

Mode d'action des neurotoxines botuliques et tétanique

Mode of action of botulinum and tetanus neurotoxins

Par Michel-Robert POPOFF⁽¹⁾
(mémoire présenté le 22 avril 2004)

RÉSUMÉ

Clostridium botulinum et *Clostridium tetani* synthétisent les neurotoxines botuliques (A à G) et la neurotoxine tétanique, qui sont à l'origine du botulisme et du tétanos, respectivement. Ces affections nerveuses, paralysies flasques pour le botulisme et paralysie spastique pour le tétanos, sont graves et souvent mortelles. Les neurotoxines botuliques et tétanique bloquent la libération de neuromédiateur. Alors que les neurotoxines botuliques inhibent la libération d'acétylcholine au niveau des jonctions neuromusculaires, la toxine tétanique agit sur les interneurons inhibiteurs du système nerveux central. Ce sont des métalloprotéases qui clivent une des trois protéines des complexes SNAREs ayant un rôle clé dans le processus de neuroexocytose. Si les neurotoxines clostridiennes sont de puissants poisons, elles sont aussi des agents thérapeutiques, notamment les neurotoxines botuliques qui sont largement utilisées dans le traitement des dystonies.

Mots-clés : *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, botulisme, tétanos, neurotoxine botulique, neurotoxine tétanique.

SUMMARY

Clostridium botulinum and *Clostridium tetani* synthesize botulinum neurotoxins (A to G) and the tetanus toxin, which are responsible for botulism and tetanus, respectively. These toxins cause nervous disorders, either a flaccid paralysis (botulism) or a spastic paralysis (tetanus), which are severe and often lethal. Botulinum and tetanus neurotoxins prevent the release of neurotransmitters. Botulinum neurotoxins inhibit the release of acetylcholine at the neuromuscular junction, whereas tetanus toxin acts on the inhibitory interneurons in the central nervous system. They are metalloproteases, which cleave one of the three proteins in the SNARE complex, which plays a key role in neuroexocytosis. Although neurotoxins are potent poisons, they also are sometimes used as therapeutic agents; for instance, botulinum neurotoxins are largely used in the treatment of dystonia.

Key words: *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, botulism, tetanus, botulinum neurotoxin, tetanus neurotoxins.

(1) Unité des Bactéries anaérobies et Toxines, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux ; 75724 Paris cedex 15.

• INTRODUCTION

Le botulisme et le tétanos sont deux affections sévères à symptomatologie nerveuse, communes à l'homme et aux animaux, qui sont dues à des toxines produites par des *Clostridium*, *Clostridium botulinum* et *Clostridium tetani* respectivement.

Le botulisme est le plus souvent d'origine alimentaire et se traduit par des paralysies flasques. Les intoxications alimentaires sont connues depuis l'Antiquité, et le terme botulisme a pour origine le mot latin *botulus*, désignant une saucisse. Le plus ancien document à ce sujet est un texte indien du xv-xvi^e siècle qui relate la préparation d'un toxique, probablement de la toxine botulique, à partir de contenu intestinal de mouton. Les premiers cas de botulisme semblent avoir été identifiés par des médecins allemands en 1735. Mais la première description détaillée des symptômes du botulisme a été rapportée par l'Allemand Kerner en 1755 et 1789. Le nombre de cas s'accroît à la fin du xviii^e-début du xix^e siècle, essentiellement à la suite de consommation de saucisses. Entre 1820 et 1822, Kerner rapporte 150 cas dont 80 mortels. Les recherches s'orientent vers la présence de toxiques pouvant se former dans les saucisses ou apportés par les épices et les condiments. Dès 1833, il est noté que l'intoxication par les saucisses en Allemagne est similaire à celle causée par des poissons fumés dans certaines régions de la Russie. Puis, de nombreux cas d'intoxications par des poissons ont été signalés, notamment en Allemagne. La nature bactérienne de cette affection ainsi que la toxine botulique ont été identifiées à la fin du xix^e siècle. Van Ermengem isola pour la première fois en 1897 une bactérie anaérobie toxigène d'un jambon, et de l'intestin et la rate d'une des trois victimes d'un groupe de 30 musiciens qui avaient été contaminés (WEINBERG, NATIVELLE et PREVOT, 1937 ; NIEMANN, 1991 ; BIGALKE et SHOER, 2000).

