée par Jordi Molgo

Projet de recherche : Caractérisation du mode d'action de neurotoxines d'origine marine sur des canaux ioniques et conséquences fonctionnelles

## **2. Enseignements**

## Présentation générale des activités d'enseignement

### 2.1 2000-2010 : apprendre à enseigner la biologie

L'obtention de ma thèse dans le domaine de la toxicologie m'a naturellement amené à dispenser des cours sur le mode d'action des toxines dans le cadre de l'école doctorale et du Master du MNHN : formation continue dans le premier cas et initiale dans le deuxième. Les publics sont donc soit des professionnels (médecins, pompiers, pharmaciens) soit des étudiant.es.

Mes premiers pas en tant qu'enseignant m'ont grandement servi pour la suite de ma carrière.

J'ai démarré à enseigner à des étudiants au sortir de la thèse, en l'an 2000, après avoir sollicité le Pr. Max Goyffon (MNHN) pour dispenser des enseignements de Master. Les cours avaient trait aux effets de neurotoxines, d'un point de vue pharmacologique et physiologique. Autant d'aspects qui m'ont toujours convenu. En 2003-2005, je suis sorti de ce que l'on pourrait nommer ma « zone de confort » puisque mes fonctions de chef de projet au PNRC m'ont amené à donner des cours d'écologie à l'Université de Corse (Corte) et à des étudiants de BTSA en lycées agricoles (Borgo et Porto-Vecchio).

Aujourd'hui, mes enseignements sont dispensés quasi-exclusivement en formation initiale des cursus de sciences de la vie (L1 au M2) de l'Université d'Angers. J'ai la responsabilité de plusieurs modules de Licence et de Master, dans les domaines de la physiologie et de la toxicologie. J'ai contribué à la création de différents modules de Licence et de Master, dans le cadre du lancement du master de Toxicologie humaine et environnementale, dont j'assume la co-responsabilité. Cette filière est devenue en quelques années l'alpha et l'oméga de mon activité pédagogique car elle mobilise une partie importante de mon temps d'enseignement, y compris en Licence pour préparer les L3 SVT à la toxicologie en master.

Ce choix de m'investir pleinement dans l'enseignement des matières relatives à la toxicologie est en adéquation avec mes activités de recherche. Il trouve sa concrétisation dans la seconde année de Master, lorsque les jeunes diplômé.es se lancent dans une carrière professionnelle en entreprise ou démarrent leur doctorat en laboratoire. La présentation de mes activités d'enseignement peut être découpée en trois séquences dans le temps.

Mon recrutement en 69<sup>ème</sup> section (Neurosciences) à la rentrée de l'année universitaire 2010-2011 m'a amené à dispenser des enseignements dépassant assez largement le système nerveux périphérique et central et les neurones. L'Université d'Angers offre en effet la possibilité d'enseigner

des thématiques assez larges – pluridisciplinarité oblige... – et je me suis donc assez rapidement retrouvé devant des étudiant.es de L2 à l'UFR de Sciences, mais également en Psychologie.

Dès la première année, j'ai pu m'impliquer dans le Master « Altérations des systèmes biologiques » que nous allions, quelques années plus tard, entièrement restructuré pour bâtir un véritable « Master de Toxicologie humaine et environnementale » en suivant une logique de filière : préparer les étudiants de Licence, à travers des modules ciblés, à intégrer ce Master tout en sondant le milieu professionnel pour bâtir une adéquation pédagogique entre nos enseignements et le monde du travail.

Mon implication dans cette filière a progressivement occupé la majorité de mon temps d'enseignement avec la création de modules spécifiques, sous la mention « Toxicologie-Ecotoxicologie ». C'est cet aspect de mon activité d'enseignement que j'ai choisi de développer ci-après.

Je suis par ailleurs impliqué dans la première année de Polytech-Santé, qui est une école d'ingénieurs de l'Université d'Angers, avec la spécialité Génie Biologique et Santé. Elle forme de futur.es ingénieur.e.s des filières industrielles pharmaceutiques, cosmétiques et biotechnologiques ; mais également des cadres de structures sanitaires et médico-sociales. En 1<sup>ère</sup> année, je propose un cours de physiologie humaine sur la communication cellulaire (système endocrinien/système nerveux).

Je dispense également un cours dans le Master 2 Biologie-Santé (parcours Physiopathologie et pharmacologie vasculaire). Il traite des canaux ioniques et des canalopathies qui leur sont liées. Enfin, j'ai été sollicité depuis plusieurs années pour un cours dans le module d'Expérimentation animale (niveau 2).

## **2.2 2010-2024 : structurer un Master de Toxicologie/Ecotoxicologie**

Le projet pédagogique auquel je suis le plus attaché est assez naturellement celui du Master de Toxicologie humaine et environnementale : ses enseignements font écho à mon propre historique scientifique... la toxicologie. Le projet de structuration du Master THE<sup>1</sup> s'est faite avec deux de mes collègues, dans une ambiance aussi studieuse que constructive : Hélène Tricoire-Leignel (Université d'Angers) et Vincent Leignel (Le Mans Université).

---

<sup>1</sup> <https://formations.univ-angers.fr/fr/offre-de-formation/master-lmd-MLMD/sciences-technologies-sante-STS/master-toxicologie-et-ecotoxicologie-KV26YGT4.html>

### 2.2.1 2010-2017 : nouveaux enseignements en toxicologie

Dès mon recrutement, j'ai participé à cette formation (alors Master Altérations des systèmes biologiques) en proposant plusieurs cours de Toxicologie en M1 et en M2.

#### - Master 1

En 1<sup>ère</sup> année de Master, l'important a été de mettre l'accent sur la pharmacologie de sorte que les étudiant.es se familiarisent avec les notions d'interaction ligand/récepteur (*in vitro* et *in vivo*) et les conséquences cellulaires et physiologiques induites. Le développement de médicaments est également abordé, là encore principalement sous l'angle de la liaison ligand/récepteur, d'un point de vue quantitatif ( $CE_{50}$ , effet maximal,  $K_d$ ) et qualitatif (marge thérapeutique, interaction réversible). Ce module a trouvé son prolongement avec des enseignements en endocrinologie (axe hypothalamo-hypophysaire et effecteurs) dans lesquels j'ai choisi d'illustrer comment un ligand (une hormone) induit une réponse biologique (cellulaire, comportementale).

#### - Master 2

Compte-tenu du fait que le Master n'abordait pas le risque NRBC, qui faisait partie de mon travail avant mon intégration à l'Université d'Angers, j'ai proposé dès le début de mes enseignements un cours d'introduction aux agents du risque NRBC. Cette menace, largement prise en compte dans le champ scientifique, venait d'être remise au cœur de l'actualité à la faveur des Livres blancs de la Défense en 2008 et 2013<sup>2</sup>. J'ai pu constater au fil des années que plusieurs étudiant.es se dirigeaient vers cette thématique de recherche duale (civile/militaire) dans des laboratoires de la DGA, de l'IRBA ou de l'IRSN. Il nous semblait donc important qu'ils disposent de connaissances approfondies du risque NRBC.

Parallèlement, et là encore compte-tenu de mon expérience en thèse, j'ai rapidement été amené à enseigner la toxicologie du milieu marin, en abordant à travers une problématique à la fois écotoxicologique (écologie des producteurs, transfert de contamination, facteurs favorisant/défavorisant la toxinogénèse, efflorescences algales) et toxicologique (effets sur la santé humaine, aspects mécanistiques, effets *in vivo* sur modèles expérimentaux) les phycotoxines. C'est un cours qui a subi pas mal d'évolutions, à la faveur de toxines émergentes, et de leur prise en compte dans les dispositifs de surveillance sur le littoral français (Rephy, Rephytox et Emergtox<sup>3</sup>). Par ailleurs,

---

<sup>2</sup> <https://www.defense.gouv.fr/dgris/politique-defense/livres-blancs>

<sup>3</sup> <https://littoral.ifremer.fr/Reseaux-de-surveillance/Environnement/REPHY-la-surveillance-du-phytoplancton-et-des-phycotoxines>

j'ai souvent eu l'occasion d'enrichir ce cours par mon implication dans différentes saisines de l'Anses auxquelles j'ai été associé dans le cadre de groupes de travail ou du CES ERCA (voir section 6.1).

Enfin, lors de mon recrutement à l'UA en 2010, j'ai intégré le laboratoire RCIM (Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires) dont la thématique de recherche se focalisait sur le mode d'action d'insecticides neurotoxiques. J'ai alors pu développer des projets de recherche en lien avec le système nerveux des insectes et le mode d'action d'insecticides. Consécutivement, j'ai pu enseigner aux étudiant.es les conséquences de l'interaction insecticides/récepteurs et la notion de résistance dans un cours de toxicologie et écotoxicologie. Ce cours m'a d'ailleurs poussé à développer ma propre recherche sur les effets d'insecticides sur des cibles mammifères.

### **2.2.2 2017-2024 : restructurer le Master THE**

En 2017, je suis devenu responsable du M2 dans sa nouvelle forme (TEH<sup>4</sup>). Plusieurs séquences sont venues structurer l'évolution du Master jusqu'à sa forme actuelle, en concertation avec mes collègues H. Tricoire-Leignel et V. Leignel.

- **2017** : responsabilité de la filière & introduction de l'alternance

Le Master TEH s'est détaché du Master d'écologie des zones humides de l'UA, avec lequel il partageait de nombreux enseignements. Notre Master est passé sous la mention « Toxicologie/Écotoxicologie » et nous en avons clarifié l'intitulé, qui est passé de « Altérations des systèmes biologiques » à « Toxicologie Environnementale et Humaine ».

Nous avons réorganisé les enseignements pour donner plus de visibilité aux modules spécifiques de toxicologie et d'écotoxicologie. Nous avons créé un module de toxicologie des addictions et de toxicologie alimentaire, et un module de toxinologie. Parallèlement, nous avons introduit des modules transversaux optionnels importants – selon nous – pour des étudiant.es en Bac+5, notamment un module de management de projet et un module d'expérimentation animale.

Enfin, j'ai eu l'opportunité en 2017 de proposer la seconde année de Master en alternance<sup>5</sup>, un dispositif qui permet aux étudiant.es d'effectuer leur M2 en tant que salarié.es. L'alternance avec un contrat de professionnalisation est une formule idéale pour celles/ceux qui souhaitent valider leur

---

<sup>4</sup> Toxicologie Environnementale et Humaine

<sup>5</sup> <https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/fr/l-alternance-dans-le-superieur-46509>

diplôme lors d'une reprise d'étude. Depuis, chaque année, nous avons des demandes de salarié.es motivée.es pour venir suivre les cours du Master et valider leur diplôme.

- **2020** : introduction de l'apprentissage & renforcement de la co-accréditation

Le dispositif d'alternance s'est complété en 2020 avec le contrat d'apprentissage, une petite révolution à l'échelle du Master puisqu'il permet à des entreprises d'embaucher des étudiant.es en formation initiale sur un contrat d'un an pour les former tout en leur garantissant un temps d'étude à l'UA. Cette formule a permis à plusieurs étudiant.es de s'intégrer très rapidement dans le monde professionnel, et je dois saluer le soutien de Charlotte Brosset (UFR de Sciences) pour m'avoir accompagné dans le montage de dossiers pour l'apprentissage.

Parallèlement, la co-accréditation avec l'Université du Mans s'est renforcée à la fois en M1 et en M2, puisque plusieurs modules sont à présent enseignés conjointement dans les deux Universités en M1 (toxicologie des addictions, toxicologie notamment) et en M2 pour lequel environ 80% des cours sont communs entre UA et LMU, les 20% restants étant des enseignements « locaux » : anglais, projet professionnel, management de projet.

- **2022** : nouvelle maquette de Master

En 2022, le Master TEH est devenu THE... et la nouvelle maquette a visé un double objectif assez ambitieux : proposer une formation de haut niveau mais résolument généraliste en toxicologie/écotoxicologie. Alors que bon nombre de filières Bac+5 structurent leur maquette en l'orientant soit en toxicologie, soit en écotoxicologie, nous avons décidé de conserver ces deux bras, en offrant un jeu d'options susceptibles de satisfaire des étudiant.es épris.es de toxicologie et d'autres avec une affinité plus écotoxicologique.

Conscients de l'employabilité forte dans le domaine des affaires réglementaires, nous avons créé un module de toxicologie réglementaire en M1 et un en M2. Nous nous sommes appuyés pour ce faire sur des spécialistes du secteur privé ainsi que sur des anciennes étudiantes du Master. De cette manière, la promotion de Master a la capacité à se forger une bonne culture du domaine réglementaire grâce à trois modules en M2 (Figure 2) :

- un module de droit de l'environnement
- un module de toxicologie réglementaire
- un module d'analyse de risques et toxicovigilance

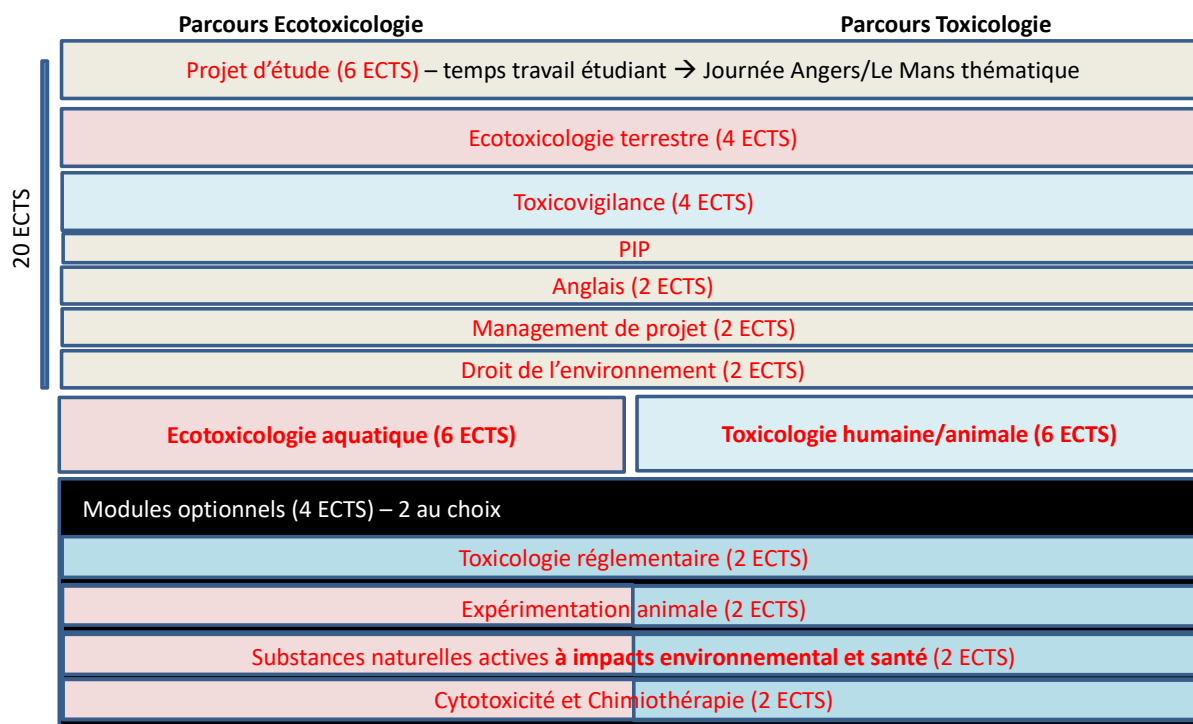


Figure 2 : maquette du Master THE – 2<sup>ème</sup> année (2022-2026)

L'analyse des parcours professionnels des étudiant.es à la sortie du Master montrent qu'environ un quart d'entre elles/eux poursuivent en thèse, et trois-quarts se dirigent vers le secteur professionnel (entreprises privées ou agences nationales). Le domaine réglementaire agrège le plus gros nombre d'étudiant.es embauché.es car les entreprises qui recrutent appartiennent aux industries cosmétiques, agroalimentaires, pharmaceutiques, biotechnologiques, agro-chimiques à la recherche de personnels compétents dans le domaine de la réglementation avec un gros bagage en toxicologie...

L'une des valeurs ajoutées du Master est également la délivrance d'un diplôme de « Toxicologue »<sup>6</sup>, une mention recherchée par de nombreuses entreprises des secteurs précités. En effet, la conformité réglementaire d'une marchandise (produit cosmétique, agent phytosanitaire, dispositif de santé etc.) requiert la certification de documents conformes par un.e spécialiste diplômé en toxicologie. Cette certification, recensée par le RNCP, atteste du niveau de qualification délivré par le diplôme. Elle peut être obligatoire pour occuper certains emplois.

<sup>6</sup> <https://www.francecompetences.fr/recherche/rncp/34155/>

- 2024 : les futurs défis du Master

A l'heure où j'écris ces lignes, les différentes filières universitaires doivent adapter leur offre de formation à une architecture intégrant « l'approche par compétences (APC) ». Il s'agit d'une méthode pédagogique qui privilégie l'acquisition de compétences plutôt que la diversité des connaissances. Cette approche entend mettre sur un même plan les savoir-faire, les savoir-être et les enseignements transversaux. Elle ambitionne ainsi de favoriser, dans la formation des étudiant.es, aussi bien le développement professionnel que personnel... On peut lui reprocher à la fois une forme de globalisation de la formation universitaire et son caractère uniforme ; elle s'est cependant imposée à l'Université et nous devons composer avec elle.

Nous avons donc démarré le travail de « traduction » de notre actuelle maquette (2022-2026) en compétences selon une méthode que l'on pourrait nommer de maïeutique pédagogique, destinée à faire émerger les différentes compétences à posséder par nos futur.es diplômé.es.

Parallèlement, et fort de l'expérience que nous avons acquise dans le Master en accueillant plusieurs salarié.es en reprise d'étude, nous souhaitons offrir la possibilité à des personnes en poste en entreprise de venir valider non pas systématiquement tout le Master (c'est-à-dire l'ensemble des modules du M2), mais certains modules qu'ils considéreraient comme indispensables à leur évolution de carrière. Cette « offre à la carte » est actuellement en réflexion avec le SCAFOP pour être déployée à l'horizon 2025.

Enfin, des discussions sont également en cours à l'initiative du Pr. Patrice Rat (Université Paris Descartes - Faculté de Pharmacie), responsable du DU « Evalueur de la sécurité toxicologique pour les produits chimiques et cosmétiques », pour fédérer des Masters de Toxicologie/Écotoxicologie dans l'optique d'accompagner des salariés du privé désireux de valider un diplôme de Master sous la forme d'une VAE.

### **2.3 Enseignements à l'Université d'Angers**

Mes enseignements dispensés à l'Université d'Angers sont listés dans le Tableau 1 et rendent compte des cours dispensés sur la quadriennale 2019-2024.

Tableau 1 : enseignements annuels dispensés sur la période 2019-2024

Niveau	Diplôme	Discipline	Intitulé	Type de formation (1)	Nature (2)	Effectifs	Volume horaire annuel
L1	Ingénieur	Physiologie	Physiologie générale	Initiale	CM/TD	30	33
L3	Licence	Physiologie	Physiologie humaine	Initiale	CM/TD/TP	120	64
L3	Licence	Biochimie	Biochimie métabolique	Initiale	TD	120	4
L3	Licence	Physiologie	Physiologie animale	Initiale	CM/TD	50	17
L3	Licence	Toxicologie	Toxicologie générale	Initiale	CM/TD	90	91
M1	Master	Toxicologie	Toxicologie des addictions	Initiale	CM/TD	20	13.5
M1	Master	Toxicologie	Toxicologie alimentaire	Initiale	CM/TD	20	10
M1	Master	Toxicologie	Neurotoxicologie	Initiale	CM/TD	20	6.5
M1	Master	Toxicologie	Toxinologie	Initiale	CM/TD	20	22
M1	Master	Toxicologie	Evaluation du risque sanitaire	Initiale	CM/TD	20	14
M1	Master	Pharmacologie	Pharmacologie générale	Initiale	CM/TD	20	9.5
M2	Master	Toxicologie	Toxicologie des produits radioactifs	Initiale/Continue	CM/TD	20	10
M2	Master	Toxicologie	Phycotoxines	Initiale/Continue	CM	20	11
M2	Master	Toxicologie	Risque Chimique	Initiale/Continue	CM	20	6
M2	Master	Physiologie	Expérimentation animale	Initiale/Continue	CM	25	3
M2	Master	Pharmacologie	Canaux ioniques et canalopathies	Initiale/Continue	CM	15	6

## 2.4 Comme professeur invité

- **Depuis 2023** DU Evaluator de la sécurité toxicologique pour les produits chimiques et cosmétiques à la Faculté de Pharmacie (Université Paris Cité)<sup>7</sup> – 3 heures par an – Evaluation de risque.
- **2010-2016** Enseignement au Muséum National d'Histoire Naturelle (Ecole doctorale et Master 2) – 4 heures par an – Toxinologie.

<sup>7</sup> [https://odf.u-paris.fr/fr/offre-de-formation/diplome-d-universite-1/sciences-technologies-sante-STS/du-evaluateur-de-la-securite-toxicologique-pour-les-produits-chimiques-et-cosmetiques-FU54\\_131.html](https://odf.u-paris.fr/fr/offre-de-formation/diplome-d-universite-1/sciences-technologies-sante-STS/du-evaluateur-de-la-securite-toxicologique-pour-les-produits-chimiques-et-cosmetiques-FU54_131.html)

- **2004-2006** Enseignement à l'Université de Corse et Lycées agricoles de Borgo/Porto-Vecchio – 30 heures par an – Ecologie/biologie animale/biologie environnementale.

## 2.5 Responsabilités pédagogiques

**Depuis 2019** Ouverture du Master 2 Toxicologie environnementale et humaine à l'apprentissage (10 étudiants en alternance "apprentissage" depuis)

**Depuis 2017** Responsable du Master 2 Toxicologie environnementale et humaine (Université d'Angers). Co-accréditation avec Le Mans Université

<https://formations.univ-angers.fr/fr/offre-de-formation/master-lmd-MLMD/sciences-technologies-sante-STS/master-toxicologie-et-ecotoxicologie-KV26YGT4.html>

## 2.6 Formations suivies à l'Université

Tableau 2 : formations suivies à l'UA depuis 2018

Date	Durée (heures)	Intitulé Formation	Domaine Formation
14/03/2024	3h.	Gestes qui sauvent	Hygiène et sécurité
29/02/2024	9h.	Formation continue en expérimentation animale (virtuel et théorie) : Gestes, bonnes pratiques de laboratoires	Expérimentation animale
13/12/2023	8h.	Comportement des rongeurs	Expérimentation animale
04/12/2023	3h.	Atelier pas de côté (approche par compétences)	Développement personnel
25/09/2023	3h. 30m.	Initiation au montage et à la gestion de projets européens	Europe
14/09/2020	2h.	Créer des contenus vidéos avec Panopto	Méthodologie
07/06/2018	9h.	Formation continue en expérimentation animale : maintien des compétences	Expérimentation animale

# **3. Activités de recherche**

### 3.1. Projets scientifiques – Financements

Pas de projet de recherche sans budget dédié. Cette partie aborde les projets auxquels je suis associé en tant que partenaire ou co-responsable. Certains sont terminés, d'autres en cours, un est actuellement soumis à candidature. Les financements de thèse/postdoctorat sont également indiqués.

#### 3.1.1. Recherche

- **2025-2027** *Projet Heat-TRiP « Control of skeletal muscle hyperthermia by TRPV1 and its role in the pathophysiology of exertional heat stroke » - Projet ANR soumis. Coordinateurs J. Fauré et S. Ducreux – 453 992 €*
- **2024-2025** *Projet « Role of TRPV1 variants in mitochondrial thermogenesis and susceptibility to heat strokes » – AAP Changement climatique et santé (INSERM) – Coordinateur G. Lenaers – 119 600 €*
- **2024-2025** *Projet inter-équipe « mitoTRPV1 » (Unité Mitovasc) – Coordinateurs F. Beignon et V. Suteau – 3000 €*
- **2023** *Projet RETHERMI (Université d'Angers/Inter SFR ICAT/QASAV<sup>8</sup>) : Mesure de la température mitochondriale *in situ* – Co-responsable avec D. Macherel – 5000 €*
- **2022-2025** *Projet TEMPOMITO (ANR-Astrid) : Implication de la mitochondrie dans la physiopathologie du coup de chaleur d'exercice. A la recherche de nouveaux biomarqueurs – Co-responsable avec G. Lenaers – 275 000 €*
- **2019-2020** *Projet CEDRE (Coopération France-Liban) : Valorisation des molécules vasoactives du venin de la vipère libanaise *Montivipera bornmuelleri*. Coordinateurs C. Legros/Z. Fajloun – 18 000 €*

---

<sup>8</sup> SFR impliquées à l'UA : Interactions cellulaires et applications thérapeutiques (ICAT) et Qualité et santé du végétal (QASAV)

- **2017-2020**     Projet SODIVASC (Pari-Région Pays de la Loire) : Etude de l'implication des canaux sodium dépendants du potentiel dans la fonction vasculaire – Coordinateur C. Legros – **250 000 €**
- **2013-2014**     Projet Récepteurs nicotiques d'invertébrés et insecticides (INRA – SPE) Identification de cibles d'insecticides spécifiques du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* par analyse des relations structure-fonction des récepteurs nicotiques – Coordinatrice H. Tricoire-Leignel – **24 000 €**
- **2011-2015**     Projet Etifoxine et Récepteurs GABA<sub>A</sub> (Biocodex) : Etude du mode d'action de l'étifoxine sur les récepteurs GABA<sub>A</sub> – Co-responsable – **28 000 €**
- **2003-2006**     Projet LIFE mouflon corse (Union Européenne) : Conservation et extension des populations de mouflons corses en Corse – Chef de projet/coordonateur – **1,7 M€**

### 3.1.2. Pédagogie

- **2021-2022** : Projet Pédagogique TOXI-COLLOQUE – (Université d'Angers/Le Mans Université) – Co-responsable – **2 500€**
- **2016-2018** : développement du logiciel ExaVir<sup>9</sup> (Expérimentation animale Virtuelle). Co-responsable – **20 000€**

### 3.1.3. Bourses

- **2023** : Bourse postdoctorale 6 mois - Projet de Recherche MOTHERMI (Université d'Angers). Florian Beignon
- **2023-2026** : Bourse doctorale DGA/Région – Projet de recherche sur le coup de chaleur d'exercice. Léa Tuifua

---

<sup>9</sup> <http://labua.univ-angers.fr/article/exavir>

- **2019-2022** : Bourse doctorale DGA/Région – Projet de recherche sur le variant mitochondrial du canal TRPV1. Florian Beignon
- **2014-2016** : Bourse doctorale DGA/Région – Projet de recherche sur l'effet du brévénal comme agent thérapeutique contre la ciguatéra. Lucille Crespin

### 3.2. Collaborations scientifiques/éditoriales/pédagogiques

- **Nationales**

Nathalie Arnich, Direction de l'évaluation des risques, ANSES, Maisons-Alfort

Clément Cabanetos, UA, CNRS UMR 6200, Moltech-Anjou, SFR-MATRIX, Angers

Mireille Chinain - Institut Louis Malardé - UMR EIO, Papeete, Polynésie française

Sylvie Diochot/Anne Baron - InstitutPMC, Université Côte d'Azur, CNRS, Valbonne

Sylvie Ducreux - CarMeN Lab, INSERM, INRA, Univ Claude Bernard Lyon 1, Bron

Valérie Fessard - Unité de Toxicologie des Contaminants, ANSES-Fougères

Julien Fauré - Univ Grenoble Alpes, INSERM, Institut Neurosciences, U1216, CHU Grenoble

Nathalie Guerineau - IGF, Université de Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier

Emilie Lance - UMR-I 02 SEBIO, Univ Reims, Reims

Vincent Leignel - Laboratoire BIOSSE, Le Mans Université

David Macherel - UA, Institut Agro, INRAE, IRHS, SFR 4207 QuaSaV, Angers

Benjamin Marie - UMR Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes, MNHN Paris

Jordi Molgo - Université Paris-Saclay, CEA, CNRS 9004, Service d'Ingénierie Moléculaire pour la Santé, Gif-sur-Yvette

Catherine Quiblier - UMR Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes, MNHN Paris

Pierre Rustin - NeuroDiderot, Inserm, Univ Paris Cité

Antoine Taly - Laboratoire de Biochimie Théorique, CNRS, Univ Paris Cité

Marc Verleye - Biocodex, Département de Pharmacologie, Compiègne

- **Internationales**

Andrea Bourdelais - Center for Marine Science, Univ of North Carolina, Wilmington, USA.

Margot Ernst - Dept of Pathobiology of the Nervous System Center for Brain Research, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

Ziad Fajloun - Lab Applied Biotechnology, Azm Center for Research in Biotechnology and its Applications, EDST, Lebanese University, Tripoli, Lebanon

Richard Lewis - Institute for Molecular Bioscience, Univ of Queensland, Brisbane, Australia

Agenor Limon - Dept of Neurology, Mitchell Center for Neurodegenerative Diseases, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

Wei Lu - Synapse and Neural Circuit Section, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NIH, Bethesda, USA

Irina Vetter - Univ of Queensland, Institute for Molecular Biosciences, Brisbane, Australia

Katharine Zimmermann - Dept of Anesthesiology, Erlangen University Hospital, Friedrich Alexander University of Erlangen-Nuremberg (FAU), Erlangen, Germany

### **3.3. Encadrement**

- **Post-doctorant (1)**

- **Florian Beignon** (2022-2024) – « Identification et caractérisation d'une isoforme mitochondriale du canal TRPV1 humain ». Co-encadrement avec Guy Lenaers

- **Doctorants (6)**

- **Léa Tuifua** (2023-2026) – « Lien entre métabolisme énergétique et thermogénèse : implication dans le coup de chaleur d'exercice et la détection de nouveaux biomarqueurs ». Co-encadrement avec Guy Lenaers et Alexandra Malgoyre
- **Christina Sahyoun** (2022-2024) – « Caractérisation de substances naturelles actives sur la fonction cardio-vasculaire à partir de venin de la vipère libanaise, *Montivipera bornmuelleri* et d'une chimiothèque d'alcaloïdes de plantes ». Co-encadrement avec Christian Legros et Ziad Fajloun
- **Florian Beignon** (2018-2022) – « Identification et caractérisation d'une isoforme mitochondriale du canal TRPV1 humain ». Co-encadrement avec Guy Lenaers - <https://theses.fr/2022ANGE0016>
- **Jacinthe Frangieh** (2019-2022) – « Caractérisation pharmacologique de substances naturelles actives sur canaux ioniques : exemples du venin de la vipère libanaise *Montivipera bornmuelleri* et d'alcaloïdes isoquinolines d'origine végétale ». Co-encadrement avec Christian Legros et Ziad Fajloun - <https://theses.fr/2021ANGE0039>
- **Zineb Soualah** (2015-2020) – « Etude de l'influence de la composition en sous-unités des récepteurs GABA de type A sur leur sensibilité à deux agents pharmacologiquement actifs, le fipronil et l'étifoxine ». Co-encadrement avec Christian Legros - <https://theses.fr/2021ANGE0017>
- **Stéphanie Pineau** (2011-2012) – « Mécanismes d'action cellulaires et physiologiques des composés de la mélisse (*Melissa officinalis* L.) et de la valériane (*Valeriana officinalis* L.) - Caractérisation et perspectives d'applications pharmaceutiques et phytosanitaires ». Thèse de pharmacie. Co-encadrement avec Christian Legros - <https://dune.univ-angers.fr/fichiers/20060226/2011PPHA418/presentation/418P.pdf>

- **Master 2 (10)**

- **Léa Tuifua** (2022) – « Caractérisation de l'influence du canal TRPV1<sub>mito</sub> sur la respiration mitochondriale » - Université de Montpellier
- **Margaux Notais** (2021) – « Caractérisation pharmacologique du récepteur TRPV1 mitochondrial » - Université d'Angers
- **Clara Houdayer** (2021) – « Caractérisation électrophysiologique d'une nouvelle canalopathie liée au gène HCN2 chez des patients présentant une encéphalopathie épileptique » - Université Paris-Diderot
- **Simon Colas** (2020) – « Contribution à l'étude de l'anatoxine-a, une cyanotoxine aquatique : aspects écologiques, toxicologiques et pharmacologiques » - Université d'Angers
- **Florian Beignon** (2018) – « Identification d'une isoforme mitochondriale du canal TRPV1 – Rôle dans la sensibilité thermique et cible intracellulaire d'agents toxiques ? » - Université d'Angers
- **Joohee Park** (2017) – « Analyse toxicologique des effets d'insecticides néonicotinoïdes in vivo chez le rat » - Université d'Angers
- **Valentine Clavier** (2016) – « Mise au point d'un test de criblage cellulaire pour la recherche de ligands sodium dépendants du potentiel » - Université d'Angers
- **Lucille Crespin** (2014) – « Mise au point d'une méthode électrophysiologique pour l'étude comparée des effets d'insecticides néonicotinoïdes sur des récepteurs natifs de mammifères et d'insectes » - Université d'Angers
- **Ophélie Saulais** (2012) – « Influence de la composition en sous-unités des récepteurs au GABA de mammifères sur leur sensibilité au fipronil » - Université d'Angers
- **Yves Montourroy** (2005) – « La problématique du mouflon corse à travers l'étude de sa valeur emblématique en Corse » - Université de Bordeaux

- **Nicolas Croce** (2005) – « Cartographie des aires de chasse dans le centre Corse à l'aide d'une méthodologie SIG » - Université de Corse
- **Lelia Graziani** (2004) – « Enjeux de la conservation du mouflon en Corse à travers un projet européen LIFE-Nature – analyse du recouvrement végétal » - Université de Corse
- **Master 1 (5)**
- **Samuel Teitgen** (2024) – « Analyse des effets pharmacologiques de venins de scorpion sur le canal TRPV1 humain » - Université d'Angers
- **Margaux Notais** (2020) – « Le canal TRPV1, un récepteur polymodal cible de nombreuses neurotoxines » - Université d'Angers
- **Léa Réthoré** (2018) – « Le brévénal antagonise les effets activateurs de neurotoxines et d'insecticides sur le canal sodium voltage-dépendant » - Université d'Angers
- **Joohee Park** (2016) – « Mise en évidence électrophysiologique des effets d'insecticides néonicotinoïdes sur le récepteur nicotinique  $\alpha 3\beta 4$  de rat » - Université d'Angers
- **Céline Alamichel** (2012) – « Etude de la modulation d'un récepteur GABA extra-synaptique de mammifère par l'éthifoxine » - Université d'Angers

### 3.4. Alumni [en 2024]

- **Florian Beignon** – Post-doctorant (Unité Mitolab – Angers)
- **Margaux Notais** – Chargée de sécurité/toxicologie réglementaire (Sothys – Brive-la-Gaillarde)
- **Clara Houdayer** – Assistante de hôpitaux (CHU-Angers)
- **Jacinthe Frangieh** – Post-doctorante (Institut Pasteur – Paris)
- **Simon Colas** – Doctorant/postdoc en écotoxicologie (Université de Pau)
- **Joohee Park** – IE (Unité MINT – UA)
- **Zineb Soualah** – IR (Institut de la Vision – Paris)
- **Stéphanie Pineau** – Pharmacienne officine (Saint-Varent)

- **Yves Montourroy** – MCF Université des Antilles (Pôle Guadeloupe)

### 3.5. Publications

(\*auteur correspondant ; encadrement). Les facteurs d'impact (FI) sont indiqués pour l'année 2023.