Le tétanos est aussi une affection nerveuse, mais qui se caractérise par une paralysie spastique, c'est-à-dire des contractions des muscles squelettiques. Sa dénomination provient du mot grec *τετανος* qui signifie rigidité ou tension. Cette maladie caractéristique sur le plan clinique a été rapportée dès les premiers écrits de médecine. Ainsi, Hippocrate, médecin grec de l'Antiquité (environ 470-360 avant J.-C., île de Kos) décrit un syndrome d'hypercontraction généralisée chez un marin. Le commandant d'un navire développa une suppuration à un doigt après s'être blessé en manipulant l'ancre. Puis il manifesta des troubles de la langue et il se plaignit qu'il ne pouvait plus parler correctement. Sa mâchoire se bloqua, sa nuque devint raide. Il présenta un opisthotonos et il mourut 7 jours après l'apparition des symptômes. Aretaios, médecin grec de Cappadoce (iii^e siècle avant J.-C.), relate cette maladie en des termes plus durs. « Une calamité inhumaine ! Une vision inconvenante ! Un spectacle même pénible pour l'observateur ! Une maladie incurable ! Avec ceux qui sont surpassés par la maladie, le médecin peut seulement sympathiser. Il n'a pas de moyens de préserver la vie du

malade, de corriger les luxations. Pour redresser le corps du malade, il faudrait qu'il le dissèque ou qu'il le brise. C'est un grand désarroi pour le médecin » (NIEMANN, 1991). Cette maladie était l'épouvante des blessés. Elle était considérée comme redoutable, terrifiante et entraînant la mort dans des souffrances épouvantables.

Au xix^e siècle, l'anatomiste anglais, Sir Charles Bell fit une description détaillée du tétanos qui sévit chez des soldats blessés lors de la bataille de La Corogne (1809) entre Anglais et troupes napoléoniennes. Il dressa un portrait célèbre d'un soldat atteint de tétanos avec opisthotonos. Carle et Rattone montrèrent en 1884 que le tétanos, probablement d'origine nerveuse, était une maladie transmissible due à une bactérie, en inoculant à des lapins des échantillons de suppurations provenant de plaies de malades. Nicolaier, à Göttingen, découvrit que l'inoculation d'échantillons de sols à des souris, cobayes et lapins pouvait causer des symptômes de tétanos chez ces espèces animales. Il observa dans le pus au point d'inoculation des animaux qui avaient développé des signes cliniques de tétanos, la présence de bacilles longs et minces (bacille de Nicolaier) à côté de cocci et autres microorganismes. Les cultures non-pures qu'il a obtenues étaient capables de reproduire la maladie. Il suggéra que ces microorganismes du sol se développaient dans les blessures et produisaient un poison responsable du tétanos comparable à la strychnine. Rosenbach et Flugge en 1886 retrouvèrent le même bacille dans la plaie d'un homme mort de tétanos et notèrent des formes sporulées ressemblant à des épingles à grosses têtes ou à des baguettes de tambour. Kitassato à Berlin isola pour la première fois en 1889 une culture pure de *Clostridium tetani* à partir d'une plaie de malade. Les filtrats de culture inoculés à l'animal induisaient des signes de tétanos. Berhing et Kitassato montrèrent que les lapins pouvaient être immunisés à l'aide de toxine modifiée par du trichlorure d'iode et que le sérum de ces animaux était neutralisant. Ils purent prévenir l'apparition de la maladie et même la guérir expérimentalement chez des animaux de laboratoire. Ils notèrent que « le sérum n'est efficace que si le traitement est appliqué dès l'apparition des premiers symptômes ». En 1894, Bazy appliqua, le premier, le sérum anti-tétanique dans la prévention du tétanos chez l'homme (PREVOT, TURPIN et KAISER, 1967 ; HATHEWAY, 1989). La vaccination à l'aide de toxine modifiée fut étudiée par plusieurs auteurs tels que Lowenstein en 1909, Vallée et Bazy en 1917. Mais ce sont Ramon et Zoeller, à l'origine de l'anatoxine diphtérique, qui mirent au point de 1924 à 1926 la préparation d'anatoxine tétanique par le formol et la chaleur et appliquèrent la vaccination anti-tétanique à l'homme. Les premières purifications de la toxine tétanique ont été obtenues par Pillmer et ses collaborateurs (1946, 1948), qui lui attribuèrent un poids moléculaire de 66 000 à 74 000. Les travaux sur la purification de la toxine tétanique et sa constitution en sous-unités furent poursuivis par différents auteurs notamment par Raynaud, Bizzini, Matsuda, Craven et Dawson (1951-1973) et plus récem-