#### 3.5.1. Revues à comité de lecture

LIMON A, MATTEI C\* (2023). The Xenopus Oocyte: A Tool for Membrane Biology. *Membranes* 13(10): 831. doi: 10.3390/membranes13100831. FI 4.2

PARK J, PROUX C, EHANNO W, RÉTHORÉ L, VESSIÈRES E, BOURREAU J, FAVRE J, KAUFFENSTEIN G, MATTEI C, TRICOIRE-LEIGNEL H, HENRION D, LEGENDRE C, LEGROS C (2023). Tetrodotoxin Decreases the Contractility of Mesenteric Arteries, Revealing the Contribution of Voltage-Gated Na<sup>+</sup> Channels in Vascular Tone Regulation. *Mar Drugs*. 21(3):196. doi: 10.3390/md21030196. FI 5.4

SAHYOUN C, KHOURY M, MOUAWAD C, DARAZY D, ROUFAYEL R, MATTEI C, FAJLOUN Z, LEGROS C, KARAM M (2023). *Apis mellifera syriaca* venom modulates splenic cytokines levels in BALB/c mice. *Infect Disord Drug Targets*. Jun 23. doi: 10.2174/1871526523666230623152045. FI 1.3

BEIGNON F, GUEGUEN N, TRICOIRE-LEIGNEL H, MATTEI C, LENAERS G (2022). The multiple facets of mitochondrial regulations controlling cellular thermogenesis. *Cell Mol Life Sci*. Sep 79(10):525. doi: 10.1007/s00018-022-04523-8. FI 8

COQUEREL Q, LEGENDRE C, FRANGIEH J, WAARD S, MONTNACH J, CMARKO L, KHOURY J, HASSANE CS, BRÉARD D, SIEGLER B, FAJLOUN Z, DE POMYERS H, MABROUK K, WEISS N, HENRION D, RICHOMME P, MATTEI C, DE WAARD M, LE RAY AM, LEGROS C (2022). Screening an In-House Isoquinoline Alkaloids Library for New Blockers of Voltage-Gated Na<sup>+</sup> Channels Using Voltage Sensor Fluorescent Probes: Hits and Biases. *Molecules*. 27(13): 4133. doi: 10.3390/molecules27134133. FI 4.6

SAHYOUN C, KREZEL W, MATTEI C, SABATIER JM, LEGROS C, FAJLOUN Z, RIMA M (2022). Neuro- and Cardiovascular Activities of *Montivipera bornmuelleri* Snake Venom. *Biology* 11(6): 888. doi: 10.3390/biology11060888. FI 4.2

SAHYOUN C, RIMA M, MATTEI C, SABATIER JM, FAJLOUN Z, LEGROS C (2022). Separation and Analytical Techniques Used in Snake Venomics: A Review Article. *Processes* 10(7): 1380. doi: 10.3390/pr10071380. FI 3.5

MATTEI C\*, TRICOIRE-LEIGNEL H, LEGROS C, LEWIS RJ, MOLGÓ J (2022). Pharmacological Aspects of Ligand-Gated Ion Channels as Targets of Natural and Synthetic Agents. *Front Neurosci*. 16:895299. doi: 10.3389/fnins.2022.895299. FI 4.3

RETHORE L, PARK J, MONTNACH J, NICOLAS S, KHOURY J, LE SEAC'H E, MABROUK K, DE POMYERS H, TRICOIRE-LEIGNEL H, MATTEI C, HENRION D, FAJLOUN Z, DE WAARD M, LEGENDRE C, LEGROS C (2022). Pharmacological Dissection of the Crosstalk between Nav and Cav Channels in GH3b6 Cells. *Int J Mol Sci*. 23: 827. doi: 10.3390/ijms23020827. FI 5.6

RETHORE L, PARK J, MONTNACH J, NICOLAS S, KHOURY J, LE SEAC'H E, MABROUK K, DE POMYERS H, TRICOIRE-LEIGNEL H, MATTEI C, HENRION D, FAJLOUN Z, DE WAARD M, LEGENDRE C, LEGROS C (2022). Oxostephanine, Thalamiculine, and Thaliphyline - Three Isoquinoline Alkaloids That Inhibit L-Type Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels. *Fut. Pharmacol*. 2(3): 238-255. doi: 10.3390/futurepharmacol2030016

- SOUALAH Z, TALY A, CRESPIAN L, SAULAIS O, HENRION D, LEGENDRE C, TRICOIRE-LEIGNEL H, LEGROS C\*, [MATTEI C\\*](#) (2021). GABA<sub>A</sub> receptor subunit composition drives its sensitivity to the insecticide fipronil. *Frontiers in Neuroscience* 15: 768466. doi: 10.3389/fnins.2021.768466. FI 4.3
- PARK J, TALY A, BOURREAU J, DE NARDI F, LEGENDRE C, HENRION D, GUÉRINEAU NC, LEGROS C, [MATTEI C\\*](#), TRICOIRE-LEIGNEL H\* (2021). Partial Agonist Activity of Neonicotinoids on Rat Nicotinic Receptors: Consequences over Epinephrine Secretion and In Vivo Blood Pressure. *Int J Mol Sci.* 22(10): 5106. doi: 10.3390/ijms22105106. FI 5.6
- COLAS S, MARIE B, LANCE E, QUIBLIER C, TRICOIRE-LEIGNEL H\*, [MATTEI C\\*](#). (2021). Anatoxin-a: Overview on a harmful cyanobacterial neurotoxin from the environmental scale to the molecular target. *Environ Res.* 193: 110590. doi: 10.1016/j.envres.2020.110590. FI 8.3
- FRANGIEH J, RIMA M, FAJLOUN Z, HENRION D, SABATIER JM, LEGROS C, [MATTEI C\\*](#). (2021). Snake Venom Components: Tools and Cures to Target Cardiovascular Diseases. *Molecules* 26: 2223. doi: 10.3390/molecules26082223. FI 4.6
- MACKIEH R, ABOU-NADER R, WEHBE R, [MATTEI C](#), LEGROS C, FAJLOUN Z, SABATIER JM. (2021). Voltage-Gated Sodium Channels: A Prominent Target of Marine Toxins. *Mar Drugs.* 19(10): 562. doi: 10.3390/md19100562. FI 5.4
- ARNICH N, ABADIE E, AMZIL Z, DECHRAOUI BOTTEIN MY, COMTE K, CHAIX E, DELCOURT N, HORT V, [MATTEI C](#), MOLGÓ J, LE GARREC R. (2021). Guidance Level for Brevetoxins in French Shellfish. *Mar. Drugs* 19(9):520. doi: 10.3390/md19090520. FI 5.4
- ARNICH N, ABADIE E, DELCOURT N, FESSARD V, FRÉMY JM, HORT V, LAGRANGE E, MAIGNIEN T, MOLGO J, PEYRAT MB, VERNOUX JP, [MATTEI C](#). (2020). Health risk assessment related to pinnatoxins in French shellfish. *Toxicon* 180: 1-10. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.03.007. FI 2.8
- [MATTEI C\\*](#), TALY A, SOUALAH Z, SAULAIS O, HENRION D, GUÉRINEAU NC, VERLEYE M, LEGROS C\*. (2019). Involvement of the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$  subunit in the mode of action of etifoxine. *Pharmacol Res.* 145: 104250. doi: 10.1016/j.phrs.2019.04.034. FI 9.3
- DELCOURT N, LAGRANGE E, ABADIE E, FESSARD V, FRÉMY JM, VERNOUX JP, PEYRAT MB, MAIGNIEN T, ARNICH N, MOLGÓ J, [MATTEI C\\*](#). (2019). Pinnatoxins' Deleterious Effects on Cholinergic Networks: From Experimental Models to Human Health. *Mar Drugs* 17(7). pii: E425. doi: 10.3390/md17070425. FI 5.4
- FRANGIEH J, SALMA Y, HADDAD K, [MATTEI C](#), LEGROS C, FAJLOUN Z, EL OBEID, D. (2019). First characterization of the venom from *Apis mellifera syriaca*, a honeybee from the Middle East region. *Toxins* 11(4). pii: E191. doi: 10.3390/toxins11040191. FI 4.2
- [MATTEI C\\*](#) (2018). Tetrodotoxin, a candidate drug for Nav1.1-induced mechanical pain? *Mar Drugs* 16(2). pii: E72. doi: 10.3390/md16020072. FI 5.4
- DELCOURT N, CLAUDEPIERRE T, MAIGNIEN T, ARNICH N, [MATTEI C\\*](#) (2017). Cellular and molecular aspects of the  $\beta$ -N Methylamino-l-alanine (BMAA) mode of action within the neurodegenerative pathway: facts and controversy. *Toxins* 10(1) pii: E6. doi: 10.3390/toxins10010006. FI 4.2
- PINEAU S., LEGROS C., [MATTEI C\\*](#). (2016). The medical use of lemon balm (*Melissa officinalis*) and valerian (*Valeriana officinalis*) as natural sedatives: insight into their interactions with GABA transmission. *Int J Clin Pharmacol Pharmacother* 1: 112. doi : 10.15344/2456-3501/2016/112. FI 1
- CRESPIAN L, LEGROS C, LIST O, TRICOIRE-LEIGNEL H, [MATTEI C\\*](#) (2016). Injection of insect membrane in *Xenopus* oocyte: An original method for the pharmacological characterization of neonicotinoid insecticides. *J Pharmacol Toxicol Methods* 77:10-16. doi: 10.1016/j.vascn.2015.09.004. FI 1.9
- BENOIT E, [MATTEI C](#), BARBIER J, MARCHOT P, MOLGO J, SERVENT D. (2014). Special Issue on "freshwater and marine toxins". *Toxicon* 91:1-4. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.11.217. FI 2.8

- MATTEI C\*, MOLGO J, BENOIT E. (2014). Involvement of both sodium influx and potassium efflux in ciguatoxin-induced nodal swelling of frog myelinated axons. *Neuropharmacology* 85: 417-426. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.06.001. FI 5.3
- MATTEI C, VETTER I, EISENBLÄTTER A, KROCK B, EBEBECKE M, DESEL H, ZIMMERMANN K. (2014). Ciguatera fish poisoning: a first epidemic in Germany highlights an increasing risk for European countries. *Toxicon* 91: 76-83. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.10.016. FI 2.8
- MATTEI C\*, LEGROS C (2014). The voltage-gated sodium channel: a major target of marine neurotoxins. *Toxicon* 91: 84-95. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.09.016. FI 2.8
- MATTEI C, MARQUAIS M, SCHLUMBERGER S, MOLGÓ J., VERNOUX JP, LEWIS RJ, BENOIT E (2010). Analysis of Caribbean ciguatoxin-1 effects on frog myelinated axons and the neuromuscular junction. *Toxicon*. 56: 759-767. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.07.026. FI 2.8
- NGUYEN-HUU TD, MATTEI C, WEN PJ, BOURDELAIS AJ, LEWIS RJ, BENOIT E, BADEN DG, MOLGÓ J, MEUNIER FA (2010). Ciguatoxin-induced catecholamine secretion in bovine chromaffin cells: mechanism of action and reversible inhibition by brevenal. *Toxicon* 56: 792-796. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.08.002. FI 2.8
- SCHLUMBERGER S, MATTEI C, MOLGÓ J, BENOIT E (2010). Dual action of a dinoflagellate-derived precursor of Pacific ciguatoxins (P-CTX-4B) on voltage-dependent K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> channels of single myelinated axons. *Toxicon* 56: 768-775. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.06.035. FI 2.8
- MATTEI C, WEN PJ, NGUYEN-HUU TD, ALVAREZ M, BENOIT E, BOURDELAIS AJ, LEWIS RJ, BADEN DG, MOLGO J, MEUNIER FA (2008) Brevenal inhibits Pacific ciguatoxin-1B-induced neurosecretion from bovine chromaffin cells. *Plos ONE* 3(10): e3448. doi:10.1371/journal.pone.0003448. FI 3.8
- KIDJO N, FERACCI G, BIDEAU E, GONZALEZ G, MATTEI C, MARCHAND B, AULAGNIER S (2007) Extirpation and reintroduction of the Corsican red deer *Cervus elaphus corsicanus* in Corsica. *Oryx* 41 : 488-494. doi : 10.1017/S0030605307012069. FI 3
- FONFRIA E, MATTEI C, HILL K. BROWN JT, RANDALL A, BENHAM CD, SKAPER SD, CAMPBELL CA, CROOK B, MURDOCK PR, WILSON JM, MAURIO FP, OWEN DE, TILLING PL, McNULTY S (2006) TRPM2 is elevated in the tMCAO stroke model, transcriptionally regulated, and functionally expressed in C13 microglia. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 26(3): 179-198. doi: 10.1080/10799890600637522. FI 2.6
- JAIMOVICH E, MATTEI C, LIBERONA JL, CARDENAS C, ESTRADA M, BARBIER J, DEBITUS C, LAURENT D, MOLGÓ J (2005) Xestospongine B, a competitive inhibitor of IP3-mediated Ca<sup>2+</sup> signalling in cultured rat myotubes, isolated myonuclei, and neuroblastoma (NG108-15) cells. *FEBS Letters* 579(10): 2051-2057. doi: 10.1016/j.febslet.2005.02.053. FI 3.9
- RICCIO A, MATTEI C, KELSELL R, MEDHURST A, CALVER A, RANDALL A, DAVIS J, BENHAM C, PANGALOS M (2002) Cloning and functional expression of human short TRP7, a candidate protein for store-operated Ca<sup>2+</sup> influx. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14): 12302-12309. doi: 10.1074/jbc.M112313200. FI 5.5
- RICCIO A, MEDHURST A, MATTEI C, KELSELL R, CALVER A, RANDALL A, BENHAM C, PANGALOS M (2002) mRNA Distribution Analysis of human TRPC Family in CNS and Peripheral Tissues. *Molecular Brain Research*, 109(1-2): 95-104. doi: 10.1016/s0169-328x(02)00527-2. FI 2.9
- BENOIT E, MATTEI C, OUANOUNOU G, MEUNIER FA, SUPUT D, LE GALL F, MARQUAIS M, DECHRAOUI MY, MOLGÓ J (2002) Ionic mechanisms involved in the nodal swelling of myelinated axons caused by marine toxins. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7(2):317-321. PMID: 12097977. FI 1.5
- MEUNIER FA, MATTEI C, CHAMEAU P, LAWRENCE G, COLASANTE C, KREGER AS, DOLLY JO, MOLGÓ J (2000) Trachynilysin mediates SNARE-dependent release of catecholamines from chromaffin cells via external and stored Ca<sup>2+</sup>. *Journal of Cell Science*, 113(7): 1119-1125. doi: 10.1242/jcs.113.7.1119. FI 4

MATTEI C, POMPA C, THIEFFRY M, KREGER AS, MOLGÓ J (2000) Trachynilysin, a toxin isolated from stonefish *Synanceia trachynis* venom, forms pores in planar lipid bilayers. *Cybum*, 24(3) suppl.: 141-148. FI 0.9

BENOIT E, LAURENT D, MATTEI C, LEGRAND AM, MOLGÓ J (2000) Reversal of Pacific Ciguatoxin-1B effects on myelinated axons by agents used in ciguatera treatment. *Cybum*, 24(3) suppl.: 33-40. FI 0.9

MATTEI C, MOLGÓ J, MARQUAIS M, VERNOUX JP, BENOIT E (1999) Hyperosmolar D-mannitol reverses the increased membrane excitability and the nodal swelling caused by Caribbean ciguatoxin-1 in single frog myelinated axons. *Brain Research*, 847: 50-58. doi: 10.1016/s0006-8993(99)02032-6. FI 2.9

MATTEI C, DECHRAOUI MY, MOLGÓ J, MEUNIER FA, LEGRAND AM, BENOIT E (1999) Neurotoxins targeting receptor site 5 of voltage-dependent sodium channels increase the nodal volume of myelinated axons. *Journal of Neuroscience Research*, 55(6): 666-673. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19990315)55:6<666::AID-JNR2>3.0.CO;2-H. FI 4.2

LEGALL F, FAVREAU P, BENOIT E, MATTEI C, BOUET F, MENOUE JL, MENEZ A, LETOURNEUX Y, MOLGÓ J (1999) A new conotoxin isolated from *Conus consors* venom acting selectively on axons and motor nerve terminals through a Na<sup>+</sup>-dependent mechanism. *European Journal of Neuroscience* 11: 3134-3142. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00732.x. FI 3.4

MATTEI C, MOLGÓ J, JOSEPH X, ISRAE, M, BLOY C. (1999) Naftazone reduces glutamate cerebro spinal fluid levels in rats and glutamate release from mouse cerebellum synaptosomes. *Neuroscience Letters*, 271(3): 183-186. doi: 10.1016/s0304-3940(99)00552-2. FI 2.5

MATTEI C, MOLGÓ J, LEGRAND AM, BENOIT E (1999) Ciguatoxins and brevetoxins: dissection of the neurobiological actions. *J. Soc. Biol.*, 193(3): 329-344. PMID: 10542966.

MATTEI C, ELMORJANI K, MOLGÓ J, MARION D, BENOIT E (1998) The wheat proteins puroindoline-a and a1-purothionin induce nodal swelling in myelinated axons. *NeuroReport*, 9: 3803-3807. doi: 10.1097/00001756-199812010-00007. FI 1.7

MATTEI C, BENOIT E, JUZANS P, LEGRAND AM, MOLGÓ J (1997) Gambiertoxin (CTX-4B), purified from wild *Gambierdiscus toxicus* dinoflagellates, induces Na<sup>+</sup>-dependent swelling of single frog myelinated axons and motor nerve terminals in situ. *Neuroscience Letters*, 234: 75-78. doi: 10.1016/s0304-3940(97)00665-4. FI 2.5

BROUILLAUD-DELATTRE A, MAIRE M, COLLETTE C, MATTEI C, LAHELLEC C (1997). Predictive microbiology of dairy products: influence of biological factors affecting growth of *Listeria monocytogenes*. *J. AOAC Int.*, 80: 913-919. PMID: 9241852. FI 1.6

### 3.5.2. Chapitres d'ouvrages

BENOIT E, MATTEI C, BROWN SC, MOLGÓ J (2017). Confocal microscopy and passive staining with the styryl dye FM1-43: a convenient method to evaluate morphometric changes in nodes of Ranvier of single living myelinated axons. In "Microscopy and imaging science: practical approaches to applied research and education", Publisher: Formatex Research Center, Editors: A. Méndez-Vilas, pp.73-80

MEUNIER FA, MATTEI C, MOLGO J. (2009) Marine toxins potentially affecting neurotransmitter release. N. Fusetani and W. Kem (eds.), *Marine Toxins as Research Tools*, Marine Molecular Biotechnology. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg). *Prog. Mol. SubCell. Biol.* 46: 159-186. doi: 10.1007/978-3-540-87895-7\_6

MEUNIER FA, OUANOUNOU G, MATTEI C, CHAMEAU P, COLASANTE C, USHKARYOV Y, DOLLY JO, KREGER AS, MOLGÓ J (2002) Neurotoxins from Stonefish and Related Species dans *Handbook of Neurotoxicology I* (ed. E.J. Massaro), publié par Humana Press, Totowa, New-Jersey, 595-616

MOLGÓ J, MEUNIER FA, DECHRAOUI MY, BENOIT E, MATTEI C, LEGRAND AM (1998) Sodium-dependent alterations of synaptic transmission mechanisms by brevetoxins and ciguatoxins dans *Harmful Algae* (eds B.

Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt), publié par Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 594-597

BENOIT E, MEUNIER FA, MATTEI C, JUZANS P, LEGRAND AM, MOLGÓ J (1998) Do sodium ion influx through ciguatoxin-modified voltage-dependent sodium channels induce swelling of the myelinated nerves and neuroblastoma cells? dans Harmful Algae (eds B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández & T. Wyatt), publié par Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 590-593

# **4. Projets de recherche**

Cette partie aborde les projets déjà réalisés. La plupart a trouvé sa concrétisation dans des publications, certains doivent faire prochainement l'objet de publications. J'ai choisi de ne présenter que les principales réalisations effectuées depuis mon recrutement comme MCF à l'UA. Je n'aborde donc ici ni les travaux de thèse, ni ceux de mes post-doctorats, même si dans une large mesure mes projets actuels s'inscrivent dans la continuité de ceux que j'ai entrepris dans un passé plus lointain.

#### 4.1. Neurotoxines et perturbations fonctionnelles

Un grand nombre de toxines produites par des organismes unicellulaires (bactéries, microalgues), des végétaux ou des animaux, agit sur le système nerveux périphérique et central. Au cours de ma thèse, j'ai abordé la question du mode d'action – cellulaire et moléculaire – de plusieurs de ces neurotoxines, susceptibles de causer des problèmes de santé publique. J'ai pu à cette occasion me familiariser avec la vaste hétérogénéité de ce que l'on appelle les toxines, dont la nature chimique revêt la forme d'un peptide, d'une protéine, d'un acide aminé modifié, ou des structure complexes comme des polyéthers et des imines cycliques.

Ces toxines agissent le plus souvent sur un récepteur membranaire, notamment des canaux ioniques (Figure 3), à des concentrations nano- ou micro-molaires. Cette interaction Ligand/Récepteur est au cœur de mes travaux de recherche car elle m'a permis :

- de décrire le mode d'action d'une toxine
- d'envisager les perturbations induites au niveau de son (ou ses) récepteur(s)
- de caractériser les conséquences fonctionnelles de cette interaction
- de comprendre comment l'évolution peut peser sur un organisme pour produire des outils très spécifiques de sa cible
- d'anticiper comment il serait possible d'utiliser à des fins vertueuses l'usage d'une molécule initialement décrite comme toxique
- de cheminer sur la compréhension des canalopathies innées ou induites, c'est-à-dire les maladies humaines liées à un défaut de fonctionnement d'un canal ionique

Ainsi, **toxine** et **canal ionique** ont été – dans une perspective globalement pharmacologique et physiologique – les deux mots-clefs du travail initié dans le cadre de mes travaux de recherche. Plus que simplement une somme de projets, l'interaction toxines/canal ionique constitue véritablement la base de ma culture scientifique et de mon historique professionnel. Je les ai bâtis en grande partie grâce aux rencontres faites tout au long de ces années, mais je dois ici saluer (1) la mémoire de Max

Goyffon (1935-2020), professeur au Muséum National d'Histoire naturelle, grand spécialiste des scorpions et de la fonction venimeuse et directeur du Master 2 de Toxicologie que j'ai eu la chance d'intégrer pour sa première promotion (1995-1996) et (2) Jordi Molgo, mon directeur de thèse avec lequel j'ai pu travailler jusqu'à très récemment, sur ce qui nous rassemble : les aspects mécanistiques des neurotoxines.

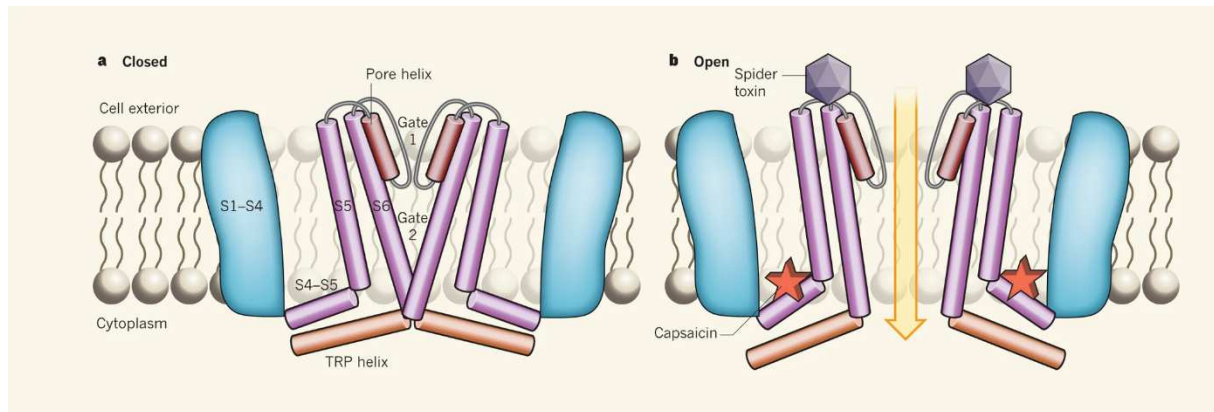


Figure 3 : représentation schématique de l'interaction de la capsaïcine (et la RTX, étoile rouge) et de la double-knot toxin (DkTx, hexagone gris) avec le canal TRPV1 (dont deux sous-unités sont représentées avec leurs segments transmembranaires S1-S6), sur la base des structures obtenues par cryo-microscopie électronique (Cao et al., 2013). a : à l'état fermé, deux portes sont apparentes, l'une au niveau de la surface extracellulaire (gate 1) et l'autre à l'intérieur du canal (gate 2). b, la porte 1 s'ouvre en réponse à la liaison de la DkTx. La porte 2 s'ouvre lors de la liaison de la capsaïcine (ou RTX). Le pore dissipe alors un courant Ca<sup>2+</sup> entrant (flèche jaune). D'après Henderson, 2013.

Nous sommes tout au long de notre existence exposés à des substances de l'environnement. Elles parviennent dans notre milieu intérieur par différentes voies : orale, respiratoire ou cutanée. Dans le cas des toxines, c'est à dire des biomolécules pourvues d'une activité délétère ou létale à faible concentration<sup>10</sup>, on constate que leurs effets sur la santé sont la conséquence d'une interaction souvent spécifique entre elles et des récepteurs que nous exprimons à la surface de nos cellules. Ainsi, une toxine est qualifiée de neurotoxine si elle interagit avec un ou des récepteur(s) largement exprimé(s) au niveau du système nerveux périphérique ou central. Caractériser les conséquences d'une interaction entre une neurotoxine et son récepteur membranaire, c'est tout à la fois éclairer le mode d'action de cette toxine et mieux comprendre le fonctionnement de ce récepteur. La connaissance des effets d'une toxine commence précisément par les perturbations qu'elle induit au niveau de la protéine, le plus souvent membranaire, avec laquelle elle interagit. Au-delà des neurotoxines, j'ai également été associé à des projets d'interaction ligand/récepteur s'intéressant à d'autres neurotoxiques.

<sup>10</sup> Cette définition me vient du Pr. André Ménez (CEA Saclay-MNHN) au cours d'une discussion à la cantine du CEA sur le plateau de Saclay, pendant ma thèse. Je l'ai conservée et la propose chaque année aux étudiants en toxicologie.

## 4.2. Projet 1 : le canal Nav et les canalopathies acquises

J'ai eu l'occasion de travailler sur le canal sodium sensible au potentiel de membrane (canal Nav) au cours de ma thèse, sous un angle neurophysiologique. J'ai poursuivi cette thématique à l'Université d'Angers avec l'idée d'objectiver l'utilisation d'un polyéther doté d'une affinité pour le canal Nav jouant un rôle protecteur contre des neurotoxines à l'origine d'intoxications humaines complexes. Le travail mené implique une approche pharmacologique *in vitro* (au laboratoire), ainsi qu'un angle éminemment toxicologique développé au sein d'un collectif d'experts à l'ANSES<sup>11</sup>.

### 4.2.1. Contexte scientifique : ciguatera et INFM<sup>12</sup>

Les êtres humains peuvent être exposés aux ciguatoxines (CTX) et brevétotoxines (BTX) par voie alimentaire (CTX et BTX), par inhalation d'aérosol (BTX) et par contact cutané (BTX) dans des zones géographiques où la ressource halieutique est contaminée (CTX) ou des efflorescences présentes en surface des eaux de mer (BTX) (Figure 5). Les symptômes associés à une exposition aux CTX et BTX sont assez proches et touchent principalement la sphère gastro-intestinale et le système nerveux (Figure 4).

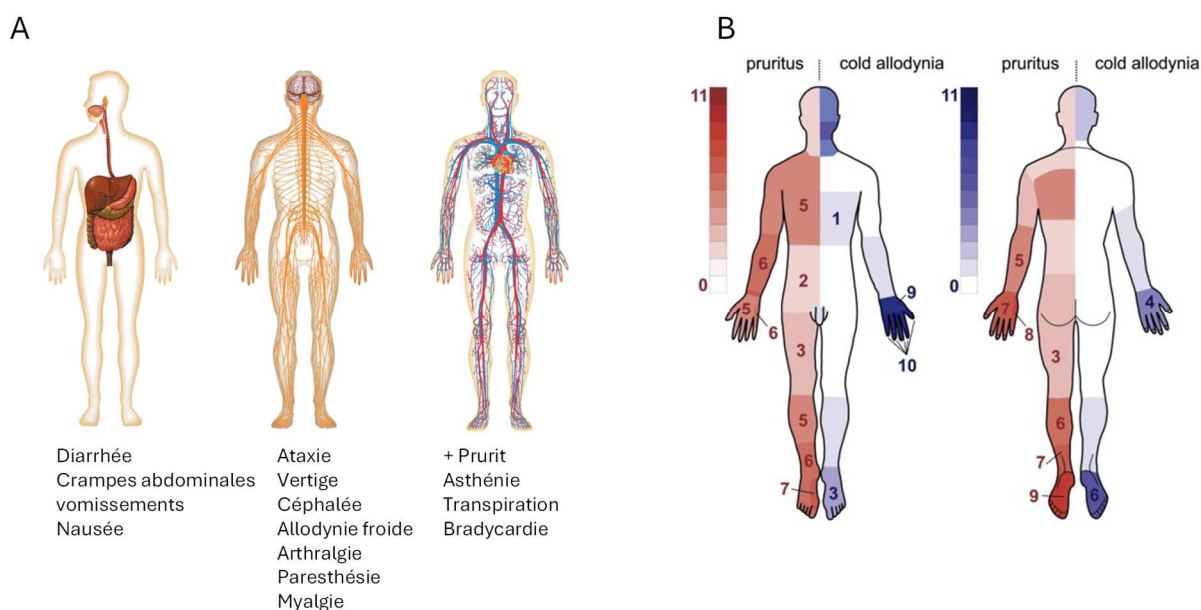


Figure 4 : Les symptômes associés à la ciguatera et aux INFM. A : liste des symptômes possibles. B : Représentation schématique de la distribution de l'allodynie froide (bleu) et du prurit (rouge) sur le corps de personnes pendant une intoxication ciguâtérique. D'après Mattei et al., 2014.

<sup>11</sup> <https://www.anses.fr/fr/content/br%C3%A9v%C3%A9to%C3%A9toxines-dans-les-coquillages-proposition-d%E2%80%99une-valeur-guide-pour-la-protection-des>

<sup>12</sup> Intoxication neurologique par fruits de mer

Les syndromes nommés ciguatera (CTX) et INFM (BTX) désignent les intoxications humaines liées à l'ingestion de poissons ou de coquillages contaminés respectivement par des CTX ou des BTX. Les symptômes débutent généralement entre 1 h et 24 h après l'exposition, et peuvent persister jusqu'à 3 jours. Les deux syndromes se caractérisent principalement par l'apparition de symptômes digestifs et neurologiques (Watkins et al. 2008). Plus précisément, les signes digestifs incluent des douleurs abdominales, nausées, vomissements et diarrhées (Figure 4). Les signes neurologiques comprennent essentiellement des paresthésies des lèvres et des extrémités des membres, des vertiges, une asthénie, ainsi qu'une paralysie partielle des membres, des troubles de l'élocution, une perte de coordination et un coma dans les cas les plus graves. Une inversion de la sensation de température – correspondant à une allodynie froide – une mydriase ainsi que des troubles cardio-vasculaires tel qu'une bradycardie et une hypotension artérielle ont également été rapportés (Friedman et al., 2017). Aucune mortalité n'est en général constatée lors d'épisodes de ciguatera et d'INFM.