ment par MATSUDA (1989). En 1957, Brooks et ses collaborateurs injectèrent de la toxine tétanique par voie intrathécale et suggérèrent qu'elle induisait une baisse de la neurotransmission au niveau des synapses inhibitrices de la moelle épinière. Van HEYNINGEN montra en 1959-1961 que la toxine tétanique reconnaissait des récepteurs de nature gangliosidique sur le tissu nerveux (Van HEYNINGEN, 1961). La séquence du gène de la toxine tétanique et sa localisation plasmidique furent obtenues par EISEL *et al.* (1986) et FAIRWEATHER et LYNESS (1986). Son activité enzymatique et sa cible intraneuronale furent mises en évidence par SCHIAVO *et al.* (1992a, 1992b). La structure de la partie C-terminale de la toxine tétanique fut acquise par UMLAND *et al.* (1997). Finalement, la séquence complète du génome de *C. tetani* fut dévoilée récemment par BRÜGGEMANN *et al.* (2003).

• LES AGENTS DU BOTULISME ET DU TÉTANOS

Les *Clostridium* sont des bacilles Gram positifs, sporulés et anaérobies stricts. Ces bactéries sont très communes dans l'environnement où elles participent à la dégradation de la matière organique, comme la décomposition des cadavres et de végétaux. Grâce à leurs spores, qui constituent une forme de résistance (résistance à la chaleur, sécheresse, radiations, exposition à l'oxygène, à de nombreux agents dénaturants...), ces bactéries peuvent survivre dans des conditions hostiles pendant de longues périodes. Ce sont des bactéries fermentaires qui sécrètent de nombreuses enzymes hydrolytiques permettant la dégradation de nombreux substrats. Parmi plus de 150 espèces de *Clostridium* décrites, une quinzaine d'espèces produisent de puissantes toxines, c'est-à-dire des poisons, qui sont responsables de pathologies graves chez l'homme et les animaux. Les *Clostridium* produisant des toxines paralysantes de type flasque ont été dénommés *C. botulinum*, et ceux synthétisant une toxine contracturante, *C. tetani*.

Clostridium botulinum

Les neurotoxines botuliques désignées A, B, C1, D, E, F et G selon leurs propriétés antigéniques sont produites par diverses espèces de *Clostridium*. Les bactéries appartenant à ce genre sont des bacilles anaérobies stricts et sporulés. L'espèce *Clostridium botulinum* désignait initialement les bactéries productrices d'une toxine induisant une paralysie flasque chez les animaux de laboratoire. Cette espèce est très hétérogène et est divisée en quatre groupes sur la base des propriétés physiologiques, biochimiques et génétiques. En fait, ces quatre groupes correspondent à quatre espèces distinctes sur un plan taxonomique. D'ailleurs, le groupe IV est considéré comme une espèce à part entière, *Clostridium argentinense*. Il faut noter que chacun des quatre groupes contient des souches non toxigènes indifférenciables des souches toxigènes d'après leurs caractères bactériologiques :

- groupe I: *C. botulinum* A et souches protéolytiques de *C. botulinum* B et F ;

- groupe II: *C. botulinum* E et souches glucidolytiques de *C. botulinum* B et F ;
- groupe III: *C. botulinum* C et D ;
- groupe IV: *C. botulinum* G ou *C. argentinense* .

Mais des souches appartenant à d'autres espèces de *Clostridium* sont également capables de produire une toxine botulique. C'est le cas de certaines souches de *Clostridium butyricum* qui synthétisent une neurotoxine botulique E et de certaines souches de *Clostridium baratii* qui produisent une neurotoxine F. Ces souches neurotoxigènes sont phénotypiquement et génétiquement apparentées aux souches types de *C. butyricum* et *C. baratii* respectivement et non à celles de *C. botulinum*.

Clostridium tetani

C. tetani est un bacille dont la largeur est de 0,3 à 0,6 mm et la longueur de 3 à 12 mm. La longueur peut varier considérablement selon le stade de la culture, phase de croissance ou phase stationnaire. *C. tetani* est Gram positif en phase exponentielle de croissance, mais cette coloration est facilement perdue dans les cultures plus tardives de 24 heures ou plus. Les bacilles sont généralement très mobiles grâce à une ciliature péritriche. De ce fait, les colonies sont plates et ont tendance à envahir l'ensemble de la surface gélosée. Cependant certaines souches sont immobiles et non-flagellées.