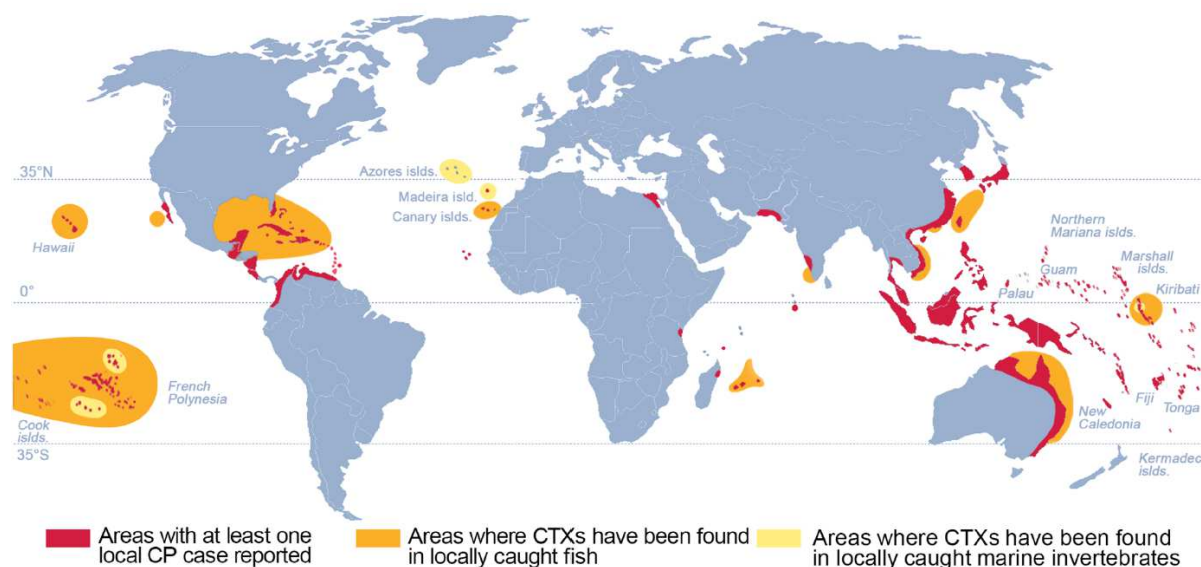


Figure 5 : Distribution géographique de la ciguatera et des ciguatoxines. CP : ciguatera poisoning ; CTXs : ciguatoxines. D'après Chinain et al., 2021.

La ciguatera est l'intoxication alimentaire humaine par voie marine la plus répandue au monde (Figure 5). C'est un problème général de santé publique par l'ampleur du phénomène observé et l'incidence qu'elle exerce dans les zones endémiques sur le mode de vie des populations humaines, l'activité touristique, l'économie des produits de la pêche et certaines activités de défense (OPEX, contrôle des activités nucléaires en Polynésie). Chaque année, 50 000 à 500 000 personnes sont touchés par ce syndrome alimentaire complexe (Skinner et al., 2011) pour lequel il n'existe aucun traitement spécifique. Les symptômes humains sont essentiellement gastro-intestinaux et neurologiques, parfois cardiovasculaires (Isbister et al., 2005) (Figure 4). Ils débutent 6 à 24 heures après la consommation de

poissons contaminés. Le diagnostic de ciguatera est orienté par le caractère systématique de certains symptômes et la consommation récente de produits de la mer. La prise en charge est essentiellement symptomatologique (Dickey & Plakas, 2010 ; Goodman et al., 2013).

Les INFM se caractérisent par « seulement » quelques centaines de cas d'intoxications humaines liées à la consommation de coquillages contaminés par les BTX décrits dans la littérature scientifique (ANSES, 2021). Le faible nombre de ces cas cliniques peut s'expliquer par la mise en place d'une réglementation très efficace de la commercialisation des fruits de mer via une surveillance de la présence des cellules productrices de BTX (le dinoflagellé *Karenia brevis*) le long des côtes américaines du Golfe du Mexique, ainsi qu'en Australie/Nouvelle-Zélande à l'occasion d'efflorescences algales nommées « marées rouges » (red tide, Figure 6). Le nombre de cas d'intoxications humaines reste cependant très probablement sous-estimé, y compris en Floride où cette intoxication est pourtant à déclaration obligatoire. Plus d'une dizaine de symptômes, essentiellement gastro-intestinaux, neurologiques et cardiovasculaires, peuvent être associés à une intoxication alimentaire par les BTX.



Figure 6 : efflorescence de la micro-algue *Karenia brevis*, sur le littoral floridien (©P.Schmidt). Potera, 2007

En plus de l'intoxication alimentaire, l'exposition aux BTX est possible via le contact direct avec de l'eau contaminée ou via l'inhalation d'embruns, lors de la pratique d'activités professionnelles ou de loisirs sur le littoral (ANSES, 2021). Les symptômes observés lors de l'exposition à des embruns chargés en BTX concernent les voies respiratoires : éternuements, rhinorrhée et irritation de la gorge, détresse

respiratoire (Watkins et al., 2008). Les symptômes apparaissent de quelques minutes à quelques heures (< 24 h) après l'exposition et se résorbent généralement dès que les individus quittent la zone contaminée. Les irritations respiratoires ne sont pas les seuls symptômes observés lors d'une efflorescence de *K. brevis*. Les aérosols contaminés par des BTX qui se déposent sur le visage et la peau peuvent également causer des irritations cutanées et oculaires (Kirkpatrick et al., 2004). Les professionnels qui travaillent dans des zones contaminées ont une probabilité haute de se trouver exposés aux BTX. Les personnes asthmatiques et celles présentant des problèmes respiratoires chroniques semblent être des populations plus sensibles à ce type d'exposition. De même, les femmes enceintes pourraient constituer une population sensible qui devrait éviter la fréquentation des plages lors d'épisodes d'efflorescences de *K. brevis*, compte-tenu de la capacité des BTX à franchir la barrière placentaire sur la souris gestante exposée à un aérosol de BTX (Benson et al., 2006).

#### **4.2.2. Le canal Nav, une cible de nombreuses neurotoxines**

Le canal Nav doit sa dimension historique aux travaux pionniers d'Hodgkin et Huxley qui utilisèrent la technique de « potentiel imposé » sur l'axone géant de calmar et décrivent la théorie ionique de l'excitation neuronale. Ce faisant, ils démontrèrent que l'excitabilité neuronale est la conséquence de flux d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  dans des directions opposées à l'intérieur et à l'extérieur de membrane (Hodgkin & Huxley, 1952). Les canaux  $\text{Na}^+$  (Nav décrit les canaux  $\text{Na}^+$  sensibles au potentiel de membrane) sont exprimés dans la majorité des cellules excitables telles que les neurones, cardiomyocytes, cellules musculaires lisses et squelettiques, et également certaines cellules non-excitables telles que les cellules endothéliales et tumorales. Leurs fonctions dans le déclenchement et la propagation de l'excitabilité cellulaire, sous la forme de potentiels d'action, sont relativement bien établies.

Ils constituent une cible pour de nombreuses toxines, qui en perturbent une ou plusieurs fonction(s) biophysique(s) et consécutivement la ou les fonction(s) physiologique(s) associée(s): contraction musculaire, douleur, neurotransmission etc. Ces canaux sont formés d'une sous-unité  $\alpha$ , qui contient le pore du canal, et une ou deux sous-unités  $\beta$ , qui influencent les propriétés biophysiques et l'expression de la sous-unité  $\alpha$ . Les gènes codant pour les sous-unités  $\alpha$  sont nommés SCN1A à SCN5A et SCN8A SCN11A, et correspondent aux protéines Nav 1.1 à 1.9, respectivement. Les gènes SCN1B à SCN4B codent les sous-unités  $\beta$ 1 à  $\beta$ 4. La sous-unité  $\alpha$  est une protéine de 260 kDa, formée par quatre domaines homologues, chacun constitué de six domaines transmembranaires (TM) et de leurs boucles

intra- et extra-cellulaires. Le pore du canal est bordé par les segments 5 et 6 des quatre domaines (Figure 7)<sup>13</sup>.

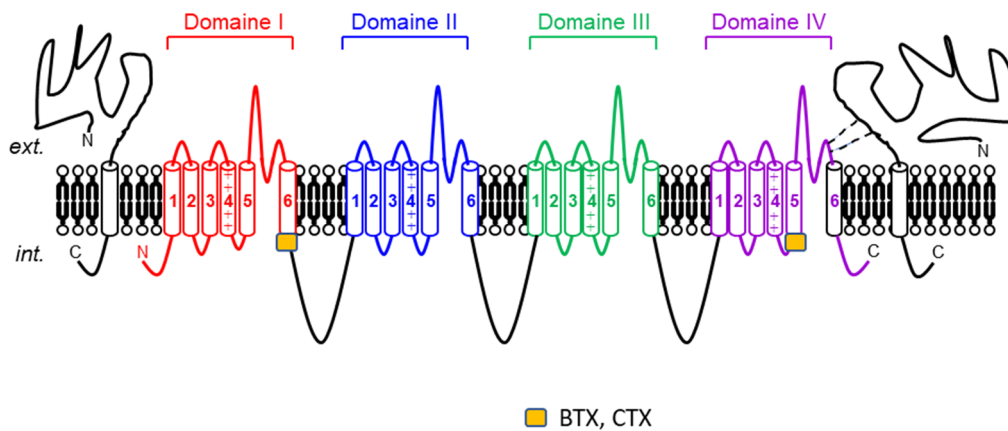


Figure 7 : Structure moléculaire du canal Nav. La sous-unité  $\alpha$  est constituée des domaines I à IV (en couleur sur le schéma), chacun formé de 6 segments transmembranaires (TM, numérotés de 1 à 6). Le pore du canal est bordé par les segments 5 et 6. Le TM4 est chargé positivement (via la présence de résidus arginines) et constitue le segment responsable de la sensibilité au potentiel. La sous-unité  $\alpha$  est liée à une ou deux sous-unités  $\beta$ , qui apparaissent à gauche et à droite du schéma. Les BTXs et les CTXs se lient à des acides aminés du TM6 du domaine I et du TM5 du domaine IV, correspondant au « site 5 ». D'après Mattei et Legros, 2014.

La sensibilité au potentiel de membrane est portée par des acides aminés du segment 4. Les canaux Nav existent sous trois états : fermé, ouvert ou inactivé (Figure 8). La fixation de neurotoxines sur le canal aboutit à une modification des certaines propriétés biophysiques du canal, en modulant ses états d'ouverture/fermeture ou d'inactivation. Les CTX et les brevétoxines BTX, produites par des microalgues unicellulaires dinoflagellées, se fixent sur le « site 5 » des canaux Nav, induisant leur activation en ralentissant la phase d'inactivation et en favorisant leur activation à des potentiels membranaires plus négatifs que le seuil normal d'activation de ces canaux (Figure 9). BTXs et CTXs peuvent donc être considérées comme des activateurs des canaux Nav. Ce faisant, elles dépolarisent les membranes des cellules neuronales et musculaires et augmentent leur excitabilité ainsi que des mécanismes intracellulaires dépendants du  $\text{Ca}^{2+}$ .

<sup>13</sup> Ces informations sont issues de ma contribution au rapport de l'ANSES sur les BTX [<https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2020SA0020Ra-b.pdf>]

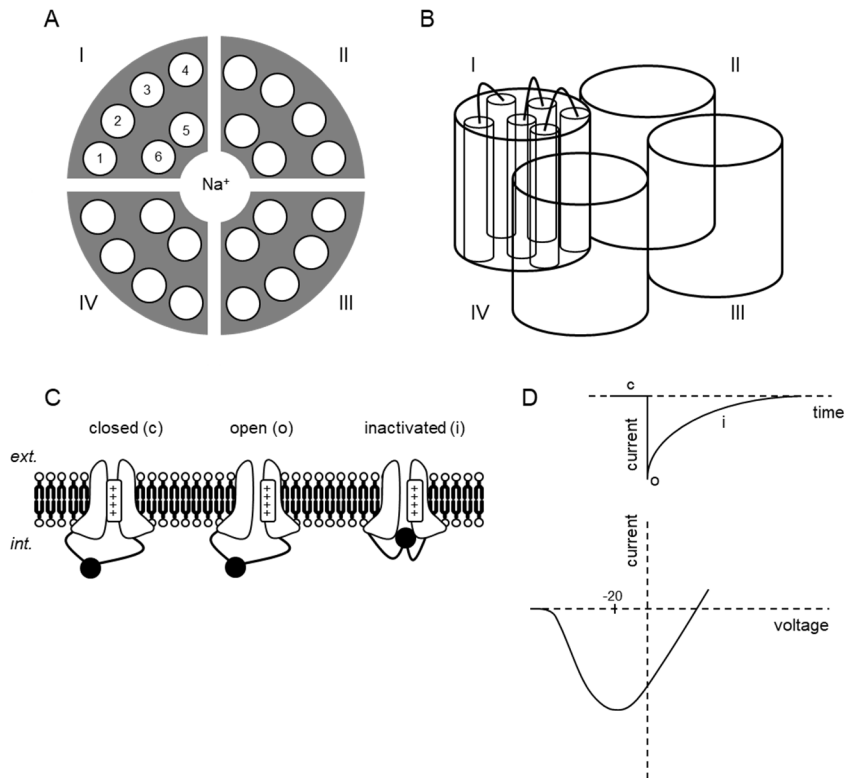


Figure 8 : Représentation schématique de la sous-unité  $\alpha$  du canal Nav et aspect fonctionnel. A et B : la sous-unité  $\alpha$  est composée de 4 domaines homologues (I à IV), chacun comprenant 6 segments transmembranaires. Les segments S5 et S6 forment le pore central et sélectif pour le  $\text{Na}^+$  du canal. C et D : mécanisme d'ouverture/fermeture du canal Nav. Au potentiel de repos, le canal est fermé (c). Le canal est ouvert (o) après une dépolarisation de la membrane qui déclenche le déplacement du segment S4. Le pore central est ensuite lié à la porte d'inactivation, ce qui conduit à l'inactivation du canal (i). Les tracés en D montrent un enregistrement en configuration potentiel imposé d'un neurone (suite à une dépolarisation) et la courbe courant-voltage correspondante. La trace supérieure représente la variation du courant pendant la dépolarisation. La déviation vers le bas de la courbe représente une entrée d'ions  $\text{Na}^+$  dans la cellule. Un courant entrant se développe rapidement (trace supérieure) et l'activation est maximale pour un potentiel de membrane de  $-20$  à  $0$  mV (courbe I/V). D'après Mattei & Legros, 2014.

Les conséquences fonctionnelles de ces altérations du fonctionnement normal des canaux Nav aboutissent à des symptômes assez hétérogènes chez les personnes qui ingèrent ces toxines au cours d'épisodes d'intoxication principalement par voie alimentaire (Figure 4). BTXs et CTXs sont en effet des molécules cycliques lipophiles, très stables (Figure 10), résistantes à la cuisson, et à l'origine de la ciguatera et des INFM (Watkins et al., 2008 ; Skinner et al., 2011). A la faveur du réchauffement climatique, on trouve depuis quelques années ces neurotoxines le long des côtes européennes (Otero et al., 2010; Arnich et al., 2021).

Ces toxines posent une véritable question de santé publique car il n'existe aucun traitement curatif ou préventif des intoxications dont elles sont à l'origine. Leur toxicité est très importante ( $\text{DL}_{50}$  inférieure à  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  chez la souris en voie i.p pour la P-CTX-1B) et si la mortalité induite au cours des épisodes d'intoxication est assez faible, voire inexistante, la morbidité est considérable (Achaibar et al., 2007).

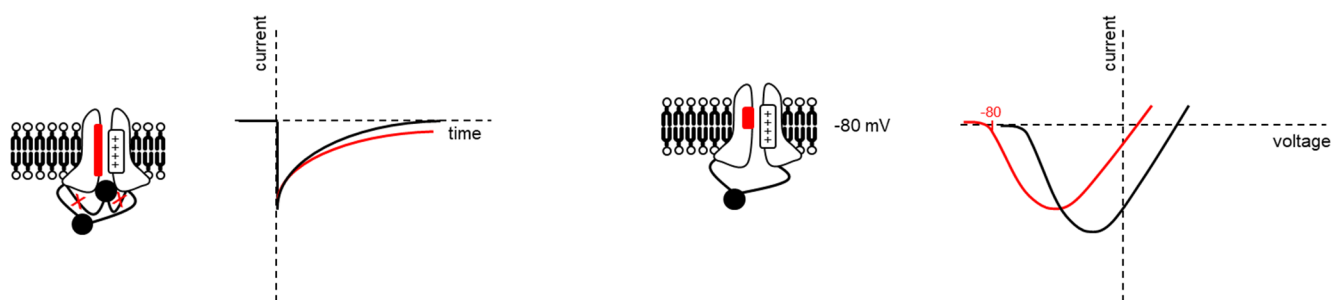


Figure 9 : Effets des CTXs et BTXs (rectangle rouge) sur les propriétés biophysiques des canaux Nav. A : les toxines déplacent la courbe d'activation du courant vers des potentiels négatifs (elle s'accompagne de la réduction de la valeur maximale du courant, et donc une diminution de la conductance). B : les toxines induisent un ralentissement de l'inactivation des canaux Nav, ce qui équivaut à une fermeture inaboutie du canal. L'interaction des CTXs/BTXs avec le site 5 du canal Nav induit des modifications allostériques, qui influencent positivement ou négativement les interactions d'autres neurotoxines avec d'autres sites de fixation. D'après Mattei & Legros, 2014.

#### 4.2.3. Problématique de recherche : le brevénal et le concept de "liaison silencieuse"

L'un de mes projets relatifs aux canaux  $\text{Na}_v$  est l'utilisation de molécules naturelles ciblant ces canaux pour les faire émerger comme de futurs remèdes aux canalopathies induites par la fixation de toxines. Parmi celles-ci, le brevénal (Figure 10) m'a rapidement intéressé : cette molécule purifiée à partir de *Karenia brevis*, a la capacité à se lier au canal  $\text{Na}_v$  et d'empêcher la fixation des BTXs et CTXs. Nous avons montré que les effets neuro-excitateurs des CTXs pouvaient être inhibés *in vitro* par le brevénal (Mattei et al., 2008 ; Nguyen-Huu et al., 2010). Il est un candidat-médicament pour traiter la mucoviscidose<sup>14</sup> (Potera, 2007).

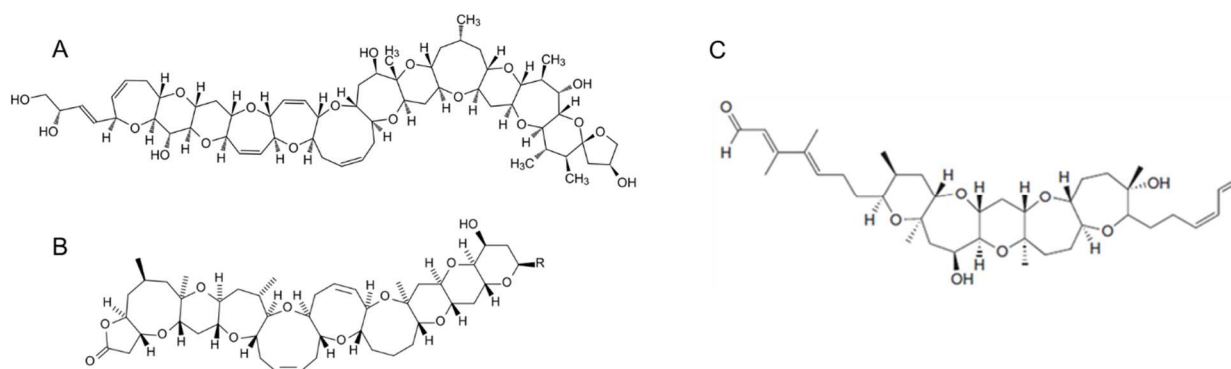


Figure 10 : structures chimiques des CTX (A), BTX (B) et du brevénal (C).

<sup>14</sup> <https://www.whqr.org/local/2018-09-04/marbioinc-in-wilmington-develops-new-potential-cystic-fibrosis-drug>

#### 4.2.4. Principaux résultats du Projet 1

Nous avons privilégié une approche pharmacologique *in vitro* pour caractériser le mode d'action du brévénal (Thèse de Lucille Crespin - inachevée). Dans un premier temps en mesurant l'innocuité du brévénal sur le courant  $\text{Na}^+$ , et sa capacité à contrer les effets d'une BTX. Pour ce faire, nous avons choisi l'ovocyte de xénope dans lequel a été surexprimé l'isoforme Nav1.2. La BTX-2 (50 nM) induit une diminution significative de l'amplitude du courant  $\text{Na}^+$  (Figure 11).

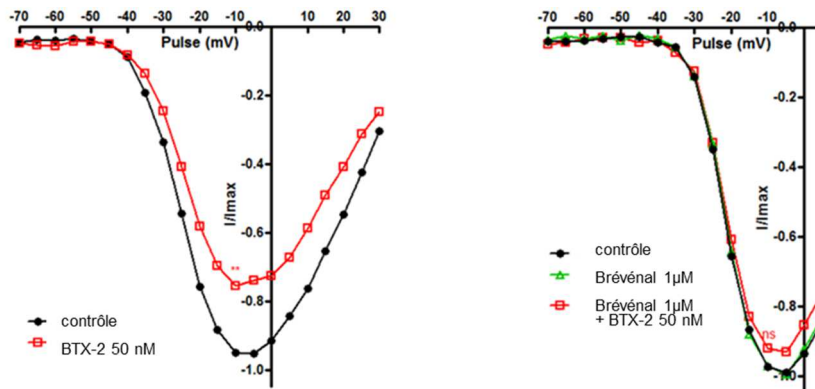


Figure 11 : Effet de la BTX-2 (50 nM) et du brévénal sur l'amplitude du courant  $\text{Na}^+$  en fonction du potentiel membranaire.

Cette inhibition est particulièrement marquée pour des potentiels membranaires de -20 à +20 mV. Le brévénal ne modifie pas la courbe courant/voltage. Lorsque le brévénal (1  $\mu\text{M}$ ) et la BTX-2 (50 nM) sont co-appliqués, on constate une absence d'inhibition du courant  $\text{Na}^+$ , ce qui indique que le brévénal, en se fixant aux canaux Nav, empêche la BTX-2 d'inhiber le courant  $\text{Na}^+$ . Ce résultat illustre très concrètement la capacité du brévénal à antagoniser les effets des BTX. Ces données montrent que le brévénal interagit de manière « silencieuse » avec les canaux Nav. Il ne déstabilise pas les propriétés biophysiques du canal mais exerce une activité antagoniste sur l'action de la BTX-2, qui elle-même réduit l'amplitude du courant  $\text{Na}^+$ .

Les résultats générés en imagerie calcique montrent que le brévénal a la capacité d'antagoniser l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}_i$  induite par les CTXs et BTXs, dans des cellules GH3 (Figure 12).

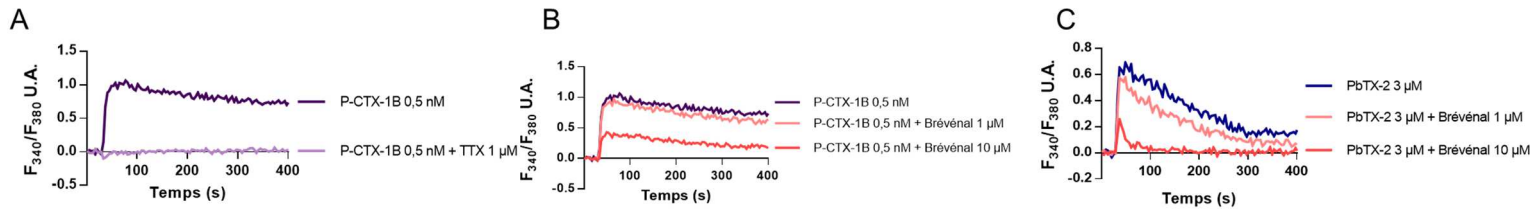


Figure 12 : Effet du brévénal sur le  $\text{Ca}^{2+}_i$  des cellules GH3. A. Cinétiques de l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}_i$  ( $F_{340}/F_{380}$ ) après addition de la ciguatoxine P-CTX-1B (0,5 nM), avec ou sans tétrodotoxine (TTX 1  $\mu\text{M}$  - A), avec ou sans brévénal (B). C Même expérience avec la brevététoxine PbTx-2 (3  $\mu\text{M}$ ) avec ou sans brévénal.

Ce résultat, mis en regard du précédent, suggère que le brévénal joue un rôle de ligand silencieux capable, pour une concentration micromolaire, de se lier au canal Nav et de masquer les sites de fixation des CTXs et BTXs, sans toutefois affecter les propriétés électrophysiologiques du canal. Les effets pharmacologiques du brévénal pourraient alors être exploités dans ce cadre de coopération/antagonisme avec plusieurs classes de molécules actives sur les canaux  $\text{Na}_v$ . A terme, on peut imaginer tester le brévénal sur un modèle animal exposé aux BTXs/CTXs, pour réduire voire annuler les conséquences d'une exposition toxique. Dans ce sens, le brévénal a fait l'objet d'une étude sur moutons intoxiqués aux BTXs et a montré des résultats significatifs quant à sa capacité à diminuer les symptômes respiratoires (Abraham et al., 2005).

#### 4.2.5. Publications associées

Arnich et al., 2021. Guidance Level for Brevetoxins in French Shellfish. *Mar Drugs* 19(9): 520

Mattei et al., 2014. Ciguatera fish poisoning: a first epidemic in Germany highlights an increasing risk for European countries. *Toxicon* 91: 76-83

Mattei et al., 2014. Involvement of both sodium influx and potassium efflux in ciguatoxin-induced nodal swelling of frog myelinated axons. *Neuropharmacology* 85: 417-826

Nguyen-Huu et al., 2010. Ciguatoxin-induced catecholamine secretion in bovine chromaffin cells: mechanism of action and reversible inhibition by brevenal. *Toxicon*. 56(5):792-796

Schlumberger et al., 2010. Dual action of a dinoflagellate-derived precursor of Pacific ciguatoxins (P-CTX-4B) on voltage-dependent  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  channels of single myelinated axons. *Toxicon* 56(5): 768-775

Mattei et al., 2010. Analysis of Caribbean ciguatoxin-1 effects on frog myelinated axons and the neuromuscular junction. *Toxicon* 56(5): 759-767

#### 4.3. Projet 2 : le récepteur nicotinique de l'acétylcholine, une cible d'insecticides

S'il est un récepteur qui reçoit beaucoup d'attention de la part de la communauté scientifique, c'est bien le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (RnACh). L'acétylcholine (ACh) est le principal neurotransmetteur du SNP des vertébrés. Cette molécule est également présente dans le SNC. En périphérie, les réseaux cholinergiques concernent principalement : i. le système nerveux végétatif, dit autonome, c'est-à-dire la transmission ganglionnaire des voies sympathiques et parasympathiques ; ii. le système musculaire dont les muscles squelettiques ; iii. la glande médullo-surrénale dont les synapses cholinergiques contrôlent la sécrétion de catécholamines (Figure 13). Au niveau du système nerveux central, l'ACh exerce une fonction de neurotransmetteur excitateur via les récepteurs nicotiniques (RnACh), et inhibiteur via les récepteurs cholinergiques muscariniques (RmACh). Les réseaux cholinergiques centraux sont nombreux et diffus, se projetant dans différentes régions du cerveau, comme l'hippocampe, le cortex, l'amygdale. Ils concernent notamment les fonctions cognitives dont la mémoire et apprentissage, le système limbique dont les émotions, l'humeur et le comportement, et le contrôle de la motricité.

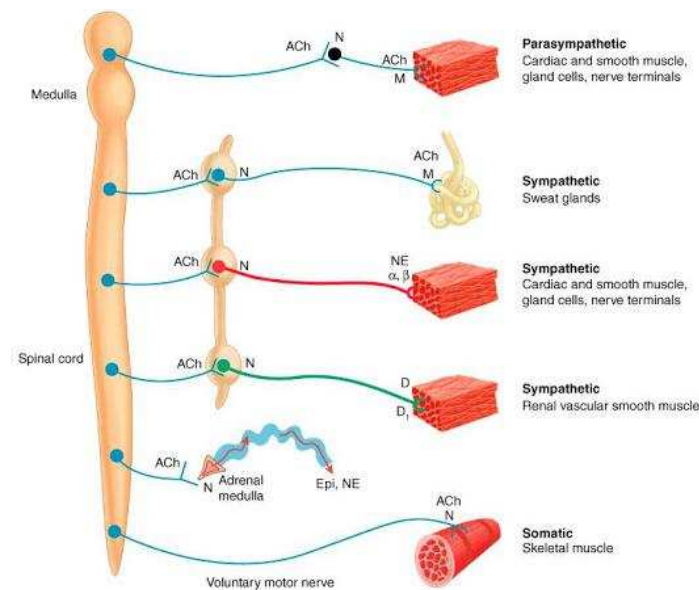


Figure 13 : position des RnACh dans le système nerveux périphérique. Les RnACh (notés N) sont présents dans les synapses cholinergiques du système SNP végétatif (sympathique et parasympathique), le SNP somatique et la synapse neuro-surrénale<sup>15</sup>. Les récepteurs cholinergiques muscariniques sont notés M.

Compte-tenu de leur importance dans le SN, les RnAChs sont également la cible de nombreuses toxines d'origine animale et de neurotoxines d'organismes micro-organiques et végétales, et d'insecticides. Trois projets auxquels j'ai été associé ont vu le jour: les pinnatoxines (PnTx) mené avec l'ANSES,

<sup>15</sup> <https://step1.medbullets.com/pharmacology/107010/central-and-peripheral-nervous-system>

l'anatoxine-a (ANT-a) et les néonicotinoïdes (NeN) au sein du laboratoire qui ciblent tous le RnACh, bien qu'avec des effets différents. Je détaille ci-après l'un de ces trois projets concernant l'interaction NeN/RnACh.

#### **4.3.1. Contexte scientifique : implication des RnACh dans des intoxications humaines**

Une grande variété de neurotoxines cible les nAChR pour induire un défaut de communication neuromusculaire et faciliter la capture de proies, ou engager l'organisme producteur dans des stratégies de défense. Les toxines naturelles provenant de venins de serpents, de cônes, de plantes, de dinoflagellés ou de cyanobactéries sont des antagonistes ou des agonistes puissants des RnACh (Daly, 2005) : outre leur rôle écologique lié à l'interaction producteur/cible, elles ont fait considérablement progresser notre compréhension de la structure et de la fonction des RnACh en raison de leur haute sélectivité (Ho et al., 2020). Elles jouent donc le rôle d'agents pharmacologiques spécifiques pour mettre à jour le rôle des RnACh au sein des réseaux cholinergiques des SNC et SNP.

D'autre part, le rôle des insecticides neurotoxiques dans le déclin des populations d'insectes pollinisateurs, notamment les abeilles, a été mis en évidence (Henry et al., 2012, 2015 ; ANSES, 2016) et a conduit l'Union européenne à bannir l'usage des insecticides NeN (Le Monde, 2013). La France a interdit leur usage en 2018 (Le Monde, 2016), mais accorde des dérogations pour certaines cultures. En plus de leurs effets délétères sur les abeilles, il existe également des motifs d'inquiétude sur la toxicité des insecticides sur les animaux vertébrés et l'homme, en raison de leur large spectre d'action (Gibbons et al., 2015). Depuis plus d'une trentaine d'années, différentes études épidémiologiques relatives à des populations exposées aux insecticides dans un cadre professionnel ont évoqué leur rôle dans différentes pathologies, notamment neurodégénératives, cancéreuses et des troubles de la reproduction (INSERM, 2021).

Les NeN sont des composés synthétiques dont la structure chimique est inspirée de celle de la nicotine et qui ont été utilisés avec succès comme insecticides contre les ravageurs de cultures. Depuis leur introduction à la fin des années 1980, les NeN sont devenus la classe d'insecticides la plus répandue au monde, avec des applications à grande échelle incluant la protection des végétaux, des produits vétérinaires et des antiparasitaires en pisciculture (Pisa et al., 2014). La persistance des insecticides NeN dans l'environnement – sols et cours d'eau – est assez variable, et susceptible de se prolonger. Leur demi-vie dans les sols peut dépasser 1000 jours, favorisant ainsi leur accumulation lorsqu'ils sont utilisés de façon répétée (Bonmatin et al., 2015). L'usage intensif et la persistance de ces molécules

dans l'environnement favorise leur contact avec la faune vertébrée et les usagers humains des zones d'utilisation intensive de ces insecticides.

Les effets des NeN sont peu décrits sur les organismes mammifères et l'homme. Leur toxicité aiguë et chronique a été évaluée sur des modèles animaux. La  $DL_{50}$  de l'ACE et la CLO est de 182 mg/kg et >5000 mg/kg respectivement, pour une dose orale chez le rat. Par comparaison, la  $DL_{50}$  de la nicotine est de 50 à 60 mg/kg dans les mêmes conditions. La dose sans effet toxique observable (NOAEL en anglais) est de 7,1 et 9,8 mg/kg/jour chez le rat, respectivement (Tomizawa & Casida, 2005). Le mode d'action des NeN sur les systèmes mammifères a fait l'objet de peu d'études.

#### **4.3.2. Le RnACh, une cible majeure dans la perturbation du SNP**

Les RnACh forment des canaux ioniques qui produisent une dépolarisation membranaire en augmentant la perméabilité aux cations  $Na^+$ ,  $K^+$  et  $Ca^{2+}$  (Changeux, 2020). De nombreuses molécules naturelles ou synthétiques – toxines, anesthésiques, insecticides – peuvent se fixer aux RnACh comme agonistes ou antagonistes et perturber les réseaux cholinergiques. Les RnACh sont formés par l'assemblage de cinq sous-unités transmembranaires. Dix-sept sous-unités différentes constituant les RnACh ont été identifiées à ce jour chez les mammifères, dont dix sous-unités  $\alpha$  ( $\alpha 1-10$ ), quatre sous-unités  $\beta$  ( $\beta 1-4$ ), et les sous-unités  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ . Les RnACh neuronaux sont assemblés soit en homopentamères de  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  et  $\alpha 9$ , soit en hétéro-pentamères de  $\alpha 2-\alpha 6$  en combinaison avec des sous-unités  $\beta 2-\beta 4$  ou  $\alpha 9$  avec des sous-unités  $\alpha 10$ . En revanche, les RnACh musculaires hétéro-pentamériques comprennent deux sous-unités  $\alpha 1$  plus une sous-unité  $\beta 1$ ,  $\delta$  et  $\gamma$  (foétale) ou  $\epsilon$  (adulte) (Figure 14A). La poche de liaison du ligand (LBP) pour les agonistes ou les antagonistes compétitifs se trouve à l'interface entre deux sous-unités voisines, une sous-unité étant la face principale et l'autre la face complémentaire (Figure 14B). Dans les RnACh hétéromériques, la face principale provient d'une sous-unité  $\alpha$ , tandis que la face complémentaire provient d'une sous-unité non- $\alpha$ . La liaison d'un ligand stimule différents états fonctionnels des RnACh via les changements de conformation induits par le mouvement relatif des cinq sous-unités les unes par rapport aux autres (Liu et al., 2008). Les caractéristiques structurelles de la poche et les interactions spécifiques des acides aminés entre les ligands et ce site déterminent les transitions conformationnelles qui sont à l'origine des propriétés pharmacologiques d'un sous-type de RnACh spécifique (Dani & Bertrand, 2007). Ainsi, des propriétés pharmacologiques et biophysiques différentes caractérisent les sous-types de RnACh neuronaux. Ils présentent également un profil d'expression hétérogène dans le système nerveux. L'ensemble de ces

éléments contribue à la complexité de la structure et de la fonction des RnACh neuronaux et à leur rôle dans le SN.

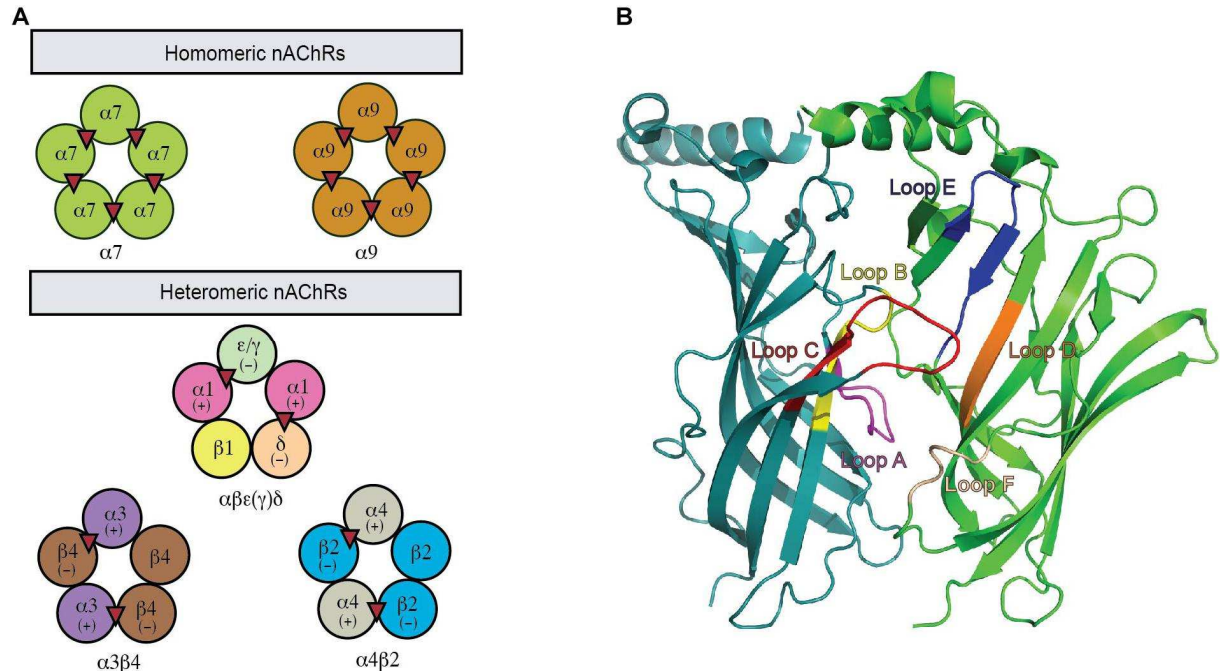


Figure 14 : organisation des RnACh. A : un récepteur fonctionnel est formé par le co-assemblage de sous-unités selon une combinaison homo-pentamériques ou hétéro-pentamériques des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (ainsi que des sous-unités  $\delta$  et  $\gamma/\epsilon$  pour le RnACh musculaire). Les sites de liaison de l'ACh sont représentés par des triangles rouges. (B) Représentation du site de liaison au RnACh entre deux sous-unités adjacentes. La poche de liaison de l'ACh apparaît au centre. D'après Ho et al., 2020.

#### 4.3.3. Problématique de recherche : les effets aigus des NeN sur mammifères

Mes projets de recherche relatifs aux RnACh ont principalement concerné le mode d'action des insecticides NeN sur mammifères à travers une approche multi-échelle avec comme question centrale : comment ces ligands agissent sur ces récepteurs et quelles sont les conséquences physiologiques induites par cette interaction. A ce jour, il existe relativement peu d'études intégrées des effets des NeN sur mammifères. Nous avons privilégié l'angle cardiovasculaire car il n'avait fait l'objet d'aucune étude, alors que les expositions humaines aiguës aux NeN se caractérisent par une hypotension artérielle (Inamura et al., 2010)

#### 4.3.4. Principaux résultats du Projet 2

L'analyse des effets des NeN sur rat a été menée à différentes échelles : *in silico* (modélisation de l'interaction ligand-récepteur), *in vitro* (électrophysiologie sur ovocytes de xénope), *ex vivo* (sécrétion

de tranches de médullo-surrénales de rat), *in vivo* (rats anesthésiés). Ces résultats ont été générés dans le cadre **des stages de M1/M2 de Joohee Park**.

En électrophysiologie, l'ACh et la NIC exercent un effet agoniste comparable sur les récepteurs  $\alpha 3\beta 4$  de rat exprimés dans les ovocytes de xénope. Les NeN (ACE ou CLO) agissent comme des agonistes faibles, car les courants enregistrés sont très petits (Figure 15).

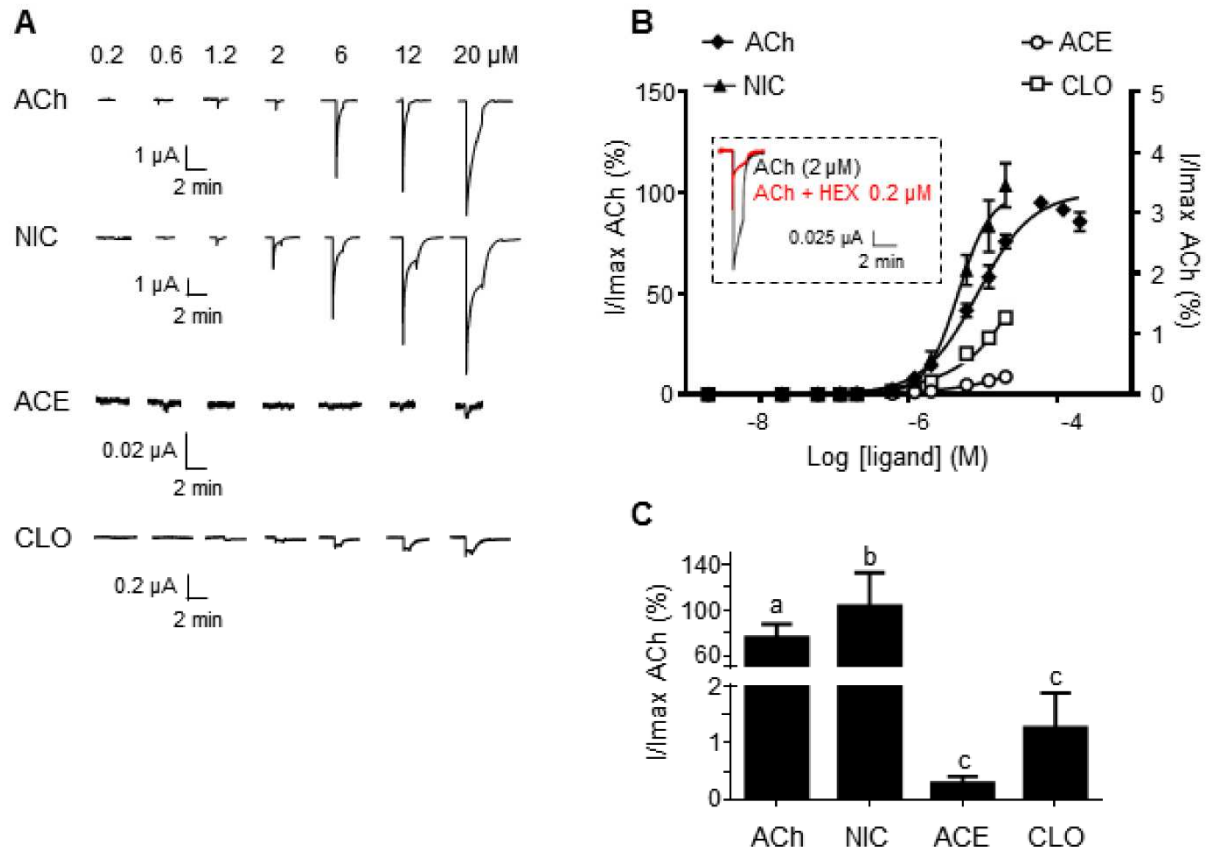


Figure 15 : Profil pharmacologique de l'ACh, de la NIC, de l'ACE et de la CLO sur les RnACh  $\alpha 3\beta 4$  de rat exprimés dans des ovocytes de *Xenopus*. A : ACh et NIC provoquent des courants robustes, ACE et CLO induisent des courants beaucoup plus modestes. B : courbes concentration-réponse des courants induits par chaque ligand, exprimées en % de l'amplitude du courant induit par l'ACh. Encadré : l'hexaméthonium (0,2  $\mu\text{M}$ ), un antagoniste des  $\alpha 3\text{RnACh}$ , inhibe le courant induit par l'ACh comme attendu. C : Intensité de courants induits par 20  $\mu\text{M}$  d'ACh, de NIC, d'ACE ou de CLO sur les RnACh  $\alpha 3\beta 4$  de rat. Les lettres minuscules différentes au-dessus des graphiques indiquent des différences significatives entre les traitements D'après Park et al., 2021.

L'effet des NeN a ensuite été étudié sur la sécrétion d'adrénaline par les glandes médullo-surrénales de rat. Cette sécrétion est principalement induite par la libération d'ACh au niveau des synapses neuro-chromaffines, et le rôle des RnACh  $\alpha 3\beta 4$  a été mis en évidence dans cette activation (Free et al., 2002). Nous supposons que l'effet agoniste partiel des NeN (Figure 15) sur ces récepteurs pourrait (i) induire une réponse sécrétoire dans la glande surrénale ou (ii) perturber la sécrétion induite par la NIC. Nous avons utilisé une technique *ex vivo* pour mesurer la sécrétion d'adrénaline (Figure 16A). Comme attendu, la NIC stimule de façon concentration-dépendante la sécrétion d'adrénaline et cet effet est inhibé par HEX, confirmant l'implication des RnACh  $\alpha 3\beta 4$  dans cette activité sécrétoire (Figure 16B). À la concentration de 100  $\mu\text{M}$ , ni l'ACE ni la CLO n'ont stimulé la sécrétion d'adrénaline. Cependant, à

500  $\mu\text{M}$ , chacun a induit un effet sécrétoire significatif, qui est inhibé par HEX (Figure 16C,E). La sécrétion induite par l'ACE n'est pas significativement différente à 100 et 500  $\mu\text{M}$ , alors que la sécrétion induite par la CLO à 500  $\mu\text{M}$  est significativement plus élevée qu'à 100  $\mu\text{M}$ , reflétant leurs propriétés agonistes montrées dans la figure 15. De manière inattendue, cette potentialisation de la sécrétion a été abolie lorsque la NIC (10  $\mu\text{M}$ ) a été ajoutée (Figure 16C,E). Ces données indiquent que : (i) l'activation des RnACh  $\alpha 3\beta 4$  par les NeN entraîne une réponse sécrétoire à des concentrations élevées par les glandes médullosurrénales *ex vivo* ; (ii) un effet paradoxal se développe en présence de la NIC, qui peut être dû à la compétition de la NIC et des NeN sur le site orthostérique des RnACh. Un effet perturbateur des NeN sur la sécrétion physiologique dans la médullosurrénale à faibles doses pourrait alors être observé *in vivo*.

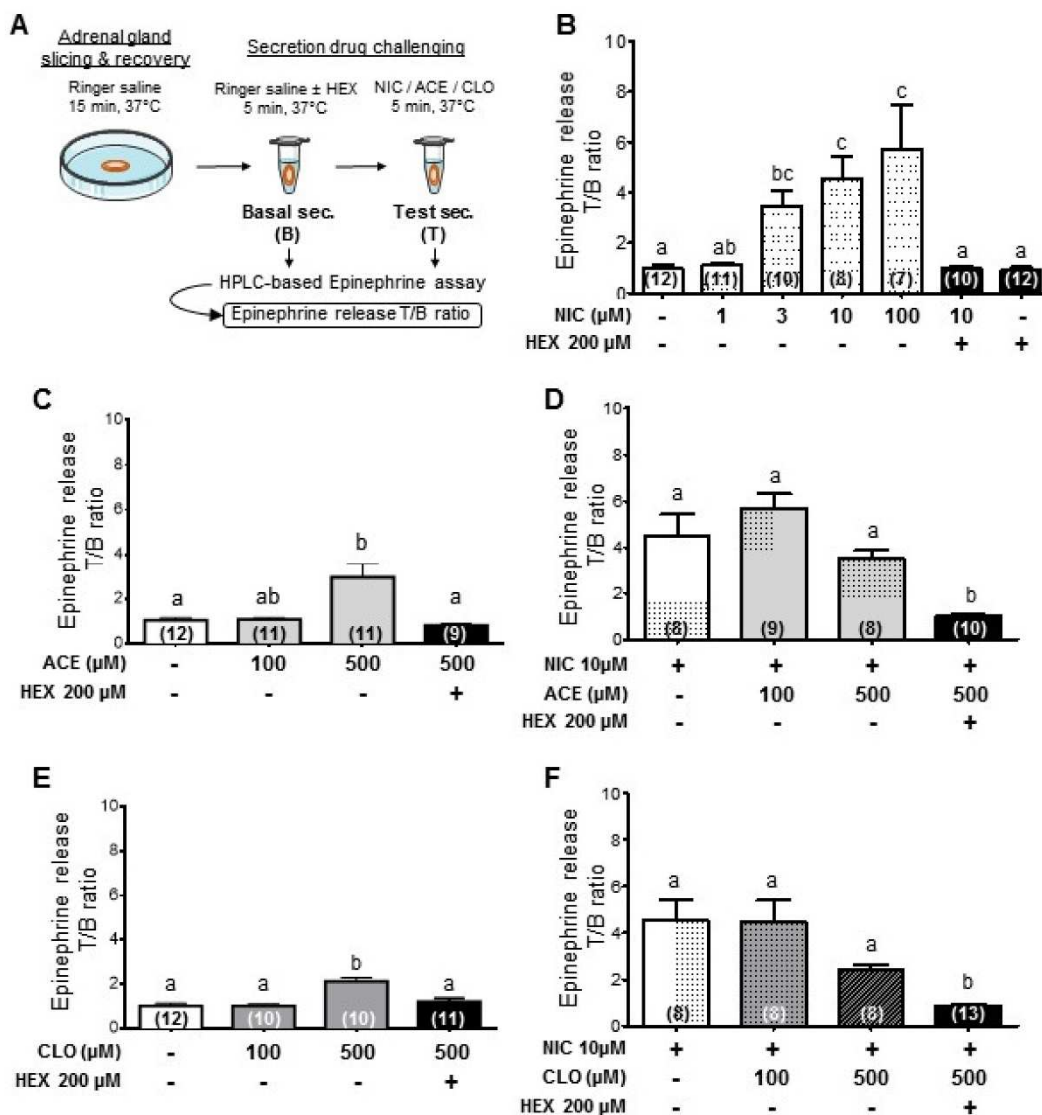


Figure 16 : Influence de la NIC et des NeN (ACE et CLO) ajoutés séparément ou en combinaison sur la libération d'adrénaline par des tranches de glandes médullo-surrénales de rat. A : protocole modifié d'après De Nardi et al., 2017. B : effet concentration-dépendant de la libération d'adrénaline après stimulation par le NIC  $\pm$  HEX. C à F : sécrétion d'adrénaline après ajout d'ACE ou de CLO en combinaison ou non avec NIC  $\pm$  HEX. Les lettres minuscules différentes au-dessus des histogrammes indiquent des différences significatives.

Pour évaluer les effets aigus des NeN *in vivo*, la PA a été mesurée en continu à l'aide d'un transducteur inséré dans l'artère fémorale de rats anesthésiés (Figure 17). Lorsque les rats ont reçu des injections *iv* de CLO ou d'ACE, les variations de la PA sont quasi nulles (Figure 17AB). L'exposition aiguë aux NeN seuls ne reproduit donc pas celle de la NIC, qui induit un effet hypertenseur comme prévu. Comme la NIC et les NeN interagissent sur la même cible moléculaire, c'est-à-dire les RnACh, nous avons ensuite testé les deux molécules simultanément sur la PA du rat pour analyser un éventuel effet cocktail sur ce paramètre vasculaire : une dose fixe de NeN (ACE : 0,093 mg.kg<sup>-1</sup> ou CLO 0,33 mg.kg<sup>-1</sup>) a été injectée en même temps que des doses croissantes de NIC (Figure 17CD). Une réponse biphasique de la PA est alors observée : une diminution initiale suivie d'une augmentation de la PA. Ainsi, la NIC associée à l'ACE ou au CLO modifie profondément la cinétique de la variation de la PA, exerçant un effet hypotenseur paradoxal avant l'augmentation attendue de la PA. Ces données indiquent que les NeN altèrent la PA lorsqu'ils sont confrontés à un agoniste entier des RnACh.

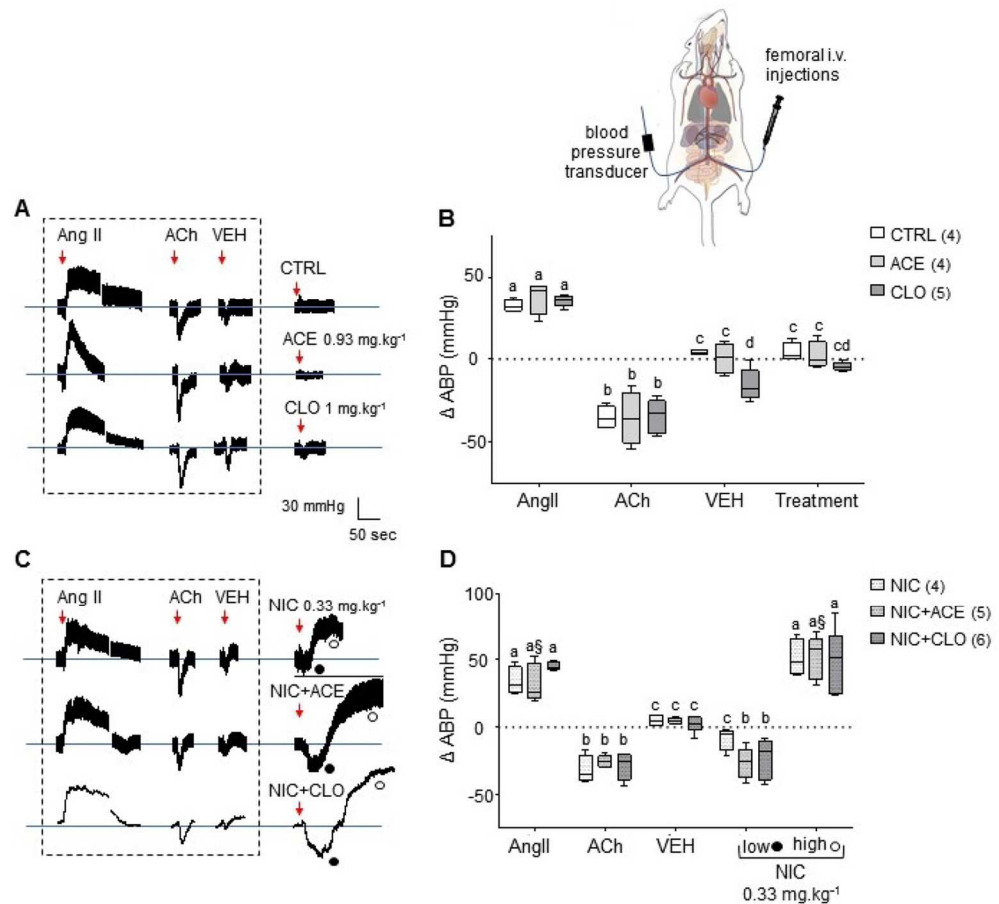


Figure 17: influence de la NIC et des NeN

sur la PA du rat mesurée *in vivo* (schéma en haut). A : traces représentatives de la PA après la perfusion d'ACE ou de CLO (flèche rouge avec les doses utilisées) par rapport au groupe CTRL. Comme attendu, l'AngII (1,05.10<sup>-5</sup> mg.kg<sup>-1</sup>) et l'ACh (0,5.10<sup>-5</sup> mg.kg<sup>-1</sup>) induisent une augmentation et une diminution de la PA, respectivement. Ni le DMSO 0,5-3% (VEH), ni l'ACE ou le CLO n'ont affecté la PA, quelle que soit la dose testée. B : données statistiques de la ΔPA dans les groupes CTRL, CLO et ACE après des injections *i.v.* de 0,93 mg.kg<sup>-1</sup> d'ACE et de 1 mg.kg<sup>-1</sup> de CLO. C : traces représentatives de la PA après des perfusions de NIC seule ou de NIC (0,33 mg.kg<sup>-1</sup>) avec ACE (0,09 mg.kg<sup>-1</sup>) ou CLO (0,33 mg.kg<sup>-1</sup>). La NIC a induit une augmentation de la PA comme attendu, tandis que la combinaison NIC avec ACE ou CLO induit une réponse biphasique avec baisse initiale de PA (●) puis une augmentation brutale (○). D : données statistiques de la ΔPA dans les groupes NIC, NIC+ACE et NIC+CLO. Les lettres minuscules différentes et les § au-dessus des graphiques indiquent des différences significatives entre les traitements.

Pour mieux comprendre le mécanisme d'action des NeN à l'échelle moléculaire, nous avons modélisé leurs interactions avec le RnACh  $\alpha 3\beta 4$  de rat. Nous avons d'abord produit un modèle du récepteur par homologie (Figure 18AB). Puis, les différents ligands (CLO et ACE) ont été introduits sur le site orthostérique de liaison de la NIC, dans le domaine extracellulaire du récepteur entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (Figure 18CDE). Les trois molécules interagissent avec les résidus déjà caractérisés pour contribuer au site de liaison à partir des boucles A, B, C, D et E (Figure 18), c'est-à-dire  $\alpha Y93$  ;  $\alpha Y190$  ;  $\alpha C192$  ;  $\alpha C193$  ;  $\alpha Y197$  et  $\alpha W149$ . Ces résultats valident l'hypothèse selon laquelle les NeN se lient au site de liaison orthostérique des RnACh (Costa et al., 2003 ; Wang et al., 2018).

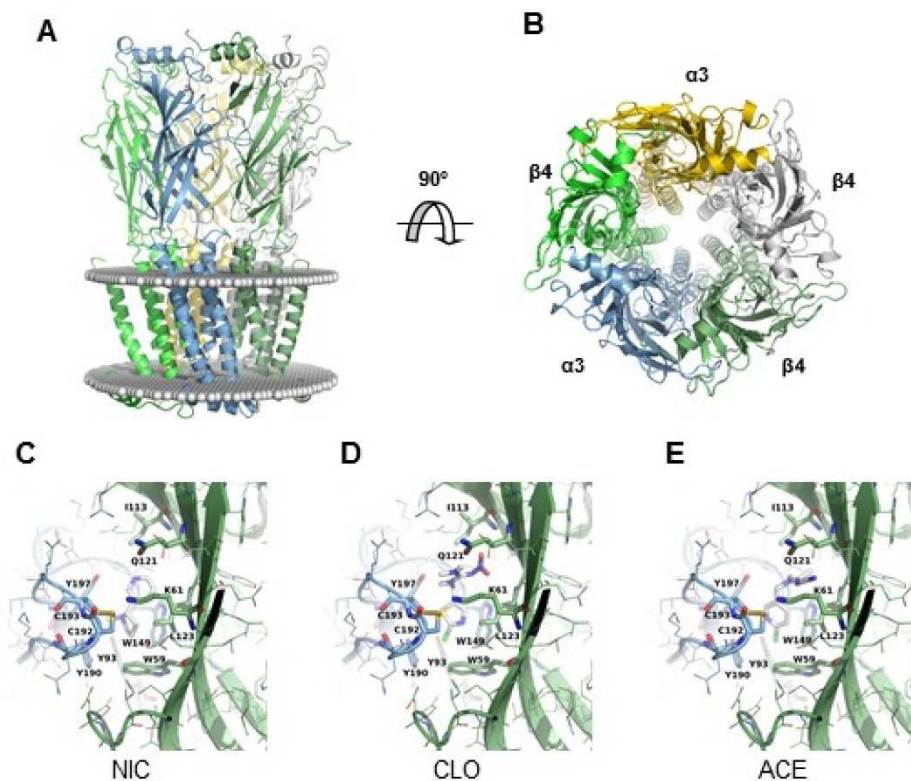


Figure 18 : Modélisation de l'interaction du RnACh  $\alpha 3\beta 4$  de rat avec la NIC, la CLO et l'ACE. A,B : modèle du récepteur vu depuis le plan de la membrane (A) et depuis le domaine extracellulaire (B). La protéine est représentée ses 5 sous-unités colorées. La membrane plasmique apparaît en sphères grisées. C-E : représentations modélisées du site orthostérique du RnACh  $\alpha 3\beta 4$  de rat. L'interface des sous-unités  $\alpha 3$ - $\beta 4$  en complexe avec la NIC (C), la CLO (D) et l'ACE (E).

A travers ce projet, nous avons caractérisé à différentes échelles les effets de deux NeN sur les RnACh  $\alpha 3\beta 4$  de rat, sachant que ceux-ci sont principalement exprimés dans les ganglions du système nerveux végétatif et dans la médullosurrénale qui initie la sécrétion de catécholamines. Les deux molécules montrent un faible effet agoniste sur les récepteurs  $\alpha 3\beta 4$ . En conséquence, leur influence sur la sécrétion d'adrénaline par les glandes surrénales de rat est également assez faible. De plus, chacun des NeN semble exercer un effet inhibiteur sur l'effet sécrétoire de la NIC, comme si la compétition pour le site orthostérique du récepteur se matérialisait par un effet sécrétoire faible (NeN) ou fort

(NIC). En outre, en mesurant la PA de rats *in vivo*, nous avons observé comme attendu, que la NIC induit un effet hypertenseur, alors que l'ACE et la CLO n'affectent pas la PA. Cependant, l'exposition simultanée des rats à la NIC et à l'ACE/CLO induit une réponse biphasique non observée. La modélisation de l'interaction de l'ACE ou de la CLO sur le RnACh  $\alpha 3\beta 4$  suggère un site de liaison situé dans la poche agoniste du récepteur.

#### 4.3.5. Publications/éditions associées

Mattei C, Legros C, Lewis RJ, Tricoire-Leignel H, Molgo J, 2022. Pharmacological Aspects of Ligand-gated Ion Channels as Targets of Natural and Synthetic Agents. *Frontiers in Neuroscience* – Edited research topic

Park et al., 2021. Partial Agonist Activity of Neonicotinoids on Rat Nicotinic Receptors: Consequences over Epinephrine Secretion and In Vivo Blood Pressure. *Int J Mol Sci.* 22(10): 5106.

Colas S, Marie B, Lance E, Quiblier C, Tricoire-Leignel H, Mattei C, 2021. Anatoxin-a: Overview on a harmful cyanobacterial neurotoxin from the environmental scale to the molecular target. *Environ Res.* 193: 110590.

Arnich et al., 2020. Health risk assessment related to pinnatoxins in French shellfish. *Toxicon* 180: 1-10.

Delcourt et al., 2019. Pinnatoxins' Deleterious Effects on Cholinergic Networks: From Experimental Models to Human Health. *Mar Drugs* 17(7): 425.

#### 4.4. **Projet 3 : Récepteur GABA<sub>A</sub>, une cible allostérique d'agents thérapeutiques et phytosanitaires**

Les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont des canaux anioniques activés par le GABA – c'est-à-dire le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC – avec une bonne sélectivité pour les ions Cl<sup>-</sup>, et une certaine perméabilité pour les ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (bicarbonate) (Kaila et al., 1989). Le GABA, en activant son récepteur ionotropique, augmente la conductance anionique pour l'hyperpolarisation neuronale. Si le gradient de Cl<sup>-</sup> est en faveur d'une sortie d'ions, l'ouverture des récepteurs GABA<sub>A</sub> peut induire une dépolarisation membranaire, c'est-à-dire une excitation neuronale. Ce phénomène est observé dans les neurones immatures ou lors de phénomènes de douleurs neuropathiques (Coull et al. 2005 ; Ben-Ari et al., 2007). On estime qu'environ 30% des synapses cérébrales sont GABAergiques, ce qui confère au GABA une fonction primordiale dans l'inhibition du SNC.

#### 4.4.1. Contexte scientifique : un modulateur crucial de l'activité du SNC

Les récepteurs GABA de type A (RGABA<sub>A</sub>) sont les principaux transducteurs d'une inhibition centrale rapide. Ces sont des canaux anioniques qui dissipent des conductances chlore et font partie – comme les RnACh – des canaux ioniques activés pas un ligand (LGIC). Ils sont les cibles de plusieurs classes d'agents thérapeutiques utilisés dans le traitement de l'anxiété, de l'insomnie ou de l'anesthésie. Le récepteur est défini par des assemblages hétéropentamériques dérivés de 19 sous-unités différentes ( $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ,  $\rho$ 1-3), donnant lieu à un grand nombre de configurations possibles. La modulation de l'activité du récepteur dépend de la composition et de l'arrangement des sous-unités. L'architecture des RGABA<sub>A</sub> endogènes détermine donc comment différents agents peuvent produire leurs effets, agonistes, antagonistes ou modulateurs allostériques (Sigel et Steinmann, 2012).

La stœchiométrie fonctionnelle du récepteur implique 2 $\alpha$ , 2 $\beta$  et une troisième sous-unité complémentaire : la plupart des RGABA<sub>A</sub> présentent un arrangement ternaire des sous-unités, principalement les isoformes  $\alpha\beta\gamma$  et  $\alpha\beta\delta$  (Olsen et Sieghart, 2009 – Figure 20A).

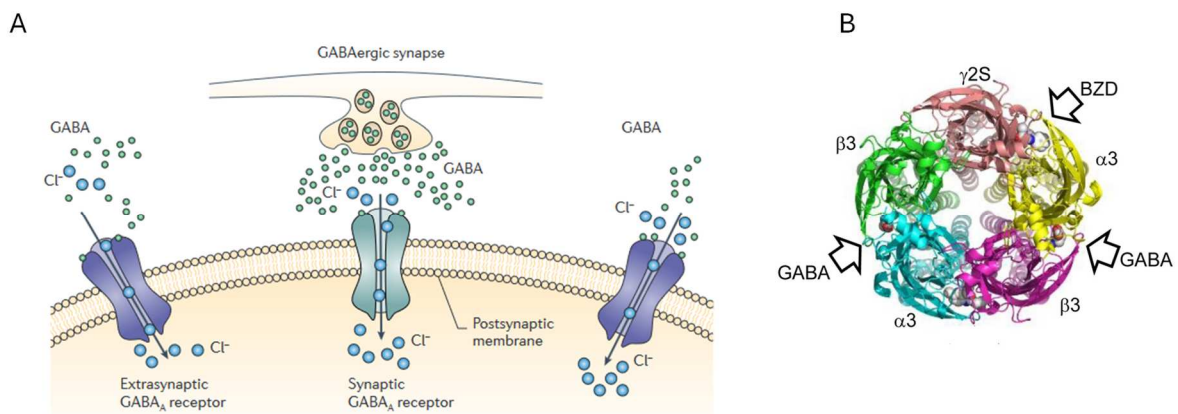


Figure 19 : Représentation du contexte physiologique et pharmacologique des RGABA<sub>A</sub>. A : Localisation synaptique (centre) et extra-synaptique (gauche et droite) des RGABA<sub>A</sub> au niveau d'une synapse GABAergique (Rudolph & Knoflach, 2011). B : Structure 3d du RGABAA  $\alpha$ 3 $\beta$ 3 $\gamma$ 2s. Les sites de fixation du GABA et des BZD sont indiqués (d'après Mattei et al., 2019).