La forme sporulée est très caractéristique. Une extrémité du bacille est très élargie du fait de la présence d'une spore ronde de grande taille qui déborde largement le diamètre de la bactérie et qui a une position terminale. Ainsi, *C. tetani* est souvent comparé à une baguette de tambour. Le taux de sporulation varie selon les souches. A pH 7 ou alcalin et à une température voisine de 37°C, la sporulation débute après 24 h de culture et se prolonge pendant 4 à 12 jours ou plus, mais elle n'intervient pas à des températures élevées (autour de 41°C).

• HABITAT DE *CLOSTRIDIUM BOTULINIUM* ET *CLOSTRIDIUM TETANI*

Clostridium botulinum

L'habitat principal des *Clostridium* neurotoxigènes, comme des autres espèces de *Clostridium*, est l'environnement. Grâce à leurs spores qui sont résistantes aux conditions extrêmes (chaleur, sécheresse, radiation, oxygène, agents chimiques), ces bactéries sont capables de survivre pendant de très longues périodes. Ainsi, les *Clostridium* sont ubiquistes et largement distribués dans l'environnement. Cependant, la germination des spores et la division bactérienne n'ont lieu qu'en conditions anaérobies et en présence suffisante de nutriments. Ceci restreint l'habitat des *Clostridium* à des zones anaérobies ou à faibles tensions en oxygène et contenant des quantités suffisantes de matières organiques.

Les différents groupes de *C. botulinum* n'ont pas une répartition géographique identique. L'habitat principal de *C. botulinum* A, B, E, F et G est le sol, les sédiments marins et ceux d'eau douce. Les toxinotypes A et B sont retrouvés plus volontiers dans les échantillons de sol, mais avec des localisations géographiques différentes. *C. botulinum* A est prédominant dans la partie Ouest des États-Unis, en Amérique du Sud et en Chine, tandis que *C. botulinum* B est plus fréquent dans la partie Est des États-Unis et en Europe. *C. botulinum* E qui a la particularité de se multiplier à basse température (2-3°C) est préférentiellement retrouvé dans les sédiments marins et ceux d'eau douce, ainsi que dans le contenu intestinal des poissons des régions nord de l'hémisphère Nord (Alaska, Canada, Scandinavie, régions Nord de l'Europe, de l'Asie et du Japon). *C. botulinum* C et D dont la température optimum de croissance se situe entre 30 et 40°C et qui sont exigeants en matière organique, sont localisés essentiellement dans des zones riches en matière organique des pays chauds (régions tropicales, régions tempérées en saison chaude). Les cadavres d'animaux morts de botulisme ou porteurs de *C. botulinum* dans leur tube digestif, sont les principaux réservoirs de ces micro-organismes (POPOFF, 1995; POPOFF et MARVAUD, 1999).

C. butyricum et *C. baratii* sont des bactéries largement répandues dans l'environnement (sol, sédiments, surface de végétaux, végétaux en décomposition, contenu intestinal de l'homme et des animaux sains). La distribution des souches neurotoxigènes de ces espèces est mal connue. Quelques cas de botulisme chez des enfants dus à *C. butyricum* E ont été décrits en Italie (région de Rome) (AURELI *et al.*, 1986 ; FENICIA *et al.*, 1999). Cette affection est plus fréquente dans certaines régions de Chine, principalement à la suite de consommation de préparations fermentées à base de soja (MENG *et al.*, 1997).

Clostridium tetani

C. tetani est une bactérie ubiquitaire qui est communément rencontrée dans le sol à travers le monde entier. La fréquence de son isolement dans des échantillons de sol varie selon les différentes enquêtes. Des études au Japon, Canada, Brésil et États-Unis font état de 30 à 42 % d'échantillons positifs (SMITH et WILLIAMS, 1984). La présence de *C. tetani* dans le sol est fonction de différents facteurs environnementaux. Certaines régions sont considérées comme plus tétanigènes que d'autres, notamment les zones calcaires avec un pH légèrement alcalin, alors que les sols volcaniques ou granitiques avec un pH acide sont peu favorables à la croissance de *C. tetani*. La présence de matière organique est également un facteur favorable. Un pH neutre ou alcalin accompagné d'une température supérieure à 20°C et d'une humidité d'au moins 15 % permet la germination des spores et la multiplication bactérienne. Ces conditions augmentent l'apparition et la sévérité des cas de tétanos des hommes et des animaux vivant dans ces régions (PREVOT, TURPIN et KAISER, 1967 ; BYTCHENKO, 1981).