Dans les réseaux GABAergiques cérébraux, les RGABA<sub>A</sub> synaptiques sont localisés dans la membrane neuronale postsynaptique (Figure 19A) et assurent la médiation d'une inhibition neuronale phasique rapide, forte et transitoire, ce qui empêche toute surexcitation neuronale (Farrant et Nusser, 2005). Ces récepteurs ont une affinité relativement faible pour le GABA. Les RGABA<sub>A</sub> extrasynaptiques sont localisés à distance des sites de libération du GABA, au niveau somatique, dendritique et axonal des membranes neuronales ; ils sont responsables d'une inhibition tonique, durable, lente et faible qui

module la réponse post-synaptique en influençant le niveau global d'excitabilité neuronale (Kullmann et al., 2005). Ces récepteurs ont une bonne affinité pour le GABA : une fois liés, ils dissipent des courants chlore ( $Cl^-$ ) entrants, ce qui favorise l'hyperpolarisation neuronale (Figure 20).

La nature des sous-unités des RGABA<sub>A</sub> détermine non seulement leurs propriétés pharmacologiques mais aussi en premier lieu leur localisation cellulaire et donc, *de facto*, leur implication dans l'inhibition phasique ou tonique. De nombreuses études ont montré que c'est surtout la troisième sous-unité complémentaire qui conduit à une localisation synaptique ou extra-synaptique. Lorsqu'ils incorporent la sous-unité  $\gamma$ , les RGABA<sub>A</sub> sont principalement synaptiques, sauf exception avec le récepteur  $\alpha_5\beta_2/\beta_3\gamma_2$ , alors que la sous-unité  $\delta$  leur confère une localisation extra-synaptique (Nusser et al., 1998). La sous-unité  $\alpha_6$  peut être associée soit à la sous-unité  $\gamma_2$  soit à la sous-unité  $\delta$  et est de fait à la fois synaptique et extra-synaptique (Nusser et al., 1998). Cependant, elle est principalement associée à la sous-unité  $\delta$  pour former un récepteur fonctionnel situé dans le cervelet (Laurie et al., 1992).

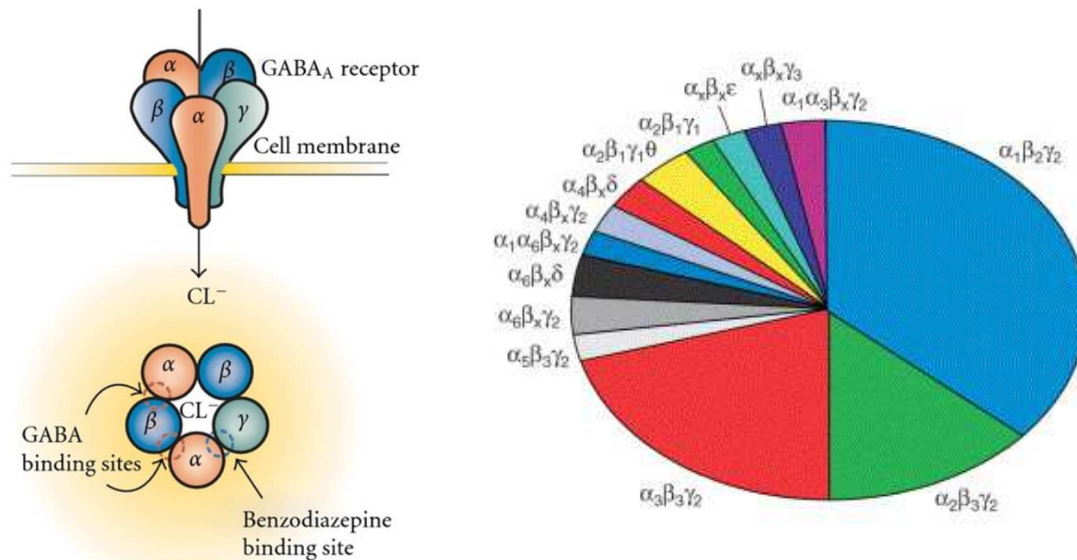


Figure 20 : Les RGABA<sub>A</sub> : organisation et expression. A gauche (haut), le récepteur est constitué de 5 sous-unités qui bordent un canal chlore. Une fois le GABA fixé entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , les ions  $Cl^-$  entrent dans le neurone, ce qui entraîne une hyperpolarisation membranaire. En bas, les BZD renforcent de manière allostérique l'action inhibitrice du GABA en se liant entre la sous-unité  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  ou  $\alpha_5$  et la sous-unité  $\gamma$ . A droite : bien que le RGABA<sub>A</sub> présente une grande hétérogénéité moléculaire en fonction de la composition des sous-unités, le sous-type le plus courant est un pentamère avec  $2\alpha$ ,  $2\beta$  et  $1\gamma$  (Whiting, 2003 ; Vinkers & Olivier, 2012).

#### 4.4.2. Problématique de recherche : l'influence de la structure sur la fonction

Les RGABA<sub>A</sub> sont les cibles de nombreux ligands exogènes, tels que les benzodiazépines (BZD), les anesthésiques généraux, l'éthanol, et également certains insecticides neurotoxiques tels que les phénylpyrazoles et certains organochlorés, et quelques neurotoxines comme l' $\alpha$ -bungarotoxine ou les micurotoxines (McCann et al., 2006 ; Rosso et al., 2015). Les bases moléculaires de l'interaction des

BZD avec les RGABA<sub>A</sub> sont assez bien caractérisées (Figure 19B), mais pour de nombreux ligands tels que le fipronil (FPN) - un insecticide neurotoxique - ou l'éfétoxine (EFX) - un anxiolytique non-BZD - les sites de fixation et les mécanismes d'action restent à définir. Les objectifs de ce projet ont été d'étudier les mécanismes d'action de ces deux ligands et les relations structure-fonction de leur interaction avec les RGABA<sub>A</sub> par une approche combinant pharmacologie *in vitro/in vivo* et modélisation moléculaire.

#### 4.4.3. Principaux résultats du Projet 3

Ces résultats ont été générés pour partie au cours de la thèse de Zineb Soualah.

##### 4.4.3.1. Le mode d'action du FPN est déterminé par la nature du récepteur GABA<sub>A</sub>

Comme nous l'avons vu avec les NeN, les insecticides les plus utilisés exercent des effets neurotoxiques sur les insectes ravageurs de culture, vecteurs de maladies parasitaires humaines ou animales. Ces effets sur le système nerveux se matérialisent par une surstimulation ou une inhibition toxique des fonctions centrales ou périphériques (Casida & Durkin, 2013). Parmi eux le FPN est une molécule phénylpyrazole (Figure 21) lancée il y a une quarantaine d'années pour lutter contre les parasites et active sur les récepteurs RGABA<sub>A</sub> en tant qu'antagoniste non compétitif ou modulateur allostérique négatif (Hosie et al., 1995 ; Ikeda et al., 2001). Le FPN se lie aux RGABA<sub>A</sub>, de préférence à l'état ouvert, favorisant ainsi une excitabilité exacerbée dans le SN central et périphérique (Szegedi et al., 2005).

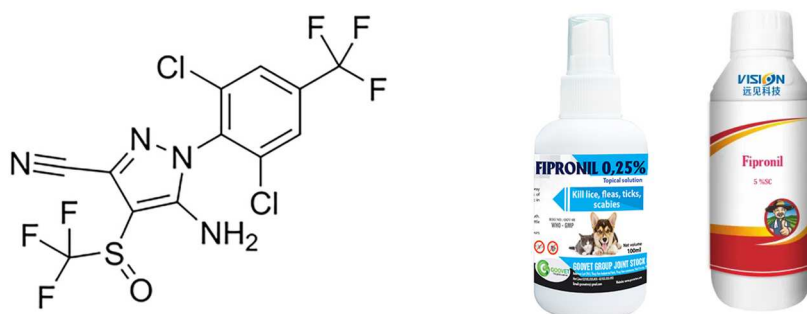


Figure 21 : Structure du FPN et exemples de formulations commerciales du FPN.

L'efficacité d'un insecticide repose sur sa capacité à neutraliser un insecte nuisible à de faibles concentrations sans conséquences sur les cibles indésirables. La DL<sub>50</sub> du FPN est de 0,25 µg.g<sup>-1</sup> chez la mouche, et environ 130 fois supérieure chez la souris (Cole et al., 1993), ce qui indique une plus grande affinité pour les cibles moléculaires des insectes. En outre, il a été démontré que le FPN antagonise les

récepteurs du glutamate-chlore (GluCl), qui ne sont exprimés que chez les invertébrés (Zhao et al., 2004). Cependant, le FPN agit également sur le SN des vertébrés (Ikeda et al., 2001 ; Tingle et al., 2003). L'intoxication humaine aiguë par le FPN a révélé des symptômes associés à la transmission GABA dans le SNC, notamment des convulsions, une agitation et des maux de tête (Mohamed et al., 2004 ; Bharathraj et al., 2015). Confirmant ces symptômes humains, le FPN induit une hyperactivité, des tremblements et des convulsions chez la souris (Cole et al., 1993). Plus récemment, il a été impliqué dans des troubles de la mémoire chez le rat, par son interaction avec les réseaux GABAergiques (Godinho et al., 2016). Peu d'études se sont penchées sur le mode d'action du FPN vis-à-vis des RGABA<sub>A</sub> de mammifères. La composition en sous-unité des récepteurs est une caractéristique clé pour expliquer l'affinité et la liaison de la FPN à sa cible mammifère (Ratra & Casida, 2001 ; Charon et al., 2011). La sous-unité  $\beta 3$  semble faire partie du site de liaison du FPN au RGABA<sub>A</sub> (Ratra et al., 2001).

Nous avons donc choisi d'étudier les effets pharmacologiques du FPN sur les RGABA<sub>A</sub> en le testant initialement sur des membranes de cervelet de rat et sur des RGABA<sub>A</sub> de type  $\alpha 6\beta 3\gamma 2s/\delta$  exprimés dans des ovocytes de xénope. Le choix de la sous-unité  $\alpha 6$  s'est fait en considérant qu'elle peut être associée soit à la sous-unité  $\gamma 2$ , soit à la sous-unité  $\delta$  : ces récepteurs sont présents dans les cellules granulaires, à la fois dans une localisation synaptique et extrasynaptique (Nusser et al., 1998), et la sous-unité  $\alpha 6$  est principalement associée à la sous-unité  $\delta$  pour former un récepteur fonctionnel situé dans le cervelet (Wisden et al., 1992).

Nous avons micro-transplanté des membranes de cervelet de rat dans des ovocytes de xénope. Après un jour, les ovocytes ont incorporé les morceaux de membrane et la stimulation par le GABA produit des courants robustes et répétables, inhibés de manière concentration-dépendante par le FPN (Figure 22).

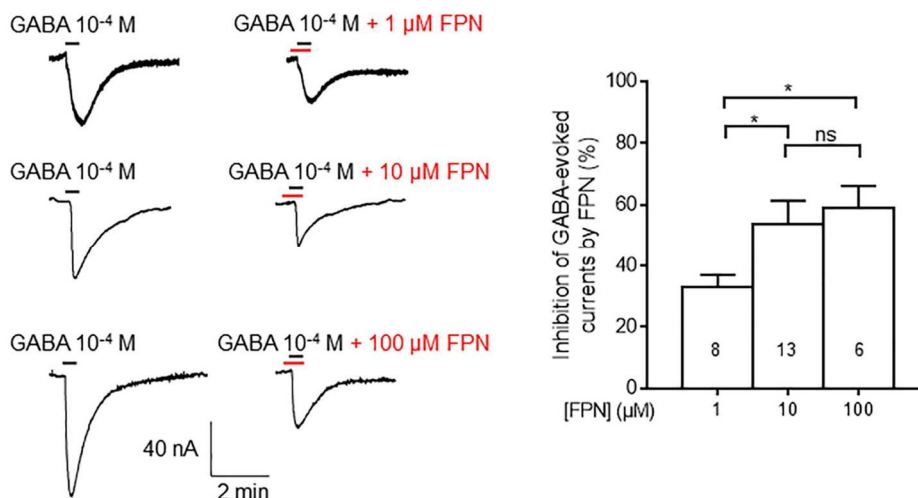


Figure 22 : effet inhibiteur du FPN sur les courants GABA dans les ovocytes micro-greffés avec des membranes de cervelet de rat. A gauche, les effets du FPN (1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) sur les courants induit par le GABA. A droite, les histogrammes l'inhibition concentration-dépendante du FPN sur les courants GABA.

Le FPN se comporte comme un antagoniste non-compétitif, ou incompétitif, des RGABA<sub>A</sub>. Dans cette étude, nous avons cherché à mettre en évidence le rôle de la sous-unité complémentaire dans l'inhibition des courants GABA induite par le FPN. Pour ce faire, nous l'avons testé sur des récepteurs ternaires composés de trois sous-unités différentes et binaires composés de deux sous-unités différentes. Les courbes d'inhibition du courant GABA (à la CE<sub>50</sub>) par le FPN montrent des effets différents en fonction de la composition en sous-unités du récepteur (Figure 23). Le FPN antagonise le récepteur  $\alpha 6\beta 3\gamma 2S$  de manière efficace : l'inhibition du courant est de 94 % avec 300  $\mu M$  de FPN (CI<sub>50</sub> 20,2  $\mu M$ ). L'inhibition est assez partielle (46%) pour les récepteurs  $\alpha 6\beta 3\delta$  et  $\alpha 6\beta 3$ . Ce résultat montre une discordance dans l'effet inhibiteur de la FPN, en fonction de la sous-unité complémentaire.

Le FPN antagonise donc de façon différentielle les RGABA<sub>A</sub>, et cette sous-unité complémentaire semble jouer un rôle crucial dans cette inhibition. Dans l'ensemble, la stœchiométrie de ces récepteurs détermine leurs propriétés pharmacologiques vis-à-vis du FPN, puisque l'inhibition du courant est presque complète pour les récepteurs synaptiques et partielle pour les récepteurs extrasynaptiques et binaires.

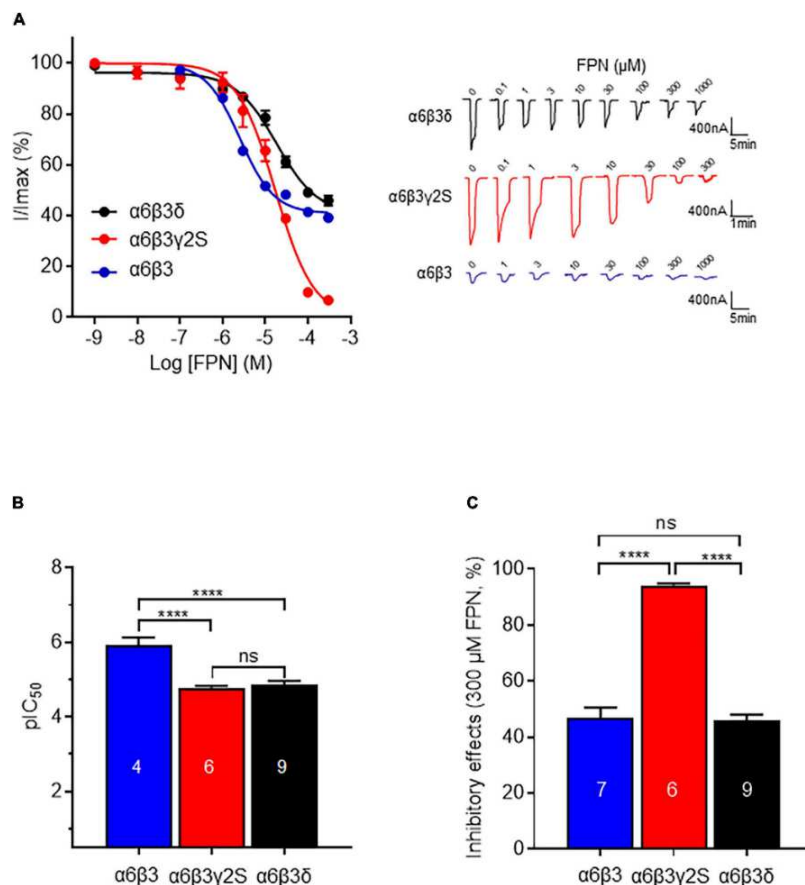


Figure 23 : Comparaison des effets inhibiteurs du FPN sur les RGABA<sub>A</sub>  $\alpha 6\beta 3\gamma 2S$ ,  $\alpha 6\beta 3\delta$  et  $\alpha 6\beta 3$ . A : à gauche, les courbes d'inhibition du FPN sur les RGABA<sub>A</sub> stimulés par le GABA (CE<sub>50</sub>). A droite, les courants représentatifs de l'inhibition de la du FPN sur chaque combinaison. B, C : analyse des effets inhibiteurs du FPN sur les RGABA<sub>A</sub>. La puissance (pIC<sub>50</sub>, B) et l'efficacité (inhibition maximale obtenue avec 300  $\mu M$  FPN, C) du FPN sont comparées.

Nous avons enfin généré une modélisation de l'interaction des RGABA<sub>A</sub>  $\alpha 6\beta 3$  et  $\alpha 6\beta 3\gamma 2S$  pour prédire comment le FPN se lie à son site récepteur (Figure 24). Il en ressort deux sites de liaison putatifs dans le canal ionique, bordé par les segments transmembranaires M2. Ces domaines sont situés à proximité de Val257 et Ser272 (Figures 24C,D). Ces deux sites de liaison putatifs expliquent les différentes propriétés pharmacologiques observées, car le FPN apparaît interagir avec des résidus différents selon la sous-unité. Ces deux sites seraient accessibles au FPN et occupés simultanément. Cependant, cette hypothèse mérite d'être vérifiée par des expériences de mutagenèse dirigée des acides aminés incriminés.

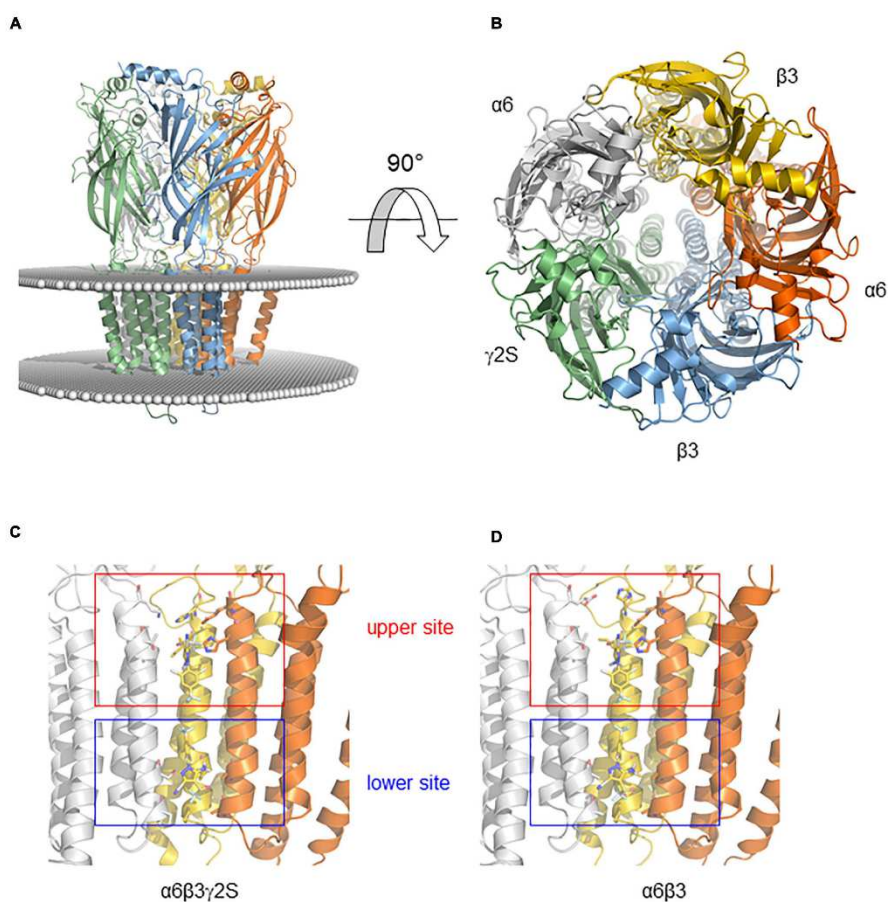


Figure 24 : Modélisation de l'interaction du FPN avec les récepteurs GABA<sub>A</sub> ternaire et binaire. A : modèle du récepteur  $\alpha 6\beta 3\gamma 2S$  vu depuis le plan de la membrane (cercles gris). Chaque sous-unité apparaît avec un code couleur différent. B : modèle du récepteur vu au-dessus de la membrane (rotation de 90° par rapport à A). C,D) : modélisation de la liaison du FPN avec les RGABA<sub>A</sub>  $\alpha 6\beta 3\gamma 2S$  (C) et  $\alpha 6\beta 3$  (D). La poche de liaison du FPN (qu'on distingue sous la forme de bâtonnets). Le FPN interagit avec un site supérieur (Ser272) - près de la partie extracellulaire de la membrane - et un second site (Val257) - situé près de la partie intracellulaire de la membrane.

#### 4.4.3.2. L'anxiolyse médiée par l'EFX est pharmacologiquement différente de celle des BZD

Cible de nombreuses molécules exogènes, le récepteur GABA<sub>A</sub> a surtout été étudié pour son interaction avec les BZD (Figure 25). Celles-ci sont utilisées alternativement comme anxiolytiques, anticonvulsivants, sédatifs ou myorelaxants (Griffin et al., 2013). Les BZD se lient à un site de liaison de haute affinité situé à l'interface des sous-unités  $\alpha/\gamma$  (Figure 19B). La plupart des BZD, comme le diazepam (valium) sont des modulateurs allostériques positifs des récepteurs GABA<sub>A</sub> : elles n'ouvrent pas le canal par elles-mêmes mais induisent un changement conformationnel du récepteur, ce qui favorise l'affinité pour le GABA aux deux sites orthostériques. Au niveau d'un seul récepteur, les BZD augmentent le temps moyen d'ouverture du canal (Twyman et al., 1989). Elles possèdent une faible sélectivité vis-à-vis des RGABA<sub>A</sub> qui contiennent les sous-unités  $\alpha_1$ , ou  $\alpha_2$  ou  $\alpha_3$  ou  $\alpha_5$  ( $\alpha_1$ RGABA<sub>A</sub>,  $\alpha_2$ RGABA<sub>A</sub>,  $\alpha_3$ RGABA<sub>A</sub>, ou  $\alpha_5$ RGABA<sub>A</sub>) (Rudolph & Knoflach, 2011), ce qui explique leurs effets indésirables, notamment les symptômes de sevrage, la sédation, l'amnésie, les déficiences cognitives et l'agressivité. En effet, les  $\alpha_1$ RGABA<sub>A</sub> sont associés à la sédation, à la dépendance aux BZD, à l'amnésie antérograde, à l'activité anticonvulsivante et à la plasticité corticale. Les  $\alpha_2$ RGABA<sub>A</sub> et les  $\alpha_3$ RGABA<sub>A</sub> ont été associés à l'anxiolyse, à l'antihyperalgésie et à la myorelaxation. Les  $\alpha_5$ RGABA<sub>A</sub> seraient liés à la sédation, aux troubles cognitifs et, plus récemment, à l'anxiolyse (Mattei et al., 2019).

L'EFX (Figure 25) est un composé non-BZD présentant des effets anxiolytiques et anticonvulsivants chez les rongeurs et utilisé pour le traitement de l'anxiété humaine modérée (Nguyen et al., 2006 ; Stein, 2015). L'EFX possède également des propriétés anti-hyperalgésiques et anti-inflammatoires dans différents modèles animaux (Aouad et al., 2014 ; Simon-O'Brien et al., 2016). Des études *in vitro* et *in vivo* sur le rat ont suggéré que les effets anxiolytiques de l'EFX impliquent un double mécanisme d'action, en se liant (i) directement aux RGABA<sub>A</sub> cérébraux et (ii) à la protéine translocatrice mitochondriale de 18 kDa (TSPO) ce qui aboutit à la potentialisation de la fonction GABAergique (Schlichter et al., 2000 ; Hamon et al., 2003).

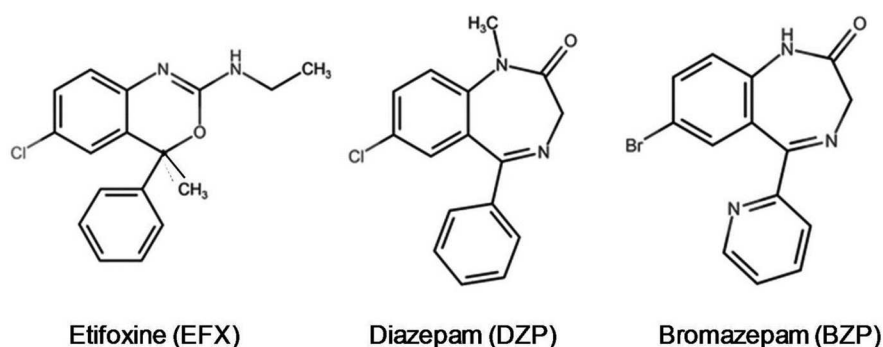


Figure 25 : structure des modulateurs allostériques positifs des RGABA<sub>A</sub>s utilisés dans le projet 3 : étifoxine, diazepam (valium, bromazepam (lexomil)).

Le rôle des sous-unités dans le mode d'action des BZD est assez bien caractérisé : la présence de la sous-unité  $\gamma$  gouverne leur liaison aux RGABA<sub>A</sub> et la potentialisation de leur ouverture. Pour l'EFX, la sous-unité  $\beta$  joue un rôle majeur dans le mode d'action de l'EFX sur les RGABA<sub>A</sub> (Hamon et al., 2003). En effet, les  $\alpha$ 1RGABA<sub>A</sub> et les  $\alpha$ 2RGABA<sub>A</sub> incorporant la sous-unité  $\beta$ 2 ou  $\beta$ 3 sont plus sensibles à l'EFX que les mêmes complexes avec la sous-unité  $\beta$ 1. Ces résultats soulignent l'importance de la sous-unité  $\beta$  dans l'interaction EFX-RGABA<sub>A</sub> et dans la potentialisation par l'EFX des courants induits par le GABA des RGABA<sub>A</sub> hétéromériques. Cependant, les RGABA<sub>A</sub> homopentamériques  $\beta$ 2 sont moins sensibles à l'EFX que les RGABA<sub>A</sub> homopentamériques  $\beta$ 1 (Hamon et al., 2003), ce qui suggère que la nature de la sous-unité  $\alpha$  peut également jouer un rôle dans l'interaction EFX-RGABA<sub>A</sub>. De plus, à des doses anxiolytiques, l'EFX ne montre pas d'effets sédatifs ni d'altération de la locomotion chez l'homme (Nguyen et al., 2006) et chez le rongeur (Verleye et al., 2003), ce qui pourrait difficilement s'expliquer par une puissance égale de l'EFX sur les  $\alpha$ 2RGABA<sub>A</sub> et les  $\alpha$ 1RGABA<sub>A</sub>, puisque ces derniers sont associés à la sédation (McKernan et al., 2000). Nous avons donc émis l'hypothèse que le profil pharmacologique de l'EFX reflète les différentes sensibilités des RGABA<sub>A</sub> en fonction de leur sous-unité  $\alpha$ .

Nous avons réévalué le potentiel anxiolytique de l'EFX et du BZP avec deux paradigmes comportementaux, l'hyperthermie induite par le stress et l'exploration d'un nouvel objet, afin de déterminer les doses anxiolytiques EFX vs BZP (Figure 26). Le BZP est actif pour une dose de 0,5 et 1 mg.kg<sup>-1</sup>. L'EFX exerce une activité anxiolytique pour une dose de 25 à 50 mg.kg<sup>-1</sup>.

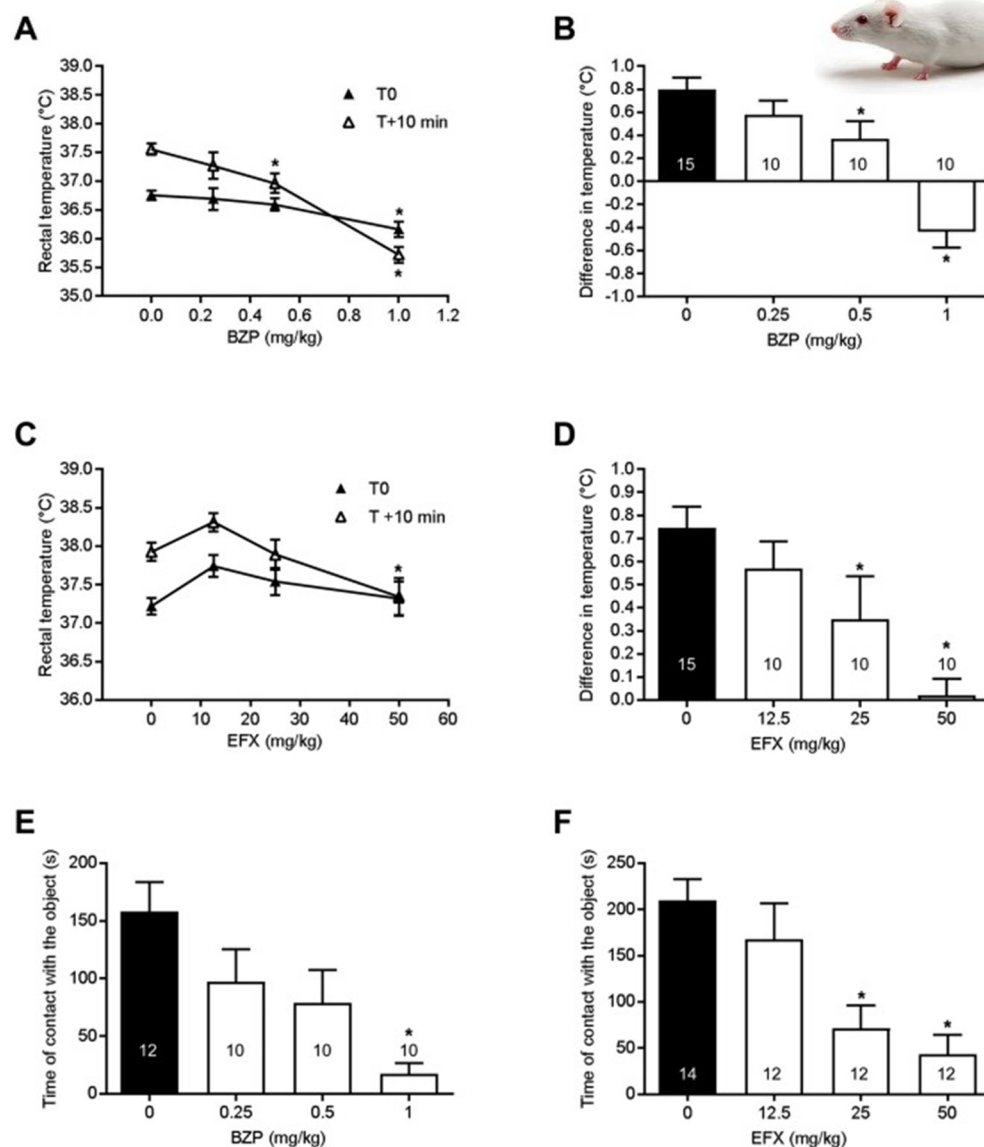


Figure 26 : l'EFX et les BZD induisent des effets anxiolytiques sans à des doses différentes. A-D : évolution de la température rectale moyenne à T0 et T0 + 10 min après traitement avec le véhicule (dose 0), la BZP (A) ou l'EFX (C) par voie ip, 60 min avant la première mesure de température à T0. Les histogrammes représentent la différence moyenne de la T° rectale. E,F : les histogrammes montrent le temps moyen de contact avec un objet inconnu après l'administration par voie ip de BZP (E) ou d'EFX (F).

Nous avons par la suite évalué les effets sédatifs – considérés comme indésirables lorsque l'on recherche l'anxiolyse – pour chacune de ces deux molécules aux doses précédemment testées. Pour ce faire, nous avons utilisé des tests de mesure des performances locomotrices (faisceau infrarouge) et de coordination motrice (rotarod). Le BZP diminue l'activité locomotrice spontanée et la coordination motrice à partir de 1 mg.kg<sup>-1</sup>, ce qui correspond à une dose anxiolytique (Figure 27AC). Aux doses anxiolytiques, l'EFX ne montre pas d'effets sédatifs (Figure 27BD) : elle ne diminue l'activité locomotrice spontanée qu'à la dose de 100 mg.kg<sup>-1</sup> et la coordination motrice à 150 mg.kg<sup>-1</sup>. La marge thérapeutique de l'EFX est donc avantageuse par rapport à celle du BZP.

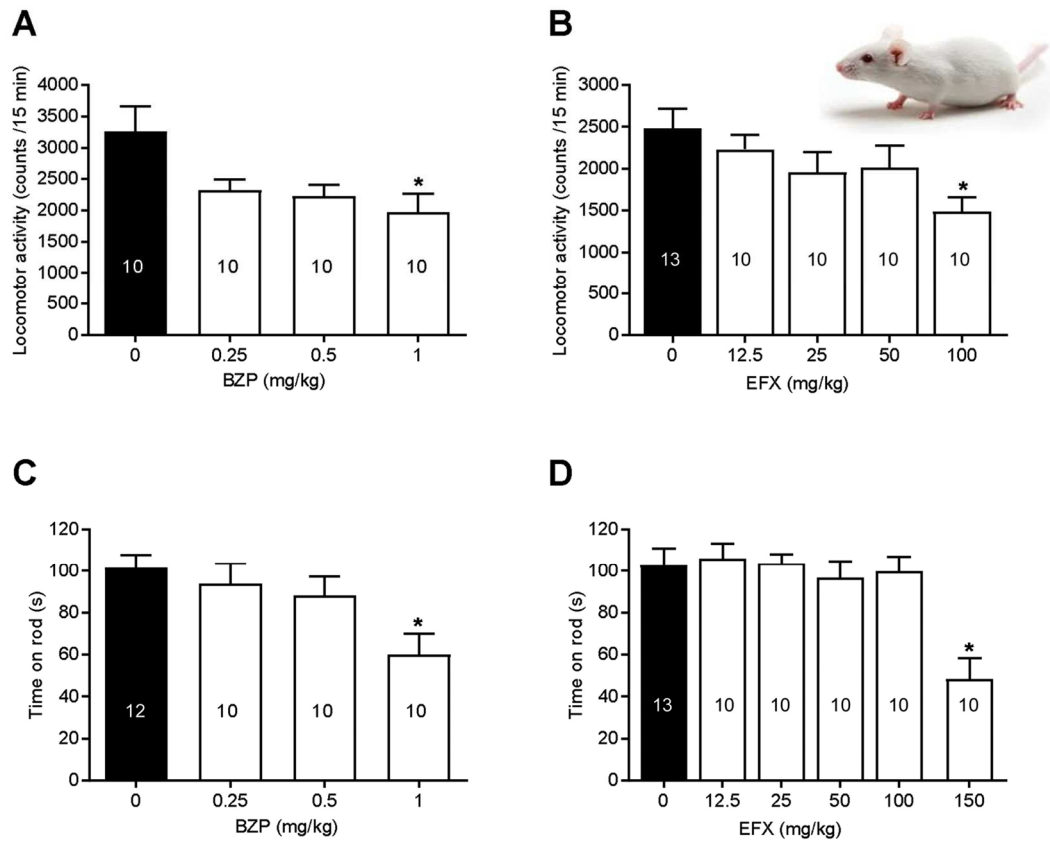


Figure 27 : Comparaison des effets sédatifs du BZP vs. EFX aux doses thérapeutiques. A-B : les activités locomotrices spontanées ont été évaluées chez des souris après des injections ip de BZP (A) ou d'EFX (B). Les résultats montrent le nombre moyen d'interruptions du faisceau infrarouge sur 15 min. C-D : test de coordination motrice (rotarod). Les résultats montrent le temps moyen passé sur le cercle après l'injection de BZP (C) ou d'EFX (D).

Les fonctions d'anxiolyse et de sédation étudiées précédemment sont étroitement liées aux  $RGABA_A$  et dépendent de la nature de leur sous-unité  $\alpha$ , compte-tenu de la distribution spécifique de celle-ci dans le cerveau. Pour expliquer les effets anxiolytiques de l'EFX sans sédation, nous avons étudié l'implication de chacune des sous-unités  $\alpha$  dans le mode d'action de l'EFX en l'électrophysiologie. Nous avons comparé les effets de l'EFX (2-100  $\mu$ M) sur les courants induits par le GABA en exprimant dans des ovocytes de xénope les  $\alpha 1RGABA_A$ ,  $\alpha 2RGABA_A$ ,  $\alpha 3RGABA_A$ ,  $\alpha 4RGABA_A$ ,  $\alpha 5RGABA_A$  ou  $\alpha 6RGABA_A$ , avec la sous-unité  $\beta 3$  et la sous-unité  $\gamma 2s$  ou  $\delta$  (Figure 28).

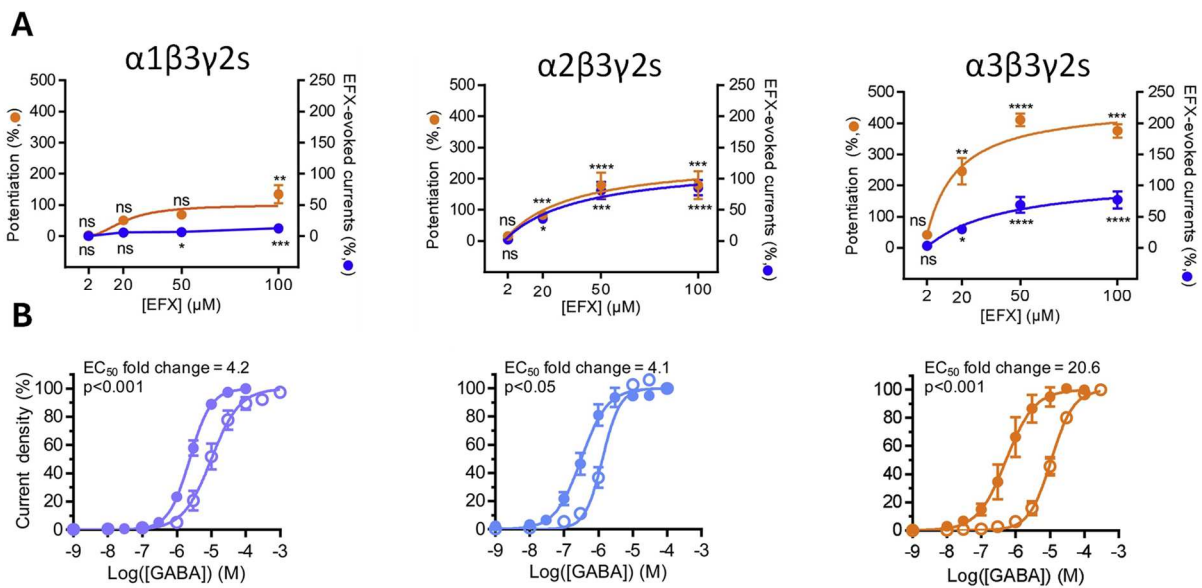


Figure 28 : Effets de l'EFX sur le courant GABA en fonction de la sous-unité  $\alpha$ . A : effet de MAP de l'EFX (orange) et effet agoniste direct de l'EFX sur les trois combinaisons. L'effet de MAP a été testé sur la  $EC_{10}$  du GABA, préalablement évaluée pour chaque combinaison. Les récepteurs étudiés sont tous synaptiques. B : Profil pharmacologique de l'EFX sur les trois récepteurs. Les courants sont mesurés en présence de concentrations croissantes de GABA avec (cercles pleins) ou sans (cercles vides) EFX à la concentration de 20  $\mu M$ , soit une dose anxiolytique.

En mesurant les effets agonistes et potentialisateurs (MAP) de l'EFX, nous avons constaté que les  $RGABA_A \alpha 1\beta 3\gamma 2S$  se révèlent beaucoup moins sensibles à l'EFX que les  $RGABA_A \alpha 2\beta 3\gamma 2S$  et encore moins que les  $\alpha 3\beta 3\gamma 2s$  (Figure 28A). Sur la base des données pharmacocinétiques (Verley et al., 2003), nous avons estimé que la concentration *in vitro* de 20  $\mu M$  correspondait à une dose d'EFX d'environ 25-50  $mg.kg^{-1}$  libre dans le cerveau de souris, c'est-à-dire une dose anxiolytique. Nous avons donc comparé les effets agonistes et potentialisateurs de 20  $\mu M$  d'EFX sur les 3 combinaisons précédentes (Figure 28B). L'EFX (20  $\mu M$ ) agit comme un agoniste partiel sur les  $\alpha 2RGABA_A$  et les  $\alpha 3RGABA_A$ , alors que ses effets agonistes ne sont pas significatifs sur les  $\alpha 1RGABA_A$ . Ses effets potentialisateurs sont très marqués pour les  $\alpha 3RGABA_A$ , moyens pour les  $\alpha 2RGABA_A$  et faibles pour les  $\alpha 1RGABA_A$ . La puissance du GABA sur les  $\alpha 3RGABA_A$  a été multipliée par 20,6 avec l'EFX, et seulement par 4 pour les  $\alpha 2RGABA_A$  et  $\alpha 1RGABA_A$  (Figure 28B). Dans l'ensemble, nos données électrophysiologiques montrent que l'EFX se comporte comme un PAM sélectif des  $\alpha 3RGABA_A$  à une concentration équivalente aux doses anxiolytiques, ce qui corrobore les données *in vivo*.

Nous avons ensuite réitéré la même approche pour caractériser les effets pharmacologiques (agonistes et potentialisateurs) de l'EFX sur les récepteurs  $\alpha 4RGABA_A$ ,  $\alpha 5RGABA_A$  et  $\alpha 6RGABA_A$  (Mattei et al., 2019). Nous avons finalement constaté que les  $RGABA_A$  peuvent être classés en trois catégories:

i) résistants ( $\alpha 4\text{RGABA}_A$  et  $\alpha 5\text{RGABA}_A$ ), ii) modérément sensibles ( $\alpha 1\text{RGABA}_A$ ,  $\alpha 2\text{RGABA}_A$  et  $\alpha 6\text{RGABA}_A$ ) et iii) très sensibles ( $\alpha 3\text{RGABA}_A$ ) à l'EFX. Le profil pharmacologique de l'EFX, à la fois *in vivo* et *in vitro*, est donc assez différent de celui des BZD. Pour mieux comprendre le mécanisme d'action de l'EFX sur les  $\text{RGABA}_A$ , nous avons généré un modèle du récepteur le plus sensible à l'EFX, c'est-à-dire  $\alpha 3\beta 3\gamma 2\text{S}$  (Figure 29A). Le site de liaison de l'EFX calculé serait situé entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  dans le domaine extracellulaire (Figure 29B). La poche située à l'interface entre les sous-unités  $\alpha 3$  et  $\beta 3$ , homologue aux sites de liaison du GABA, semble suffisamment grande pour accueillir l'EFX (Figure 29C). L'EFX est susceptible de se lier à proximité de cinq résidus de la sous-unité  $\beta 3$  : N66, Y87, Q89, Y91 et R194 (Figure 29D). Dans la sous-unité  $\alpha 3$ , nous avons identifié deux résidus (S257, S258) qui seraient impliqués dans l'interaction EFX- $\text{RGABA}_A$ . Deux résidus de  $\beta 3$ , N66 et R194, sont conservés dans les sous-unités  $\beta 2$  et  $\beta 3$  et sont différents dans les sous-unités  $\beta 1$  (R66 et N194). Cette paire d'acides aminés pourrait donc contrôler la liaison de l'EFX, et des variations au niveau de ces résidus expliqueraient la sélectivité de la sous-unité.

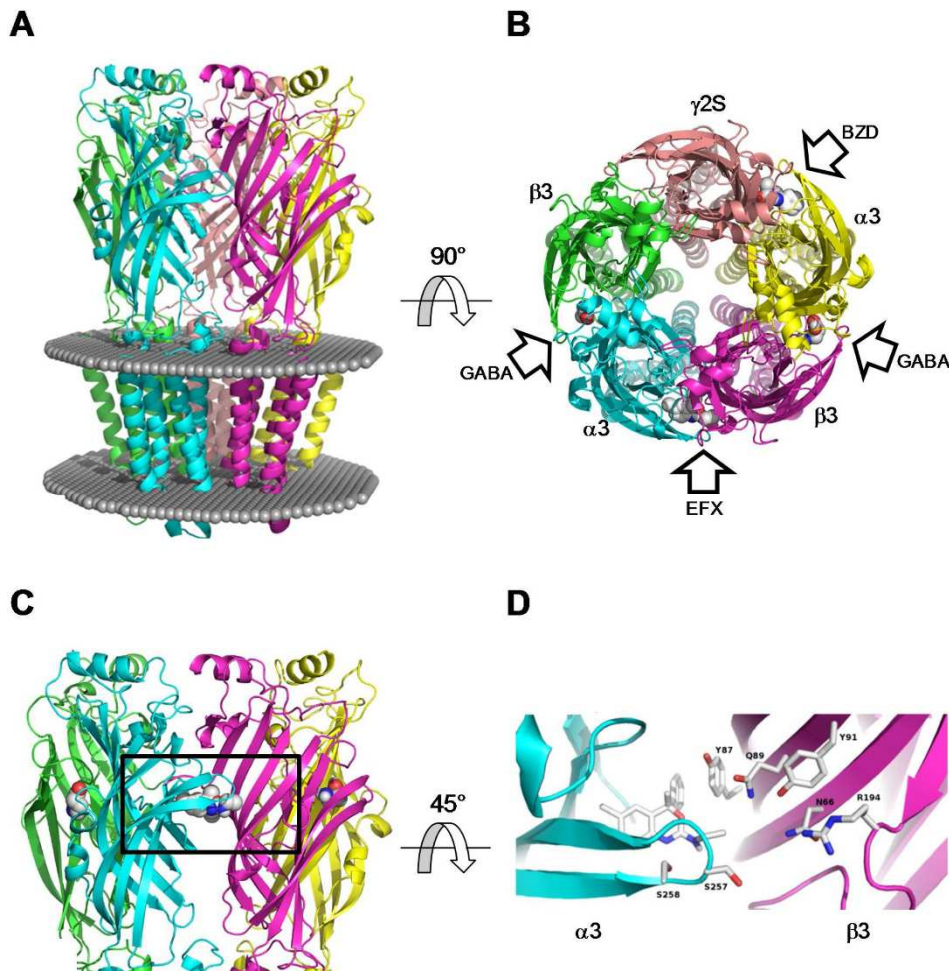


Figure 29 :

Modélisation de l'interaction de l'EFX obtenus avec le  $\text{RGABA}_A$   $\alpha 3\beta 3\gamma 2\text{S}$  de souris. A : modèle du récepteur vu depuis le plan de la membrane (cercles gris). Chaque sous-unité est représentée avec une couleur différente. B-D : modélisation de de liaison d'EFX sur le récepteur  $\alpha 3\beta 3\gamma 2\text{S}$  de souris. L'EFX (représentation CPK) interagit avec une poche localisée à l'interface  $\alpha 3$  (cyan)/ $\beta 3$  (magenta), homologue aux sites de liaison du GABA. Les sites de liaison des BZD, du GABA et de l'EFX sont indiqués par des flèches (B). Vue latérale du domaine extracellulaire (C). Gros plan de la poche de liaison de l'EFX (sous forme de bâtonnets) (D).

En conclusion, notre étude propose une caractérisation du mode d'action de l'EFX, montrant qu'elle potentialise la transmission GABA, principalement par l'interaction avec les  $\alpha 3\text{RGABA}_A$  et  $\alpha 2\text{RGABA}_A$ , impliqués dans l'anxiolyse, sans affecter les  $\alpha 1\text{RGABA}_A$  liés à la sédation. La simulation par modélisation indique que l'EFX pourrait interagir avec une poche localisée à l'interface des sous-unités  $\alpha/\beta$ , homologue au site de liaison du GABA. L'EFX pourrait servir de plate-forme moléculaire pour la conception de nouveaux anxiolytiques proposant une marge thérapeutique avantageuse.

#### 4.4.4. Publications/éditions associées

Mattei C, Ernest M, Lu W, 2024. The GABA<sub>A</sub> receptor: a target of pharmacologically active molecules. *Frontiers in Pharmacology* – Edited research topic

Soualah et al., 2021. GABA<sub>A</sub> Receptor Subunit Composition Drives Its Sensitivity to the Insecticide Fipronil. *Front Neurosci.* 15 : 768466

Mattei et al., 2019. Involvement of the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$  subunit in the mode of action of etifoxine. *Pharmacol Res.* 145 : 104250

Pineau et al., 2016. The medical use of lemon balm (*Melissa officinalis*) and valerian (*Valeriana officinalis*) as natural sedatives: insight into their interactions with GABA transmission. *Int J Clin Pharmacol Pharmacother* 1 : 112

# 5. Projets développés

### **5.1. Contexte scientifique : le coup de chaleur d'exercice**

Ce projet de recherche fait l'objet de plusieurs financements (DGA-AID ; ANR-Astrid ; Inserm ; Inter SFR – cf. section 3.1.1).

Depuis plus d'une vingtaine d'années, des vagues de chaleur record sont enregistrées avec une fréquence croissante. Elles sont à l'origine d'une létalité importante liée à ces températures chaudes, notamment sous la forme de coups de chaleur, partout dans le monde. Le coup de chaleur est une situation pathologique liée à des températures extérieures hautes, qui se caractérise par une élévation rapide de la température corporelle au-dessus de 40°C, avec une dysfonction du système nerveux central. Il est qualifié de classique lorsqu'il résulte d'une exposition passive à une chaleur environnementale élevée et d'effort (CCE) lorsqu'il se développe au cours d'un exercice physique intense (Bouchama et al., 2022).

Le CCE est un syndrome aigu qui survient dans différents contextes de contrainte physiologique pour l'individu. Il peut concerner des sujets jeunes, en bonne santé et présentant des capacités physiques satisfaisantes. Il est souvent observé en milieu sportif et chez des personnels militaires en exercice (Figure 30). Il touche donc sporadiquement des individus jeunes et en bonne santé. Sous soins intensifs, la mortalité atteint 26,5 % pour les CCE. Si les facteurs environnementaux (chaleur, humidité, absence de vent, radiation solaire importante) sont des conditions favorisantes et que la majorité des coups de chaleur survient en métropole au cours du printemps et de l'été, le CCE existe également par temps froid, voire par des températures négatives (15% des cas surviennent dans un environnement climatique tempéré). Mal pris en charge, il peut conduire au coma voire au décès du patient.

En contexte militaire, le CCE est soumis à une surveillance épidémiologique dans l'armée française depuis 1989 (Figure 30). Sur la période 2005-2011, plus de 650 cas de CCE ont été déclarés dans les rangs des militaires français, soit une incidence variant de 36 à 18 pour 100 000 personnels-année, avec une diminution significative au cours du temps de plus de 100 cas par an en 2006, et une stabilisation autour de 70 à 80 cas par an depuis 2010 (Duron-Martineau, 2012).

En milieu civil, les activités sportives les plus en cause sont la course à pied, le cyclisme et les sports collectifs. En 1984, la coureuse Gabriela Andersen-Schiess achève l'épreuve olympique du marathon dans un stade caniculaire, le corps déformé par un CCE sous l'œil des médecins. En 2007, le marathon de Chicago qui s'est couru sous des températures extrêmes a été endeuillé par la mort d'une personne, et 350 autres ont dû être hospitalisés. Récemment le taux de récurrence du CCE a été étudié dans les données médicales de 17 années de la Falmouth Road Course. Sur 174.853 finishers et 333 CCE recensés, l'incidence de la récurrence s'élevait à 11% avec un risque relatif multiplié par 3 pour les coureurs ayant un antécédent de CCE (Stearns et al., 2020). Le réchauffement climatique et le

déroulement de compétitions sportives dans des pays aux climats particulièrement contraignants (mondiaux d'athlétisme à Doha en 2019, JO de Tokyo de 2021, coupe du monde de foot au Qatar en 2022) a renforcé l'intérêt du monde sportif pour ces questions (Le Monde, 28.03.2024).

Les études révèlent que le CCE se manifeste par des lésions des cellules endothéliales, des inflammations, des thromboses généralisées et des hémorragies dans la plupart des organes (Bouchama et al., 2022). Les survivants d'un CCE peuvent souffrir de séquelles, notamment des troubles neurologiques et cardiovasculaires à long terme. Il n'existe à ce jour aucune thérapie spécifique autre qu'un refroidissement rapide par immersion dans l'eau tiède ou froide. L'approche développée par le service de santé des armées (SSA), avec lequel nous collaborons dans le cadre de ce projet ANR-Astrid, considère qu'il existe clairement une variabilité individuelle importante dans la tolérance physiologique au chaud, la question de la part de l'inné et de l'acquis dans la tolérance à la chaleur restant actuellement encore débattue (Hosokawa et al., 2019).

Nous nous sommes orientés vers l'identification à la fois de biomarqueurs et des mécanismes fondamentaux qui prédisposent un individu au CCE.



Figure 30 : à gauche, l'arrivée de l'athlète suisse Gabriela Andersen-Schiess au marathon des JO de Los Angeles (1984). Démarche chancelante, trajectoire incertaine, la jambe droite raide et le bras gauche pendant sur le côté. Au centre, à la fin de l'épreuve du 50 km marche des championnats du monde, à Doha, le 29 septembre 2019. © Mustafa Abumunes/AFP. A droite, opération « capacité opérationnelle » à Djibouti impliquant des personnels militaires en tenue NRBC. La température sous la combinaison avoisine les 50°C, un contexte favorable à la survenue du CCE. © MinDef

Pour ce qui concerne le poids des facteurs génétiques, l'identification en France de variants de deux gènes, RYR1 et TRPV1, responsables d'une prédisposition au CCE a constitué une avancée majeure, aucune canalopathie associée à TRPV1 (Figure 31) n'ayant été décrite jusque-là. Successivement en 2016, puis en 2020, l'équipe de Julien Fauré, avec lequel nous collaborons, a identifié 3 mutations de RYR1 et 2 mutations de TRPV1 au sein respectivement de cohortes de personnels militaires ayant subi un CCE (Roux-Buisson et al., 2016 ; Bosson et al., 2020).

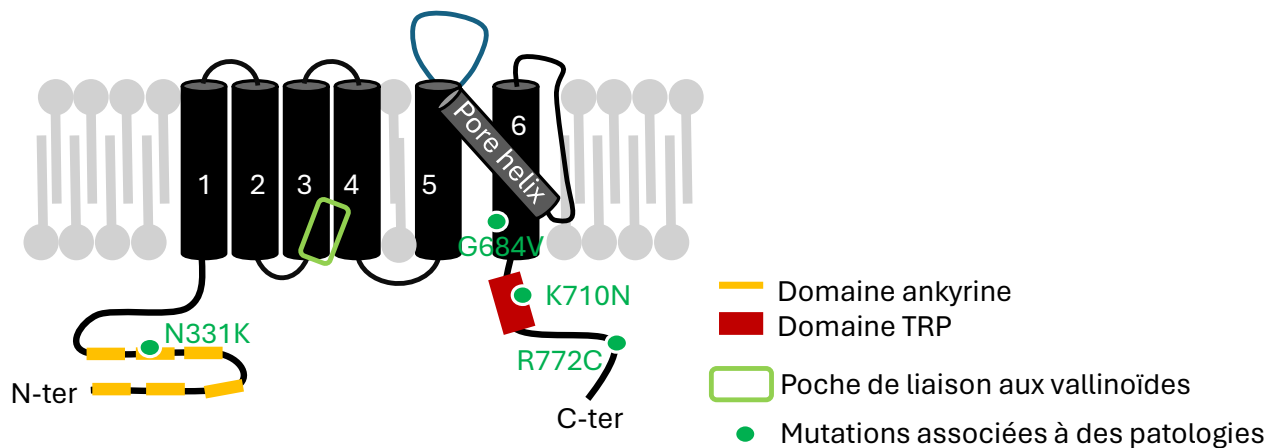


Figure 31 : représentation schématique d'une sous-unité du récepteur TRPV1 humain avec ses six segments TM (extrémités N- et C- terminales en intracellulaire) et les résidus associés à des variants impliqués dans des canalopathies (douleur et/ou thermorégulation)

Ce premier pas dans la compréhension des facteurs génétiques de prédisposition au CCE a souligné l'importance de l'homéostasie calcique cellulaire dans la physiopathologie du CCE, car RYR1 et TRPV1 sont des canaux calcium. Le lien entre la tolérance innée à la chaleur et le risque de survenue de CCE peut donc être génétique même s'il reste encore largement méconnu. Le CCE est considéré plus comme un accident que comme une pathologie, qui survient à travers la conjonction de circonstances extérieures notamment climatiques et d'exercice, de facteurs précipitants extérieurs, tels que le manque de sommeil, la déshydratation, une infection intercurrente, une prise médicamenteuse, et/ou des facteurs individuels intrinsèques, comme ceux qui viennent d'être évoqués.

## 5.2. TRPV1 et l'hypothèse mitochondriale

Les mitochondries se trouvent au carrefour du métabolisme, de la respiration, de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et de l'apoptose. Dans les cellules eucaryotes, la mitochondrie est l'organe responsable d'environ 90% de la production d'énergie (Rolfe & Brown 1997). Cette énergie, sous forme d'ATP, s'accompagne d'une dissipation de chaleur qui fait de la mitochondrie un « hot spot », lui conférant un rôle crucial dans la thermogénèse cellulaire et physiologique (Beignon et al., 2022). Plus

encore, des résultats publiés par nos collègues parisiens du laboratoire NeuroDiderot (Inserm, Univ Paris Cité) indiquent que les mitochondries forment de véritables micro-domaines où la température excède largement la température physiologique normale de 37°C. L'activité enzymatique de la chaîne respiratoire mitochondriale est en effet maximale pour une température de 50°C (Chrétien et al., 2018). Ces données ont été obtenues sur des cellules HEK et des fibroblastes, placées dans un milieu avec O<sub>2</sub>. La thermogenèse mitochondriale pourrait être physiologiquement exacerbée dans les organes métaboliquement actifs, comme les muscles, le SNC ou le cœur ou des tissus spécifiquement producteurs de chaleur comme le tissu adipeux brun, en réponse à des sollicitations aiguës (Figure 32). Par conséquent, les voies favorisant le découplage de la chaîne respiratoire et l'activité mitochondriale, telles que les flux de Ca<sup>2+</sup>, les acteurs protéiques du découplage, les cycles futiles constituent les principaux processus contrôlant de manière coordonnée la production de chaleur et la température cellulaire.

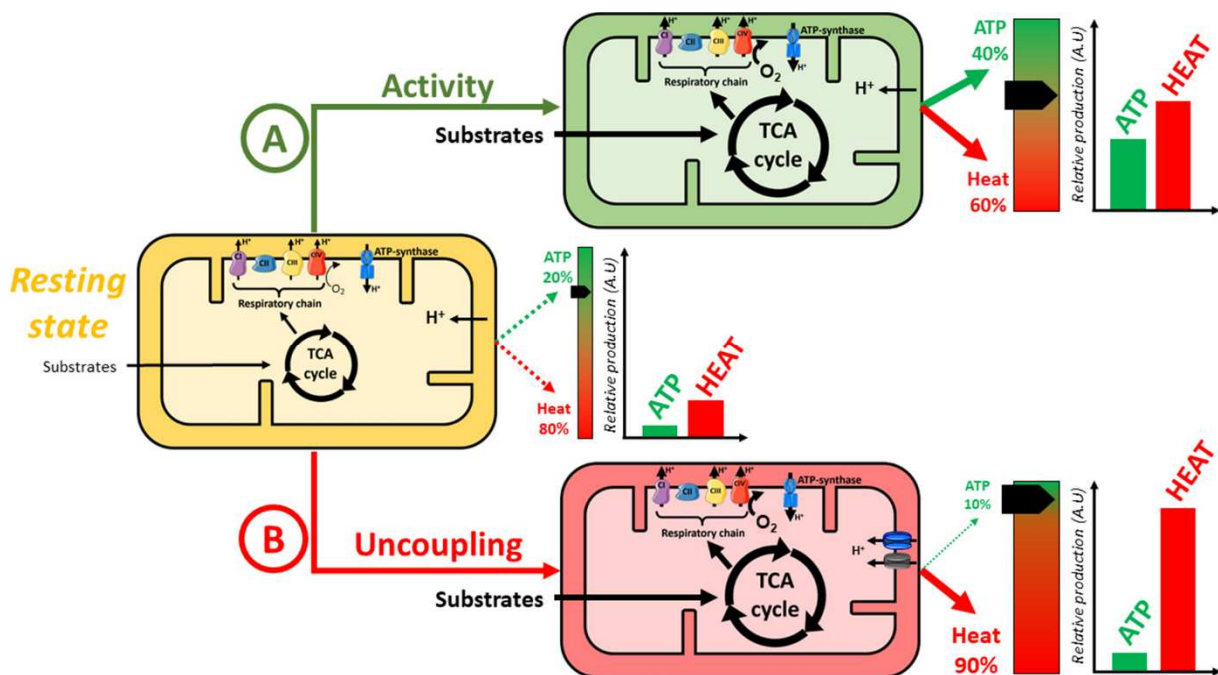


Figure 32 : schéma de l'équilibre entre production d'ATP et dissipation de chaleur dans la mitochondrie (Beignon et al., 2022). Dans les mitochondries, l'énergie dégagée par l'oxydation des substrats est convertie en ATP avec dissipation de chaleur. L'efficacité globale maximale de la phosphorylation oxydative est d'environ 40%/60% pour ATP/chaleur respectivement (A). Ce ratio peut être modulé en fonction des conditions physiologiques et des besoins cellulaires (B). Dans un muscle au repos par exemple, la balance ATP/chaleur augmente jusqu'à 20%/80% (centre du schéma). D'après Beignon et al., 2022.

Cet excès de température dans des zones discrètes du cytoplasme traduit le rôle d'« usine énergétique » dévolue à la mitochondrie et permet la régulation de la température cellulaire. Notre réflexion nous a conduits à postuler l'existence d'un ou de plusieurs senseur(s) thermique(s) au sein

des mitochondries, pour leur permettre de mesurer la température matricielle et adapter le niveau de thermogénèse. Compte-tenu (i) des données récentes sur l'implication du canal TRPV1 dans le CCE à travers des variants avec perte ou gain de fonction et (ii) et du fait que la température mitochondriale se situe au-delà du seuil d'activation de TRPV1 (43°C), nous avons pensé que ce récepteur polymodal pourrait jouer un rôle de thermo-senseur dans les cellules où il est exprimé. TRPV1 a déjà été décrit comme un canal exprimé dans la mitochondrie dans plusieurs études et associé à différentes fonctions : un effet d'amélioration de la fonction cardiaque lorsqu'elle est altérée par un régime salé, la migration de cellules microgliales, une altération de la fonction endothéliale associée au diabète (Lang et al., 2015 ; Miyake et al., 2015 ; Otto et al., 2020).

La mitochondrie joue un rôle primordial dans l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire : c'est elle qui capte le  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du RE pour éviter que la concentration calcique cytosolique ne soit trop importante. En séquestrant puis en libérant le  $\text{Ca}^{2+}$ , les mitochondries jouent ainsi un rôle important de tampon calcique. La proximité des mitochondries avec les réserves de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE, grâce à la formation de sites de contact membranaire (MAM), couplé à la présence d'acteurs sélectifs du  $\text{Ca}^{2+}$  situé au niveau de la membrane mitochondriale externe (VDAC) et interne (MCU) permettent l'entrée de grandes quantités de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice mitochondriale (Figure 33).

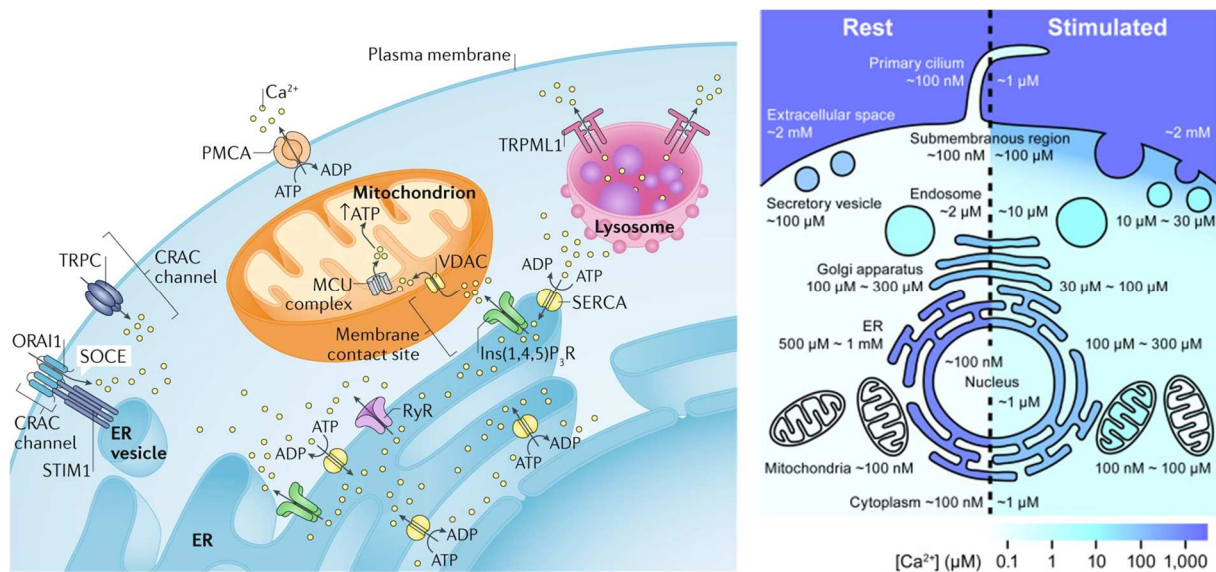


Figure 33 : Homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. A gauche : le réticulum endoplasmique ou sarcoplasmique (RE/RS) est le principal organite de stockage intracellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$ . Celui-ci en est libéré passivement par des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  RyR et  $\text{IP}_3\text{R}$ . Les ATPases  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum (SERCA) pompent activement le  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur du. Une fois libéré, le  $\text{Ca}^{2+}$  est capté par les mitochondries au niveau de sites de contact avec le RE par l'intermédiaire du canal VDAC (membrane externe) et du MCU (membrane interne), ce qui active le métabolisme cellulaire. La vidange des réserves de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE induit l'activation de la d'une protéine senseur de  $\text{Ca}^{2+}$  (STIM1) aux jonctions entre le RE et la membrane plasmique, où elle se lie le canal  $\text{Ca}^{2+}$  ORAI1 pour favoriser l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  depuis le milieu extracellulaire. Cet influx de  $\text{Ca}^{2+}$  est également médié par les canaux TRPC, dont certains sont activés par la déplétion de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE (Riccio et al., 2002). Les  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases de la membrane plasmique (PMCA) ont pour fonction de pomper le  $\text{Ca}^{2+}$  à l'extérieur du cytosol et de maintenir la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  à une valeur basale. Les lysosomes sont considérés comme la deuxième réserve la plus importante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, et ils sont capables de libérer du  $\text{Ca}^{2+}$  par l'intermédiaire du canal mucopolypeptide 1 (TRPML1). A droite : les concentrations intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  dans des conditions de repos ou de stimulation de la cellule. D'après Giorgi et al., 2018 ; Suzuki et al., 2016.

### 5.3. Problématique et résultats actuels

Chez les animaux homéothermes, la régulation de la température est gérée au niveau cellulaire par la mitochondrie, qui assure le processus de thermogénèse, c'est-à-dire de production de chaleur, parallèlement à la production d'ATP. Des données récentes suggèrent qu'elle pourrait jouer un rôle de « radiateur cellulaire dans une pièce mal isolée » (Macherel et al., 2021 ; Beignon et al., 2022). La température mitochondriale serait en effet proche de 50°C lorsque les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire sont en pleine activité (Chrétien et al., 2018). Ce résultat remet en cause nos connaissances de la physiologie et du métabolisme cellulaire, dont les réactions sont supposées se produire à 37°C chez les mammifères.

Nous postulons qu'il existe au sein de la mitochondrie un thermostat moléculaire, qui se déclenche lorsque la température est haute de manière à « rafraîchir » la mitochondrie lorsque son activité métabolique est importante. Nous proposons que ce thermostat corresponde à un canal ionique thermosensible, donc potentiellement TRPV1.

**Les travaux de la thèse de Florian Beignon sont venus éclairer et confirmer cette hypothèse, par une approche cellulaire et pharmacologique.**

Nous avons identifié un variant d'épissage alternatif de TRPV1 doté d'une séquence d'adressage mitochondriale (MTS) dans la banque de données NCBI (n° d'accèsion DQ177332). Aligné pour comparaison avec la forme plasmique de TRPV1 (pmTRPV1) (Caterina et al., 1997), le variant DQ177332 (mitoTRPV1) présente deux particularités dans l'organisation de sa structure. Primo, le démarrage de la traduction est réalisé par un codon d'initiation alternatif (ATG) dans l'exon n°1. Ce codon d'initiation se situe dans un autre cadre de lecture, et modifie de fait la séquence protéique correspondant aux exons n°1 et 2 (Figure 34A). Deuxio, l'intron situé entre l'exon codant n°2 et n°3 est retenu lors de l'épissage du pré-ARNm, ce qui induit un second décalage restaurant le cadre de lecture consensuel de pmTRPV1 à partir de l'exon n°3. De fait, la traduction du variant DQ177332 aboutit à la formation d'un signal d'adressage mitochondrial de 150 acides aminés en amino-terminal, et potentiellement d'un isoforme mitochondrial de TRPV1. La séquence N-terminale correspond à une MTS indispensable à l'adressage intra-mitochondrial de la protéine, avec un site de clivage prédit après le 138<sup>ème</sup> acide aminé (Figure 34B).

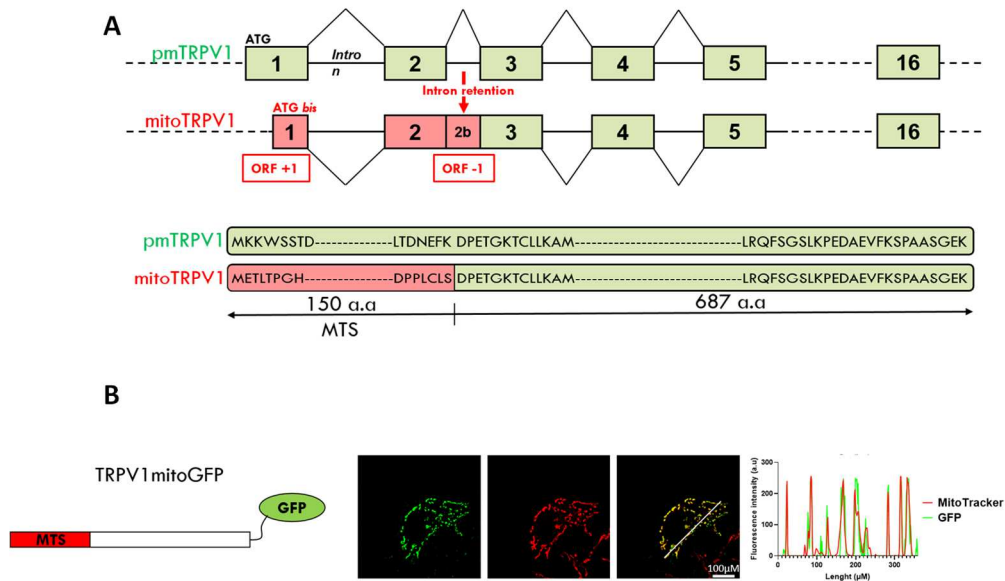


Figure 34 : identification d'un variant mitochondrial du canal TRPV1 humain. A : comparaison des séquences de pmTRPV1 et mitoTRPV1 faisant apparaître le décalage/rattrapage du cadre de lecture. En amont du gène, une séquence MTS dans la partie N-terminale (normalement constituée de séquences ankryne répétées). B : la séquence MTS permet d'adresser la protéine mitoTRPV1 spécifiquement aux mitochondries (cellules SNB75 transfectées).

La caractérisation fonctionnelle de ce variant mitoTRPV1 a été réalisée par comparaison avec pmTRPV1 par mesure du  $\text{Ca}^{2+}$ . Plusieurs sondes ont été utilisées : le Fura2-AM pour estimer les variations de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique et le N33d3cpv pour estimer le  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau des hotspot mitochondriaux. Pour ce faire, les cellules transfectées transitoirement ont été stimulées avec la RTX  $1 \mu\text{M}$  (Figure 35A). Celle-ci induit une augmentation transitoire de  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$  dans les cellules surexprimant pmTRPV1 et mitoTRPV1 (Figure 35B). La réponse des cellules exprimant mitoTRPV1 est beaucoup plus faible que celles qui expriment pmTRPV1 (Figure 35C).

Au niveau des hot spot mitochondriaux, la RTX induit une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}_{\text{hot spot}}$  dans les cellules qui surexpriment la forme plasmique ou mitochondriale du canal, là encore de manière beaucoup plus importante dans les cellules HEK293-pmTRPV1.

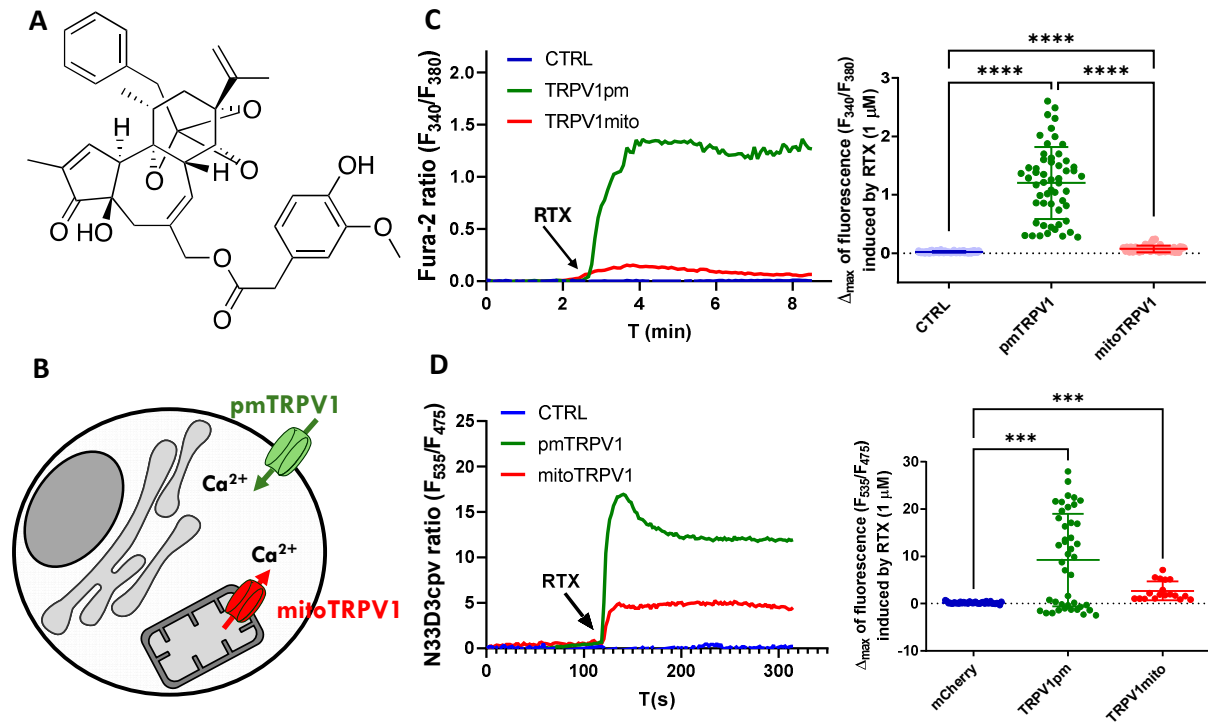


Figure 35 : Rôle de mitoTRPV1 dans l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. A : structure de la RTX, utilisée comme agoniste spécifique de TRPV1. B : le canal TRPV1 est surexprimé à la membrane plasmique (pmTRPV1) ou dans les mitochondries (mitoTRPV1) dans des cellules HEK293. C : le  $\text{Ca}^{2+}$  cyt est mesuré à l'aide de la sonde Fura2-AM en microscopie à fluorescence. Avant et après addition de RTX. D : le  $\text{Ca}^{2+}$  hot spot est mesuré à l'aide de la sonde N33D3cpv en microscopie à fluorescence.

Ces résultats indiquent que le canal mitoTRPV1 est à l'origine d'un efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  depuis la matrice mitochondriale vers le cytosol. Afin de tester le rôle de thermostat du canal mitoTRPV1, nous avons mesuré les variations de température mitochondriale, en nous appuyant sur la sonde thermosensible mitochondriale MTY (Chrétien et al., 2018, Figure 36A). Celle-ci émet de la fluorescence inversement proportionnelle à l'augmentation de la température (Figure 36BC). Dans un protocole où les cellules HEK293 sont mises à respirer, puis stimulées ou non avec la RTX, les résultats indiquent que :

- dans des conditions contrôles, les mitochondries chauffent jusqu'à  $50^{\circ}\text{C}$  (figure 36D)
- l'expression de mitoTRPV1 limite la température mitochondriale à  $44^{\circ}\text{C}$  (figure 36D)
- de surcroît, l'activation de mitoTRPV1 par la RTX abaisse la température à  $40^{\circ}\text{C}$  (figure 36D)
- quelles que soient les conditions, les cellules respirent normalement et la production d'ATP n'est pas affectée (figure 36EF)

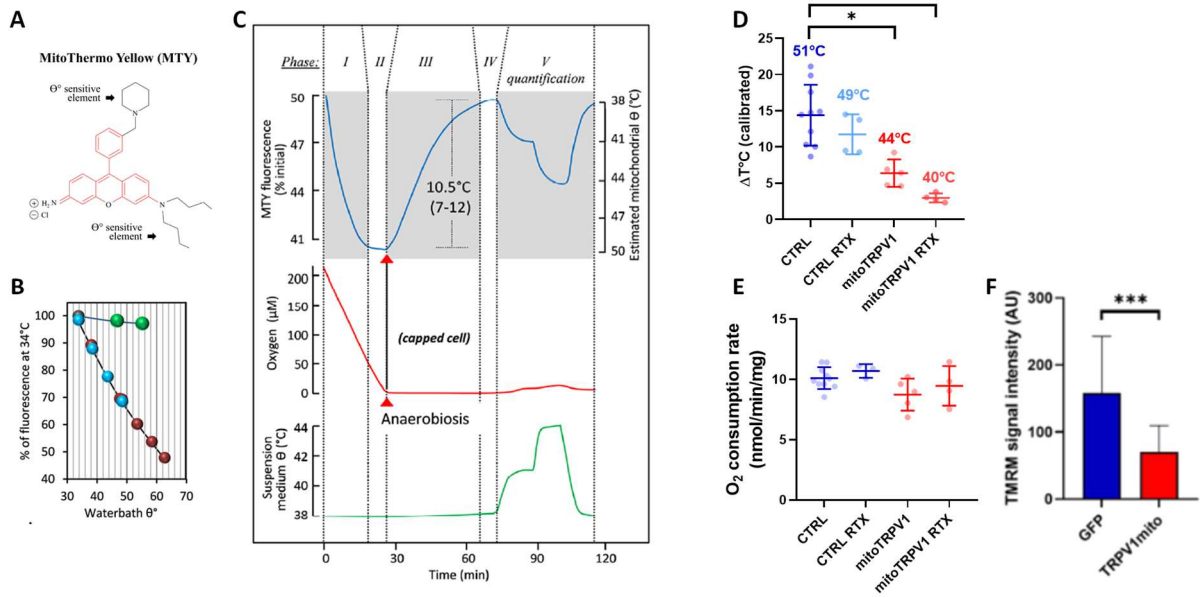


Figure 36 : implication de mitoTRPV1 dans la régulation de la température mitochondriale. A : structure de la sonde MTY. B : évaluation d'une diminution de la fluorescence de la sonde MTY en fonction de la température. C : protocole mis en œuvre pour mesurer la température mitochondriale. Les cellules sont successivement mises à respirer puis en anaérobiose. La température est évaluée en calibrant la température du milieu. D : mesure de la température mitochondriale dans les cellules HEK293, CTRL et exprimant le canal mitoTRPV1, stimulées ou non avec la RTX. E, estimation de la consommation d'O<sub>2</sub> des cellules. F, mesure en fluorescence de la production d'ATP dans les cellules HEK293 CTRL ou exprimant mitoTRPV1.

Il ressort de ces données que le canal mitoTRPV1 (i) est spécifiquement adressé aux mitochondries, (ii) qu'il facilite la sortie de Ca<sup>2+</sup> de la mitochondrie vers le cytosol, (iii) qu'il permet aux cellules de diminuer la température mitochondriale, (iv) sans altérer la respiration, (v) ni la production d'ATP (Figure 37).

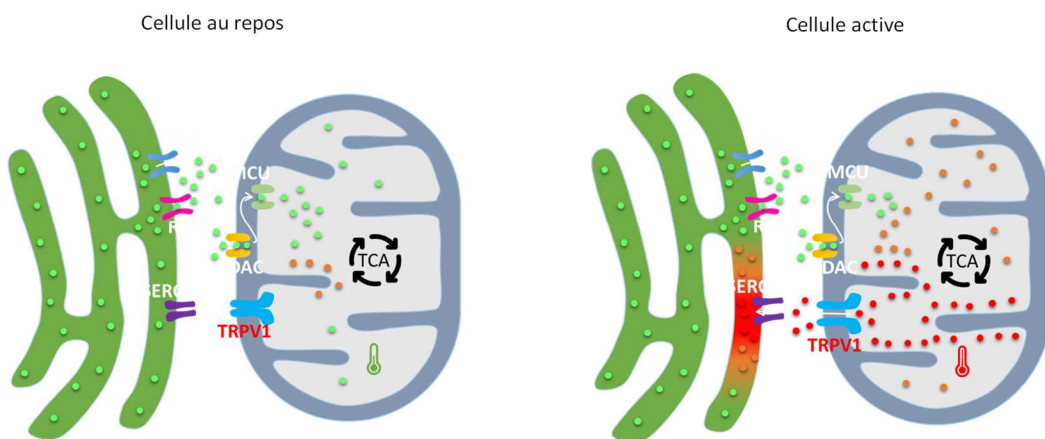


Figure 37 : rôle putatif du canal mitoTRPV1. A la manière d'un climatiseur, lorsque la cellule est active, le canal régule la concentration de Ca<sup>2+</sup> intra-mitochondriale et diminue la température, sans modifier la production d'ATP. Schéma de Florian Beignon.

#### **5.4. Axe de recherche 1 : valider l'hypothèse d'un « thermostat mitochondrial » dans des cellules natives**

La mise en évidence de mitoTRPV1 a été réalisée dans des systèmes d'expression, c'est-à-dire en transfectant des lignées cellulaires avec le canal et en réalisant des tests pour caractériser son expression et sa fonction.

L'objectif de cet axe de recherche est d'étudier la fonction de mitoTRPV1 dans des lignées cellulaires humaines afin de mettre en évidence son rôle physiologique sans le surexprimer (collaboration avec Valentine Suteau/Mathilde Munier dans le cadre projet inter-équipes). Compte-tenu de la nature de mitoTRPV1 – c'est-à-dire un variant d'épissage de pmTRPV1 – l'expression de mitoTRPV1 sera étudiée dans des cellules décrites pour exprimer pmTRPV1, au niveau transcriptionnel par qPCR et au niveau protéique par immunomarquage et microscopie confocale. Nous avons réfléchi à différentes lignées cellulaires, parmi lesquelles des cellules thyroïdiennes (lignée 8505C, Xu et al., 2020), des neuroblastomes (lignée SH-SY5Y, Chaban et al., 2013) et des cellules tumorales d'un cancer du sein (lignée SUM149PT, Weber et al. 2016).

Dans un second temps, l'activité de mitoTRPV1 sera caractérisée en mesurant les variations de flux calciques cellulaires grâce à l'utilisation de la sonde calcique Fura-2AM, en suivant un protocole déjà mis au point par l'équipe CarMe dans ces lignées. L'activation spécifique de mitoTRPV1 sera réalisée dans un premier temps grâce à la RTX, l'agoniste perméant de TRPV1, dans un milieu extracellulaire dépourvu de  $Ca^{2+}$ . Dans un second temps, nous stimulerons les cellules à l'aide d'une activation physiologique, tel qu'une activation neuronale pour les cellules SH-SY5Y, afin de confirmer dans un contexte plus physiologique notre hypothèse du rôle de thermostat cellulaire de mitoTRPV1.

#### **5.5. Axe de recherche 2 : rechercher/créer des ligands spécifiques de mitoTRPV1 sans modifier la forme plasmique**

Compte-tenu de l'absence de bons anticorps spécifiques de pmTRPV1 et mitoTRPV1, nous envisageons de trouver un agoniste sélectif parmi des molécules naturelles. On sait que les venins animaux sont riches en peptides actifs sur des récepteurs membranaires, à l'origine de douleurs ressenties au cours d'une envenimation. Nous postulons qu'il existe dans les venins des toxines affines pour mitoTRPV1, comme cela a déjà été démontré pour pmTRPV1 (Figure 38), notamment dans les venins de scorpions qui sont riches en peptides courts. Nous testerons les venins de deux scorpions (*Hottentotta judaicus* et *Leiurus abdullahbayrami*) prélevés au Liban (collaboration avec Ziad Fajloun de l'Université du Liban – Tripoli), afin d'identifier un potentiel agoniste ou antagoniste de TRPV1, en utilisant des cellules

HEK293 exprimant pmTRPV1. Si nous identifions une toxine active sur TRPV1, nous lui grefferons par synthèse chimique une séquence MTS en amino-terminal, afin de l'adresser spécifiquement à la mitochondrie, et de tester son activation spécifique de mitoTRPV1.

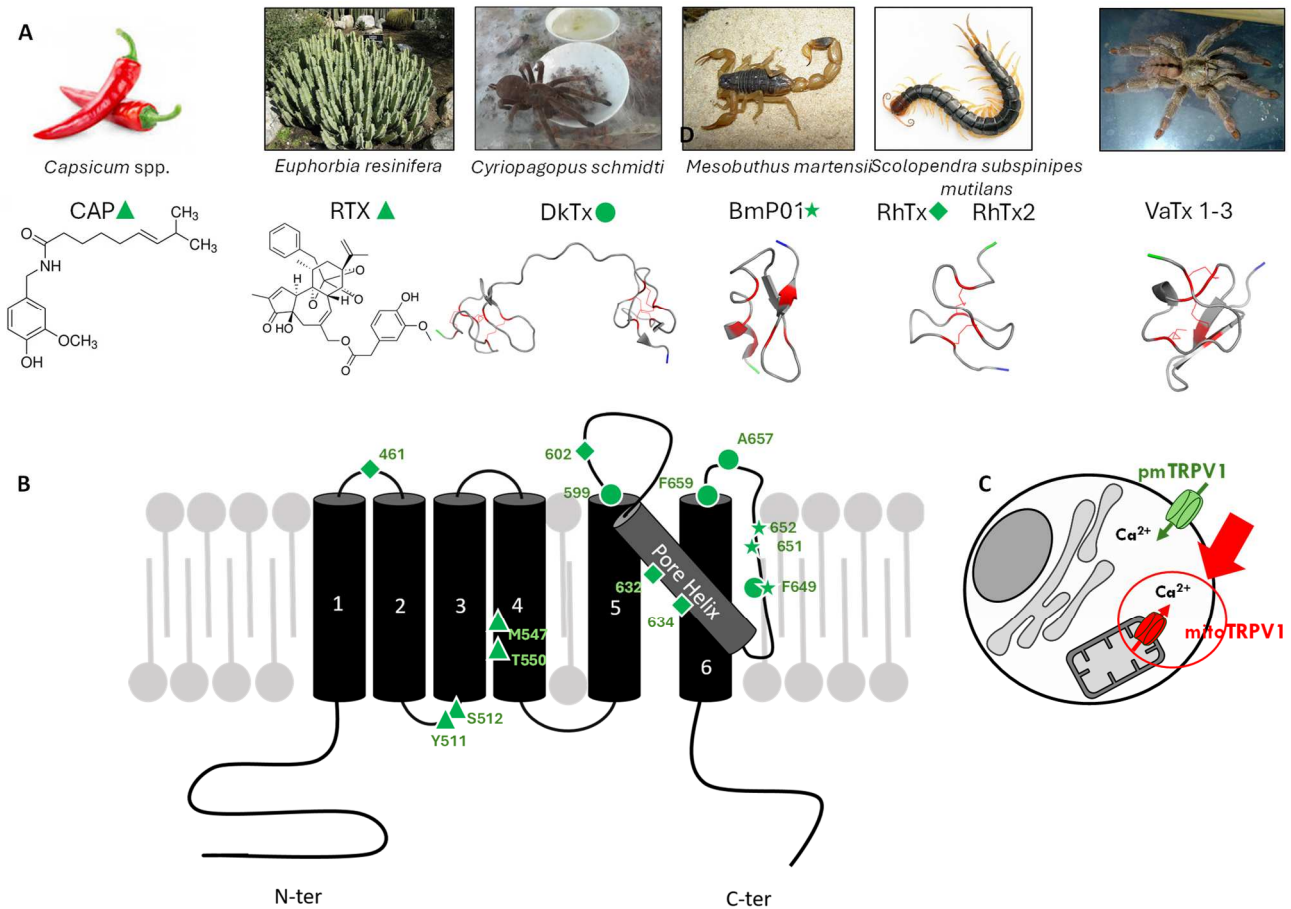


Figure 38 : Cibler mitoTRPV1. A,B : représentation schématique de la sous-unité de TRPV1 avec les différentes toxines animales/végétales connues pour l'activer. La structure des toxines et leur origine sont indiquées. Les sites d'interaction correspondant aux différentes toxines sont représentés sur TRPV1. C : l'un des challenges de notre projet est le ciblage spécifique de mitoTRPV1 sans affecter la forme membranaire.

Alternativement, nous avons établi une collaboration avec Clément Cabanetos (CNRS UMR 6200, Moltech-Anjou, SFR-MATRIX, Angers) pour concevoir des ligands « à façon » de mitoTRPV1. Il pourrait prendre la forme d'une « mitoCAP » ou d'une « mitoRTX », c'est-à-dire de coupler la CAP ou la RTX à un cargo mitochondrial susceptible d'orienter ces deux agonistes de TRPV1 vers le compartiment mitochondrial. Notre préférence va à la RTX, dont la spécificité pour TRPV1 est exclusive, la CAP induisant des effets déjà décrits sur la chaîne respiratoire mitochondriale.

### 5.6. Axe de recherche 3 : caractériser les altérations physio-pharmacologiques des variants de mitoTRPV1

Ces dernières années, plusieurs variants de TRPV1 ont été décrits, à l'origine de pathologies de la thermorégulation (HT ou CCE) ou de la sensibilité thermique (nociception) (Vanden Abeele et al., 2019 ;

Bosson et al., 2020 ; Katz et al., 2023 ; He et al., 2023) (Figure 31). Nous souhaitons étudier les effets des ces variants de TRPV1 sur la régulation thermique de mitoTRPV1 et la physiologie mitochondriale. Les 5 variants pathogènes connus de TRPV1 seront insérés dans l'ADNc de mitoTRPV1 et transfectés dans des cellules TRPV1 KO. Chaque isoforme mitoTRPV1 sera évaluée pour ses effets sur la température mitochondriale, l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  et la respiration mitochondriale, en utilisant des protocoles déjà définis dans le cadre des travaux passés de Florian Beignon. En utilisant une approche similaire, nous évaluerons l'activation dose-réponse des variants mitoTRPV1 par CAP ou RTX, afin de corrélérer la thermo-sensibilité à l'affinité pour les deux agonistes TRPV1.

#### **5.7. Axe de recherche 4 : caractériser les variants de TRPV1 le long d'un gradient latitudinal**

De nombreuses données génétiques ont montré que des loci spécifiques ségrégent dans les populations humaines en fonction de leur origine géographique selon l'hétérogénéité du climat. Par exemple, il existe une forte variabilité latitudinale sur le gène TRPM8 qui code pour un thermosenseur des températures fraîches (<27°C) : l'origine Africaine d'un allèle a ainsi évolué avec la migration des populations vers les régions septentrionales tout en procurant un avantage adaptatif à la baisse de température (Key et al., 2018 – Figure 39), tout en conférant aussi une protection contre la migraine (ex : variant rs10166942 de TRPM8). Si l'adaptation locale à des contraintes climatiques repose sur des bases génétiques, nous proposons que des variants de pmTRPV1 et de mitoTRPV1 contribuent à l'équilibre thermogénèse/thermolyse en fonction d'un gradient latitudinal. De fait, nous envisageons de collecter et d'aligner toutes les variants des séquences codantes issus des 1500 polymorphismes identifiés dans le gène TRPV1, et les variations de séquences protéiques de TRPV1 humaines disponibles dans les banques de données (1000Genomes et gnomAD), et de les assigner à un climat ou une latitude spécifique. Les changements de nucléotides et d'acides aminés et leurs fréquences dans ces populations seront stratifiés en fonction de la région où vivent les populations, afin de déduire un gradient de variants ségrégant en fonction de la latitude (équateur vs pôles) et de la température climatique relative. Cela permettra d'identifier des marqueurs moléculaires TRPV1 reflétant l'adaptation de la régulation de la température humaine à la niche climatique, voire la susceptibilité/résistance à l'hyperthermie, et de tester leurs effets sur l'activation de mitoTRPV1 et les conséquences sur la régulation de la thermogénèse mitochondriale.

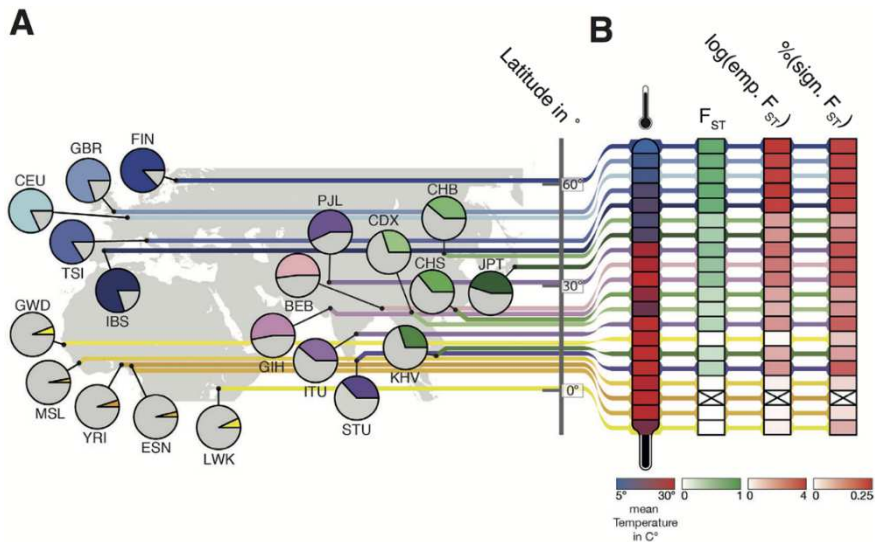


Figure 39 : répartition de la fréquence allélique pour rs10166942 en fonction de la température moyenne. A : situation géographique des populations observées, avec la fréquence des allèles dérivés de l'allèle rs10166942 dans les diagrammes circulaires (allèle en couleur selon la population), et leur latitude. B : en colonnes, la température moyenne annuelle dans la station géographique de chaque population, le niveau de différenciation des populations basé sur la distance génétique ( $F_{ST}$ ). D'après Key et al., 2018.

# **6. Activités éditoriales - Rayonnement**

## 6.1. Expertise scientifique avec l'ANSES

### 2015-2022 :

- membre du comité d'experts spécialisés ERCA (Evaluation des risques physico-chimiques liés aux aliments)
- membre et président du GT brevétotoxines
- membre du GT *Ostreopsis*
- membre du GT cyanobactéries/cyanotoxines
- membre et président du GT pinnatoxines
- membre du GT BMAA

**2022-2023** : State of knowledge on the risks to human health related to the proliferation of *Ostreopsis* spp. on the Basque coastline. <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2021SA0212.pdf>

**2021** : Brevetoxins in shellfish: proposal of a guideline value to protect consumers. <https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2020SA0020Ra-b.pdf>

**2020** : Risk assessment on the presence of cyanobacteria and their toxins in drinking water, recreational water and water intended for professional and recreational fishing activities. <https://www.anses.fr/en/system/files/EAUX2016SA0165Ra.pdf>

**2019** : Assessment of the health risks associated with pinnatoxins in shellfish. <https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2016SA0013Ra.pdf>

**2017** : Acute and chronic toxicity of BMAA (beta-methylamino-L-alanine). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2016SA0012Ra.pdf>

**2016** : State of knowledge concerning the contamination of freshwater fish by cyanotoxins. Scientific and technical support report. <https://hal-anses.archives-ouvertes.fr/anses-01419666/document>

**2015** : Opinion related to a draft order on edible varieties of cultivated and wild cultivated and wild mushrooms. <https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2015SA0180.pdf>

## 6.2. Membre de jurys de thèse

**Sophie Fouyet** (2022) - Etude du récepteur P2X7, nouveau biomarqueur dans l'évaluation des modulations hormonales et des effets délétères induits par les perturbateurs endocriniens chez la femme enceinte : exploration sur différents modèles cellulaires humains. Université Paris Cité. Rapporteur. (Directeur de thèse : Patrice Rat)

**Joseph Khoury** (2018). « Screening of natural compounds of therapeutical interests and identifying inhibitors of snake venom enzymatic activities and modulators of ion channels » Université du Liban. Examineur. (Directeurs de thèse : Ziad Fajloun, Christian Legros)

**Yassine Benzidane** (2017) - Etude des effets de doses sublétales d'un néonicotinoïde, l'imidaclopride, sur les récepteurs cholinergiques de type nicotinique chez la blatte américaine, *Periplaneta americana*. Université d'Angers. Examineur. (Directeur de thèse : Christian Legros)

**Johan Mazeyrat** (2008) - Capteur de pression RFID pour le suivi des anévrismes de l'aorte abdominale. Université Paris 6. Examineur. (Directeurs de thèse : Patrick Garda et Olivier Romain)

## 6.3. Membre de CSI de thèse

**Apolline Urmann** (2022-2025) – « Rôle de la vasopressine et de l'apéline dans la pré-éclampsie » - CEA-Saclay (encadrants : Mathilde Keck, Nicolas Gilles)

**Théo Fréchar** (2021-2024) – « Effets d'une co-exposition chimique et radiologique sur les paramètres de la toxicité cérébrale *in vivo* chez le rat » - IRSN-Fontenay aux Roses (encadrants : Isabelle Brunet, Dmitry Klovov)

## 6.4. Revues éditées

**2023-2024** : Editeur d'un numéro spécial de *Frontiers in Pharmacology*

Titre: **The GABA<sub>A</sub> receptor: a target of pharmacologically active molecules**

Co-éditeurs: Margot Ernst (Medical University of Vienna), Wei Lu (NIH National Institute of Neurological Disorders and Stroke)

6 articles (avril 2024)

<https://www.frontiersin.org/research-topics/53826/the-gabaa-receptor-a-target-of-pharmacologically-active-molecules>

**2023-2024** : Editeur d'un numéro spécial de *Membranes*

Titre: **The Xenopus Oocyte: A Tool for Membrane Biology** – Volume II

Co-éditeur: Agenor Limon (University of Texas Medical Branch)

6 articles (avril 2024)

[https://www.mdpi.com/journal/membranes/special\\_issues/27F07J5107](https://www.mdpi.com/journal/membranes/special_issues/27F07J5107)

**2021-2022** : Editeur d'un numéro spécial de *Membranes*

Titre: **The Xenopus Oocyte: A Tool for Membrane Biology** – Volume I

Co-éditeur: Agenor Limon (University of Texas Medical Branch)

14 articles

[https://www.mdpi.com/journal/membranes/special\\_issues/xenopus\\_oocyte](https://www.mdpi.com/journal/membranes/special_issues/xenopus_oocyte)

**2020-2022** : Editeur d'un numéro spécial de *Frontiers in Neuroscience* (Figure 40)

Titre: **Pharmacological Aspects of Ligand-gated Ion Channels as Targets of Natural and Synthetic Agents**

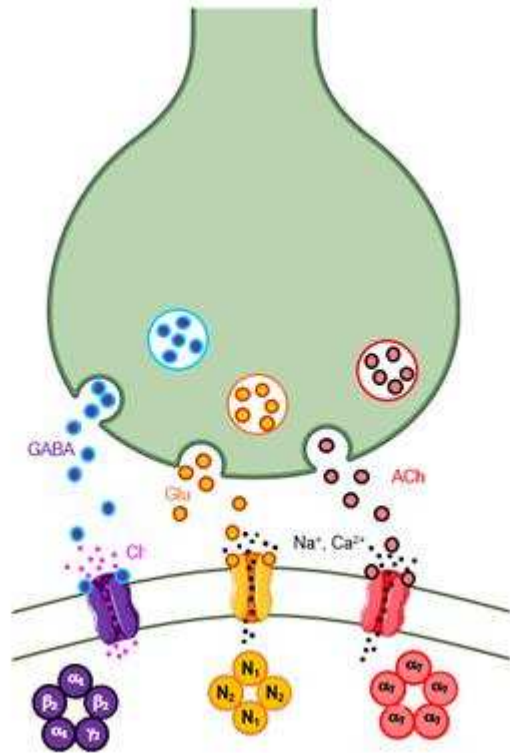


Figure 40: image associée au numéro spécial de *Frontiers in Neuroscience*, édité en 2022.

Co-éditeurs: Richard Lewis (University of Queensland), Hélène Tricoire-Leignel (Université d'Angers), Jordi Molgo (CNRS-CEA Saclay), Christian Legros (Université d'Angers)

18 articles

<https://www.frontiersin.org/research-topics/12341/pharmacological-aspects-of-ligand-gated-ion-channels-as-targets-of-natural-and-synthetic-agents>

## 6.5. Editeur associé

- Editeur associé pour le journal **Discover Toxicology** (Springer Nature) depuis 2024

<https://link.springer.com/journal/44339>

- Editeur associé pour les journaux **Frontiers in Neuroscience** (FI 5.152) depuis 2021, **Frontiers in Pharmacology** (FI 5.988) depuis 2022 et **Frontiers in Physiology** (FI 4.755) depuis 2021

<https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/editors>

<https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/editors>

<https://www.frontiersin.org/journals/physiology/editors>

- Membre de l'équipe de reviewers pour les journaux **Membranes** (FI 4.562), **IJMS** (FI 6.208) et **Toxins** (FI 5.075),

[https://www.mdpi.com/journal/membranes/submission\\_reviewers](https://www.mdpi.com/journal/membranes/submission_reviewers)

[https://www.mdpi.com/journal/ijms/submission\\_reviewers](https://www.mdpi.com/journal/ijms/submission_reviewers)

[https://www.mdpi.com/journal/toxins/submission\\_reviewers](https://www.mdpi.com/journal/toxins/submission_reviewers)

## 6.6. Brevets/Logiciel

### Brevets

ISRAËL M, MOLGÓ J, BLOY C, MATTEI C (2001) Method for the prevention and/or treatment of glutamate cytotoxicity – Use of  $\beta$ -naphthoquinone for making medicines having an inhibiting effect on the release of glutamate by the brain. PCT WO01/05404 (25.01.2001) – Développé par Domain Therapeutics (www.domaintherapeutics.com/) sous le nom FP001

ISRAËL M, MOLGÓ J, BLOY C, MATTEI C (1999). Nouvelle utilisation de dérivés de la  $\beta$ -naphthoquinone et de leurs sels pour la fabrication de médicaments exerçant un effet inhibiteur sur la libération de glutamate dans le cerveau. Brevet n° 99 09469 (21.07.1999)

### Logiciel

FAURE S, LEGROS C, TRICOIRE-LEIGNEL H, MATTEI C. (2018). ExAvir software – Université d'Angers.

## 6.7. Vulgarisation écrite

LENAERS G, MATTEI C, BEIGNON F. (2021) 37 °C été comme hiver : l'énigme de notre température corporelle. The Conversation <https://theconversation.com/37-c-ete-comme-hiver-lenigme-de-notre-temperature-corporelle-163149>

MATTEI C, MEUNIER FA (2012). Toxines botuliques : poison et médicament. Pour la Science 413 : 42-48

MATTEI C, LEGROS C (2011). Nicotine, un problème de poids. Biofutur 325 : 55-58

MATTEI, C. (2010) Mode d'action de nouvelles phycotoxines sur le système nerveux humain. Biofutur 310 : 16

MATTEI, C., (2009) Nanotechnologies : des outils au service de la biologie et de la médecine, mais avec quels risques ? Biofutur 301: 57-61

MATTEI, C., (2006) Le mouflon, sentinelle des cimes. Stantari 4 : 10-21

MATTEI, C., BENEDETTI, P., BIDEAU, E., RICHARD, F., et al. (2005) Stratégie, méthodes et enjeux de la gestion du mouflon (*Ovis gmelini musimon var. corsicana*) en Corse à travers un projet LIFE-Nature. Travaux scientifiques du Parc Naturel Régional de Corse 62 : 41-61

## 6.8. Media radio/télé/internet

13.10.2022 : Fête de la Science – Santé et changement climatique

**Intervention orale (podcast) de Florian Beignon et César Mattei**

<https://les-sentinelles-fds.lepodcast.fr/>

21.01.2022 : Des chercheurs angevins planchent sur les coups de chaleur des militaires. **Les Echos**.

<https://www.lesechos.fr/pme-regions/pays-de-la-loire/des-chercheurs-angevins-planchent-sur-les-coups-de-chaleur-des-militaires-1380956>

2021 : **Guy Lenaers , César Mattei, Florian Beignon**. Pourquoi, que la neige tombe ou que le soleil tape, notre température corporelle reste à 37°C ?. **Slate**.

<http://www.slate.fr/story/215189/37-degres-ete-hiver-neige-soleil-enigme-constante-temperature-corporelle-evolution>

2021: **Guy Lenaers , César Mattei, Florian Beignon**. Pourquoi notre température corporelle reste une énigme ? - Une énigme évolutive. **Numérama**.

<https://www.numerama.com/sciences/736708-pourquoi-notre-temperature-corporelle-reste-une-enigme.html>

08.03.2012 : La marche des sciences – France Culture : les toxines botuliques

#### **Intervention orale (podcast) de César Mattei**

<https://www.radiofrance.fr/franceculture/podcasts/la-marche-des-sciences/1962-2012-les-irradies-de-beryl-4639046>

2005 : Grandeur Nature – Le mouflon en Corse

#### **Intervention télévisée de César Mattei**

<https://www.youtube.com/watch?v=g27Y3qAN2es>

### **6.9. Réseaux sociaux**

- LinkedIn : 754 relations (Février 2024)

<https://fr.linkedin.com/in/c%C3%A9sar-mattei-205853135>

- Researchgate

<https://www.researchgate.net/profile/Cesar-Mattei>

- Web of Science :

<https://www.webofscience.com/wos/author/record/K-5286-2015>

## Références bibliographiques

- Abraham WM, Bourdelais AJ, Sabater JR, Ahmed A, Lee TA, Serebriakov I, Baden DG, 2005. Airway responses to aerosolized brevetoxins in an animal model of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 171(1):2 6-34. doi: 10.1164/rccm.200406-735OC
- Achaibar KC, Moore S, Bain PG, 2007. Ciguatera poisoning. *Pract Neurol*. 7(5): 316-22. doi: 10.1136/jnnp.2007.
- ANSES, 2021. Les brévétoxines. Exposition par consommation de coquillages, par inhalation d'embruns ou par contact en cas de baignade ou d'activités nautiques. Avis révisé et avis de l'Anses. Rapport d'expertise collective. 242 pages. <https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2020SA0020Ra-b.pdf>
- Aouad M, Petit-Demoulière N, Goumon Y, Poisbeau P, 2014. Etifoxine stimulates allopregnanolone synthesis in the spinal cord to produce analgesia in experimental mononeuropathy. *Eur J Pain* 18(2): 258-68. doi: 10.1002/j.1532-2149.2013.00367.x.
- Arnich N, Abadie E, Amzil Z, Dechraoui Bottein MY, Comte K, Chaix E, Delcourt N, Hort V, Mattei C, Molgó J, Le Garrec R, 2021. Guidance Level for Brevetoxins in French Shellfish. *Mar Drugs* 19(9): 520. doi: 10.3390/md19090520
- Beignon F, Gueguen N, Tricoire-Leignel H, Mattei C, Lenaers G, 2022. The multiple facets of mitochondrial regulations controlling cellular thermogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 79(10): 525. doi: 10.1007/s00018-022-04523-8
- Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R, 2007. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev*. 87(4): 1215-1284. doi: 10.1152/physrev.00017.2006
- Benson JM, Gomez AP, Statom GL, Tibbetts BM, Fleming LE, Backer LC, Reich A, Baden DG, 2006. Placental transport of brevetoxin-3 in CD-1 mice. *Toxicon*. 48(8):1018-26. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.08.008.
- Bharathraj MY, Venugopal K, Jaligheid K, Karibasappa H, Kumar H, 2015. Fipronil Compound Consumption Presenting as Status Epilepticus. *Toxicol Int*. 22(1): 165-166. doi: 10.4103/0971-6580.172280
- Bonmatin JM, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreuzweiser DP, Krupke C, Liess M, Long E, Marzaro M, Mitchell EA, Noome DA, Simon-Delso N, Tapparo A, 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res Int*. 22(1): 35-67. doi: 10.1007/s11356-014-3332-7
- Bosson C, Rendu J, Pelletier L, Abriat A, Chatagnon A, Brocard J, Brocard J, Figarella-Branger D, Ducreux S, van Coppenolle F, Sagui E, Marty I, Roux-Buisson N, Faure J, 2020. Variations in the TRPV1 gene are associated to exertional heat stroke. *J Sci Med Sport* 23(11): 1021-1027. doi: 10.1016/j.jsams.2020.04.018.
- Bouchama A, Abuyassin B, Lehe C, Laitano O, Jay O, O'Connor FG, Leon LR, 2022. Classic and exertional heatstroke. *Nat Rev Dis Primers* 8(1): 8. doi: 10.1038/s41572-021-00334-6
- Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D, 2013. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* 504(7478) :113-118. doi: 10.1038/nature12823.

- Casida JE, Durkin KA, 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu Rev Entomol.* 58:99-117. doi: 10.1146/annurev-ento-120811-153645
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D, 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389(6653): 816-24. doi: 10.1038/39807
- Chaban VV, Cho T, Reid CB, Norris KC, 2013. Physically disconnected non-diffusible cell-to-cell communication between neuroblastoma SH-SY5Y and DRG primary sensory neurons. *Am J Transl Res.* 5(1): 69-79
- Changeux JP, 2020. Discovery of the First Neurotransmitter Receptor: The Acetylcholine Nicotinic Receptor. *Biomolécules* 10(4): 547. doi: 10.3390/biom10040547
- Charon S, Taly A, Rodrigo J, Perret P, Goeldner M, 2011. Binding modes of noncompetitive GABA-channel blockers revisited using engineered affinity-labeling reactions combined with new docking studies. *J Agric Food Chem.* 59(7): 2803-2807. doi: 10.1021/jf102468n
- Chinain M, Gatti CMI, Darius HT, Quod JP, Tester PA, 2021. Ciguatera poisonings: A global review of occurrences and trends. *Harmful Algae* 102: 101873. doi: 10.1016/j.hal.2020.101873
- Chrétien D, Bénit P, Ha HH, Keipert S, El-Khoury R, Chang YT, Jastroch M, Jacobs HT, Rustin P, Rak M, 2018. Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 °C. *PLoS Biol.* 16(1): e2003992. doi: 10.1371/journal.pbio.2003992
- Cole LM, Nicholson RA, Casida JE, 1993. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pestic. Biochem. Physiol.* 46 : 47-54. doi: 10.1006/pest.1993.1035
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y, 2005. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438(7070): 1017-1021. doi: 10.1038/nature04223
- Costa V, Nistri A, Cavalli A, Carloni P, 2003. A structural model of agonist binding to the  $\alpha 3\beta 4$  neuronal nicotinic receptor. *Br J Pharmacol.* 140(5): 921-931. doi: 10.1038/sj.bjp.0705498
- Daly JW, 2005. Nicotinic agonists, antagonists, and modulators from natural sources. *Cell Mol Neurobiol.* 25(3-4): 513-552. doi: 10.1007/s10571-005-3968-4
- De Nardi F, Lefort C, Bréard D, Richomme P, Legros C, Guérineau NC, 2017. Monitoring the Secretory Behavior of the Rat Adrenal Medulla by High-Performance Liquid Chromatography-Based Catecholamine Assay from Slice Supernatants. *Front Endocrinol.* 8: 248. doi: 10.3389/fendo.2017.00248
- Duron-Martinaud S, Verret C, Haus-Cheymol R, Bedubourg G, Mayet A, Dia A, Thiolet C, Bourdon L, Sagui E, Meynard JB, Migliani R, 2012. Coups de chaleur d'exercice dans les armées. Résultats de la surveillance épidémiologique. Année 2005-2011. Rapport n° 539/CESPA du 23 novembre 2012
- Farrant M, Nusser Z, 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA<sub>A</sub> receptors. *Nat Rev Neurosci.* 6(3): 215-29. doi: 10.1038/nrn162

- Free RB, Bryant DL, McKay SB, Kaser DJ, McKay DB, 2002. [<sup>3</sup>H]Epibatidine binding to bovine adrenal medulla: evidence for alpha3beta4\* nicotinic receptors. *Neurosci Lett.* 318(2): 98-102. doi: 10.1016/s0304-3940(01)02489-2
- Friedman MA, Fernandez M, Backer LC, Dickey RW, Bernstein J, Schrank K, Kibler S, Stephan W, Gribble MO, Bienfang P, Bowen RE, Degrasse S, Flores Quintana HA, Loeffler CR, Weisman R, Blythe D, Berdalet E, Ayyar R, Clarkson-Townsend D, Swajian K, Benner R, Brewer T, Fleming LE, 2017. An Updated Review of Ciguatera Fish Poisoning: Clinical, Epidemiological, Environmental, and Public Health Management. *Mar Drugs* 15(3): 72. doi: 10.3390/md15030072.
- Gibbons D, Morrissey C, Mineau P, 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22(1): 103-118. doi: 10.1007/s11356-014-3180-5
- Giorgi C, Marchi S, Pinton P, 2018. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 19(11): 713-730. doi: 10.1038/s41580-018-0052-8
- Godinho AF, de Oliveira Souza AC, Carvalho CC, Horta DF, De Fraia D, Anselmo F, Chaguri JL, Faria CA, 2016. Memory impairment due to fipronil pesticide exposure occurs at the GABA<sub>A</sub> receptor level, in rats. *Physiol Behav.* 165: 28-34. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.06.035
- Griffin CE 3rd, Kaye AM, Bueno FR, Kaye AD (2013). Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *Ochsner J.* 13(2): 214-23
- Hamon A, Morel A, Hue B, Verleye M, Gillardin JM, 2003. The modulatory effects of the anxiolytic etifoxine on GABA(A) receptors are mediated by the beta subunit. *Neuropharmacology* 45(3): 293-303. doi: 10.1016/s0028-3908(03)00187-4
- He S, Zambelli VO, Sinharoy P, Brabenec L, Bian Y, Rwere F, Hell RC, Stein Neto B, Hung B, Yu X, Zhao M, Luo Z, Wu C, Xu L, Svensson KJ, McAllister SL, Stary CM, Wagner NM, Zhang Y, Gross ER, 2023. A human TRPV1 genetic variant within the channel gating domain regulates pain sensitivity in rodents. *J Clin Invest.* 133(3): e163735. doi: 10.1172/JCI163735
- Henderson R, 2013. Structural biology: Ion channel seen by electron microscopy. *Nature* 504(7478): 93-94. doi: 10.1038/504093a
- Ho TNT, Abraham N, Lewis RJ, 2020. Structure-Function of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Inhibitors Derived From Natural Toxins. *Front Neurosci.* 14: 609005. doi: 10.3389/fnins.2020.609005.
- Hodgkin AL, Huxley AF, 1952. Movement of sodium and potassium ions during nervous activity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 17: 43-52. doi: 10.1101/sqb.1952.017.01.007
- Hosie AM, Baylis HA, Buckingham SD, Sattelle DB, 1995. Actions of the insecticide fipronil, on dieldrin-sensitive and- resistant GABA receptors of *Drosophila melanogaster*. *Br J Pharmacol.* Jul;115(6):909-12. doi: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb15896.x
- Hosokawa Y, Stearns RL, Casa DJ. Is Heat Intolerance State or Trait? *Sports Med.* 2019 Mar;49(3):365-370. doi: 10.1007/s40279-019-01067-z
- Ikeda T, Zhao X, Nagata K, Kono Y, Shono T, Yeh JZ, Narahashi T, 2001. Fipronil modulation of gamma-aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 296(3): 914-21

- Imamura T, Yanagawa Y, Nishikawa K, Matsumoto N, Sakamoto T, 2010. Two cases of acute poisoning with acetamiprid in humans. *Clin Toxicol (Phila)* 48(8): 851-853. doi: 10.3109/15563650.2010.517207
- INSERM, 2021. Pesticides et santé – Nouvelles données. Collection expertise collective. Editions INSERM: 1036 pages. <https://www.inserm.fr/wp-content/uploads/2021-07/inserm-expertisecollective-pesticides2021-rapportcomplet-0.pdf>
- Kirkpatrick B, Fleming LE, Squicciarini D, Backer LC, Clark R, Abraham W, Benson J, Cheng YS, Johnson D, Pierce R, Zaias J, Bossart GD, Baden DG, 2004. Literature Review of Florida Red Tide: Implications for Human Health Effects. *Harmful Algae* 3(2): 99-115. doi: 10.1016/j.hal.2003.08.005
- Kaila K, Pasternack M, Saarikoski J, Voipio J, 1989. Influence of GABA-gated bicarbonate conductance on potential, current and intracellular chloride in crayfish muscle fibres. *J Physiol.* 416: 161-181. doi: 10.1113/jphysiol.1989.sp017755
- Katz B, Zaguri R, Edvardson S, Maayan C, Elpeleg O, Lev S, Davidson E, Peters M, Kfir-Erenfeld S, Berger E, Ghazalin S, Binshtok AM, Minke B, 2023. Nociception and pain in humans lacking a functional TRPV1 channel. *J Clin Invest.* 133(3): e153558. doi: 10.1172/JCI153558
- Key FM, Abdul-Aziz MA, Mundry R, Peter BM, Sekar A, D'Amato M, Dennis MY, Schmidt JM, Andrés AM, 2018. Human local adaptation of the TRPM8 cold receptor along a latitudinal cline. *PLoS Genet.* 14(5): e1007298. doi: 10.1371/journal.pgen.1007298
- Kullmann DM, Ruiz A, Rusakov DM, Scott R, Semyanov A, Walker MC. Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? *Prog Biophys Mol Biol.* 2005 Jan;87(1):33-46. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2004.06.003
- Lang H, Li Q, Yu H, Li P, Lu Z, Xiong S, Yang T, Zhao Y, Huang X, Gao P, Zhang H, Shang Q, Liu D, Zhu Z, 2015. Activation of TRPV1 attenuates high salt-induced cardiac hypertrophy through improvement of mitochondrial function. *Br J Pharmacol.* 172(23): 5548-5558. doi: 10.1111/bph.12987
- Laurie DJ, Seeburg PH, Wisden W, 1992. The distribution of 13 GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J Neurosci.* 12(3): 1063-1076. doi: 10.1523/JNEUROSCI.12-03-01063.1992
- Le Monde, 2013. Abeilles : trois pesticides interdits dans l'Union européenne. 29.04.2013
- Le Monde, 2016. Les députés votent une interdiction des pesticides tueurs d'abeilles. 18.03.2016
- Le Monde, 2024. Risques de canicule lors des JO 2024 : « Les athlètes qui ne se préparent pas ont plus de coups de chaleurs et de problèmes médicaux ». 28.03.2024
- Macherel D, Haraux F, Guillou H, Bourgeois O, 2021. The conundrum of hot mitochondria. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 1862(2): 148348. doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148348
- Mattei C, Legros C, 2014. The voltage-gated sodium channel: a major target of marine neurotoxins. *Toxicon* 91: 84-95. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.09.016
- Mattei C, Wen PJ, Nguyen-Huu TD, Alvarez M, Benoit E, Bourdelais AJ, Lewis RJ, Baden DG, Molgó J, Meunier FA, 2008. Brevenal inhibits pacific ciguatoxin-1B-induced neurosecretion from bovine chromaffin cells. *PLoS One* 3(10): e3448. doi: 10.1371/journal.pone

- Mattei C, Vetter I, Eisenblätter A, Krock B, Ebbecke M, Desel H, Zimmermann K, 2014. Ciguatera fish poisoning: a first epidemic in Germany highlights an increasing risk for European countries. *Toxicon* 91: 76-83. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.10.016
- Mattei C, Taly A, Soualah Z, Saulais O, Henrion D, Guérineau NC, Verleye M, Legros C, 2019. Involvement of the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$  subunit in the mode of action of etifoxine. *Pharmacol Res.* 145:104250. doi: 10.1016/j.phrs.2019.04.034
- McCann CM, Bracamontes J, Steinbach JH, Sanes JR, 2006. The cholinergic antagonist alpha-bungarotoxin also binds and blocks a subset of GABA receptors. *Proc Natl Acad Sci.* 103(13): 5149-5154. doi: 10.1073/pnas.0600847103
- McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR, Whiting PJ, 2000. Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA<sub>A</sub> receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci.* 3(6): 587-592. doi: 10.1038/75761
- Miyake T, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S, 2015. Activation of mitochondrial transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to microglial migration. *Glia* 63(10): 1870-1882. doi: 10.1002/glia.22854
- Mohamed F, Senarathna L, Percy A, Abeyewardene M, Eaglesham G, Cheng R, Azher S, Hittarage A, Dissanayake W, Sheriff MH, Davies W, Buckley NA, Eddleston M, 2004. Acute human self-poisoning with the N-phenylpyrazole insecticide fipronil--a GABA<sub>A</sub>-gated chloride channel blocker. *J Toxicol Clin Toxicol.* 42(7): 955-963. doi: 10.1081/clt-200041784
- Moreira-González AR, Comas-González A, Valle-Pombrol A, Seisdedo-Losa M, Hernández-Leyva O, Fernandes LF, Chomérat N, Bilien G, Hervé F, Rovillon GA, Hess P, Alonso-Hernández CM, Mafra LL Jr, 2021. Summer bloom of *Vulcanodinium rugosum* in Cienfuegos Bay (Cuba) associated to dermatitis in swimmers. *Sci Total Environ.* 757: 143782. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143782.
- Munday R, Selwood AI, Rhodes L, 2012. Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice. *Toxicon* 60(6): 995-9. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.07.002
- Nguyen N, Fakra E, Pradel V, Jouve E, Alquier C, Le Guern ME, Micallef J, Blin O, 2006. Efficacy of etifoxine compared to lorazepam monotherapy in the treatment of patients with adjustment disorders with anxiety: a double-blind controlled study in general practice. *Hum Psychopharmacol* 21 (3): 139-49. doi: 10.1002/hup.757.
- Nguyen-Huu TD, Mattei C, Wen PJ, Bourdelais AJ, Lewis RJ, Benoit E, Baden DG, Molgó J, Meunier FA, 2010. Ciguatoxin-induced catecholamine secretion in bovine chromaffin cells: mechanism of action and reversible inhibition by brevenal. *Toxicon* 56(5):7 92-6. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.08.002
- Nusser Z, Sieghart W, Somogyi P. Segregation of different GABA<sub>A</sub> receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci.* 1998 Mar 1;18(5):1693-703. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-05-01693
- Olsen RW, Sieghart W. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology.* 2009 Jan;56(1):141-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.045.

- Otero P, Pérez S, Alfonso A, Vale C, Rodríguez P, Gouveia NN, Gouveia N, Delgado J, Vale P, Hiram M, Ishihara Y, Molgó J, Botana LM, 2010. First toxin profile of ciguateric fish in Madeira Arquipelago (Europe). *Anal Chem* 82(14): 6032-9. doi: 10.1021/ac100516q
- Otto M, Bucher C, Liu W, Müller M, Schmidt T, Kardell M, Driessen MN, Rossaint J, Gross ER, Wagner NM, 2020. 12(S)-HETE mediates diabetes-induced endothelial dysfunction by activating intracellular endothelial cell TRPV1. *J Clin Invest.* 130(9):4999-5010. doi: 10.1172/JCI136621
- Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, Kreuzweiser DP, Krupke C, Liess M, McField M, Morrissey CA, Noome DA, Settele J, Simon-Delso N, Stark JD, Van der Sluijs JP, Van Dyck H, Wiemers M, 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22(1): 68-102. doi: 10.1007/s11356-014-3471-x
- Potera C, 2007. Marine biology. Florida red tide brews up drug lead for cystic fibrosis. *Science* 316(5831): 1561-1562. doi: 10.1126/science.316.5831.1561
- Ratra GS, Casida JE, 2001. GABA receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity. *Toxicol Lett.* 122(3): 215-222. doi: 10.1016/s0378-4274(01)00366-6
- Ratra GS, Kamita SG, Casida JE. Role of human GABA<sub>A</sub> receptor  $\beta$ 3 subunit in insecticide toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001 May 1;172(3):233-40. doi: 10.1006/taap.2001.9154
- Riccio A, Mattei C, Kelsell RE, Medhurst AD, Calver AR, Randall AD, Davis JB, Benham CD, Pangalos MN, 2002. Cloning and functional expression of human short TRP7, a candidate protein for store-operated Ca<sup>2+</sup> influx. *J Biol Chem.* 277(14): 12302-12309. doi: 10.1074/jbc.M112313200
- Rolfe DF, Brown GC, 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.* 77(3): 731-758. doi: 10.1152/physrev.1997.77.3.731
- Rosso JP, Schwarz JR, Diaz-Bustamante M, Céard B, Gutiérrez JM, Kneussel M, Pongs O, Bosmans F, Bougis PE, 2015. MmTX1 and MmTX2 from coral snake venom potently modulate GABA<sub>A</sub> receptor activity. *Proc Natl Acad Sci.* 112(8): E891-900. doi: 10.1073/pnas.1415488112
- Roux-Buisson N, Monnier N, Sagui E, Abriat A, Brosset C, Bendahan D, Kozak-Ribbens G, Gazzola S, Quesada JL, Foutrier-Morello C, Rendu J, Figarella-Branger D, Cozonne P, Aubert M, Bourdon L, Lunardi J, Fauré J, 2016. Identification of variants of the ryanodine receptor type 1 in patients with exertional heat stroke and positive response to the malignant hyperthermia in vitro contracture test. *Br J Anaesth* 116(4): 566-568. doi: 10.1093/bja/aew047
- Rudolph U, Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Jul 29;10(9):685-97. doi: 10.1038/nrd3502.
- Schlichter R, Rybalchenko V, Poisbeau P, Verleye M, Gillardin J, 2000. Modulation of GABAergic synaptic transmission by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine. *Neuropharmacology* 39(9): 1523-1535. doi: 10.1016/s0028-3908(99)00253-1.
- Sigel E, Steinmann ME, 2012. Structure, function, and modulation of GABA<sub>A</sub> receptors. *J. Biol. Chem.* 287, 40224–40231. doi: 10.1074/jbc.R112.386664
- Simon-O'Brien E, Gauthier D, Riban V, Verleye M, 2016. Etifoxine improves sensorimotor deficits and reduces glial activation, neuronal degeneration, and neuroinflammation in a rat model of traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 13(1): 203. doi: 10.1186/s12974-016-0687-3

- Skinner MP, Brewer TD, Johnstone R, Fleming LE, Lewis RJ, 2011. Ciguatera fish poisoning in the Pacific Islands (1998 to 2008). *PLoS Negl Trop Dis.* 5(12): e1416. doi: 10.1371/journal.pntd.0001416
- Sosa S, Pelin M, Cavion F, Hervé F, Hess P, Tubaro A, 2020. Acute Oral Toxicity of Pinnatoxin G in Mice. *Toxins* 12(2): 87. doi: 10.3390/toxins12020087
- Stearns RL, Hosokawa Y, Adams WM, Belval LN, Huggins RA, Jardine JF, Katch RK, Davis RJ, Casa DJ, 2020. Incidence of Recurrent Exertional Heat Stroke in a Warm-Weather Road Race. *Medicina (Kaunas)* 56(12): 720. doi: 10.3390/medicina56120720
- Stein DJ, 2015. Etifoxine versus alprazolam for the treatment of adjustment disorder with anxiety: a randomized controlled trial. *Adv Ther.* 32(1): 57-68. doi: 10.1007/s12325-015-0176-6
- Suzuki J, Kanemaru K, Iino M, 2016. Genetically Encoded Fluorescent Indicators for Organellar Calcium Imaging. *Biophys J.* 111(6): 1119-1131. doi: 10.1016/j.bpj.2016.04.054
- Szegedi V, Bárdos G, Détári L, Tóth A, Banczerowski-Pelyhe I, Világi I, 2005. Transient alterations in neuronal and behavioral activity following bensultap and fipronil treatment in rats. *Toxicology* 214(1-2): 67-76. doi: 10.1016/j.tox.2005.05.023
- Tingle CC, Rother JA, Dewhurst CF, Lauer S, King WJ, 2003. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev Environ Contam Toxicol.* 176: 1-66. doi: 10.1007/978-1-4899-7283-5\_1
- Tomizawa M, Casida JE, 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45: 247-268. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930
- Twyman RE, Rogers CJ, Macdonald RL, 1989. Differential regulation of gamma-aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenobarbital. *Ann Neurol.* 25(3): 213-220. doi: 10.1002/ana.410250302
- Vanden Abeele F, Lotteau S, Ducreux S, Dubois C, Monnier N, Hanna A, Gkika D, Romestaing C, Noyer L, Flourakis M, Tessier N, Al-Mawla R, Chouabe C, Lefai E, Lunardi J, Hamilton S, Fauré J, Van Coppenolle F, Prevarskaya N, 2019. TRPV1 variants impair intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling and may confer susceptibility to malignant hyperthermia. *Genet Med.* 21(2): 441-450. doi: 10.1038/s41436-018-0066-9
- Verleye M, Heulard I, Nuss P, Gillardin JM, 2003. Effects of stress and etifoxine on pentobarbital-induced loss of righting reflex in Balb/cByJ and C57BL/6J mice. *Neurosci Lett.* 353(2): 127-130. doi: 10.1016/j.neulet.2003.09.010
- Vinkers CH, Olivier B, 2012. Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABA<sub>A</sub> Receptor Modulators? *Adv Pharmacol Sci.* 2012:416864. doi: 10.1155/2012/416864
- Wang J, Lindstrom J, 2018. Orthosteric and allosteric potentiation of heteromeric neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Br J Pharmacol.* 175(11): 1805-1821. doi: 10.1111/bph.13745
- Watkins SM, Reich A, Fleming LE, Hammond R, 2008. Neurotoxic shellfish poisoning. *Mar Drugs* 6(3): 431-55. doi: 10.3390/md20080021
- Weber LV, Al-Refae K, Wölk G, Bonatz G, Altmüller J, Becker C, Gisselmann G, Hatt H (2016). Expression and functionality of TRPV1 in breast cancer cells. *Breast Cancer* 8: 243-252. doi: 10.2147/BCTT.S121610

Whiting PJ, 2003. GABA<sub>A</sub> receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov Today*. 8(10): 445-450. doi: 10.1016/s1359-6446(03)02703-x

Wisden W, Laurie DJ, Monyer H, Seeburg PH, 1992. The distribution of 13 GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci*. 12(3): 1040-1062. doi: 10.1523/JNEUROSCI.12-03-01040.1992

Xu S, Cheng X, Wu L, Zheng J, Wang X, Wu J, Yu H, Bao J, Zhang L, 2020. Capsaicin induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in anaplastic thyroid carcinoma cells via TRPV1-mediated mitochondrial calcium overload. *Cell Signal*. 75: 109733. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109733

Zhao X, Yeh JZ, Salgado VL, Narahashi T, 2004. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 310(1): 192-201. doi: 10.1124/jpet.104.065516