La distribution géographique de *C. tetani* montre une plus forte prévalence dans les régions du Sud que dans celles du Nord. L'incidence du tétanos est plus élevée dans les pays chauds (Afrique centrale et de l'Ouest, Sud-Est asiatique, Inde, îles du Pacifique, Sud des États-Unis) que dans le Nord (Canada, Norvège, Angleterre, Finlande, Suède...) (SMITH, 1975). Cette bactérie peut être rencontrée dans le contenu intestinal des animaux, mais elle ne représente pas un constituant habituel de la flore normale. Elle a aussi été isolée de selles chez l'homme, cependant des études plus récentes n'y ont pas détecté sa présence (GEORGE et FINEGOLD, 1985). Les surfaces et objets contaminés par des matières fécales, les poussières peuvent contenir *C. tetani*. Sa présence a été mise en évidence dans l'environnement hospitalier: poussières et échantillons d'air de salles d'opération, surfaces de la peau chez l'homme, blessures, catgut, coton... (BYTCHENKO, 1981). Dans une autre enquête, *C. tetani* a été retrouvé plutôt dans des échantillons de terre provenant des berges de mares et de rivières ou de champs, que dans d'autres lieux tels que les sols d'hôpitaux, écoles, maisons d'habitation, indiquant une plus forte prévalence de cette bactérie en milieu rural. Dans un tiers des cas environ, la quantité minimale de terre ayant permis l'isolement de *C. tetani* était inférieure à 1 mg. Ceci rend compte qu'une faible quantité de terre contaminée dans une blessure est capable d'être à l'origine d'un tétanos (EBISAWA et KURATA, 1985).

• STRUCTURE DES NEUROTOXINES BOTULIQUES ET TÉTANIQUE

Les neurotoxines botuliques et tétanique sont synthétisées sous forme d'une seule chaîne protéique de 150 kDa environ qui est peu ou non toxique. Ces protéines ne possèdent pas de séquence signal et leur sécrétion intervient par un processus encore mal défini d'exfoliation des parois bactériennes ou par lyse de ces parois. L'activation des neurotoxines fait intervenir une protéolyse qui clive la protéine précurseur dans son tiers N-terminal en deux fragments dénommés chaîne légère (environ 50 kDa) et chaîne lourde (environ 100 kDa). Les deux chaînes restent réunies par un pont disulfure. Les souches protéolytiques de *C. botulinum* sécrètent une protéase capable d'activer les neurotoxines à l'extérieur de la bactérie. Certaines souches sont non-protéolytiques. L'activation peut avoir lieu également par des protéases d'origine digestive. La trypsine, par exemple, permet d'activer efficacement les neurotoxines botuliques et tétanique.

Les neurotoxines botuliques sont associées à d'autres protéines non toxiques pour former des complexes de grande taille. Ces protéines comprennent une protéine appelée non toxique non hémagglutinine (NTNH) qui a une taille proche de celle des neurotoxines (139 kDa) et des protéines qui ont une activité hémagglutinante (HA) dont les tailles sont de 34, 17 et 70 kDa chez *C. botulinum* A. La neurotoxine s'associe à NTNH pour former des complexes de taille moyenne (300 kDa) (M) et leur asso-

ciation aux HA est à l'origine de complexes de grande taille (500 kDa) (L). Des complexes de très grande taille (900 kDa) (LL), observés notamment chez *C. botulinum* A, résultent d'une dimérisation des complexes L. Les séquences en acides aminés des protéines NTNH sont très conservées (70-80 % d'identité) et présentent peu d'homologie avec celles des neurotoxines botuliques (31-39 % d'identité). Toutefois, les 100 premiers acides aminés des protéines NTNH sont les plus apparentés aux acides aminés correspondants des neurotoxines botuliques, ce qui pourrait rendre compte de la liaison NTNH-neurotoxine. Le rôle des complexes est encore mal compris. Ils pourraient protéger les neurotoxines botuliques vis-à-vis des conditions dénaturantes, telles qu'acidité de l'estomac et protéases digestives. Il est à noter que la toxine tétanique ne s'associe pas à d'autres protéines pour former des complexes et qu'elle n'est pas stable dans le tractus digestif. Les protéines non toxiques pourraient intervenir dans le passage de la barrière intestinale.

Les gènes des neurotoxines clostridiennes et des protéines des complexes botuliques ont été caractérisés (revue dans POPOFF et MARVAUD, 1999). Ils sont à proximité l'un de l'autre dans une même région d'ADN dénommée locus botulique. Ils sont organisés en deux opérons, l'un comprenant les gènes codant pour NTNH et la neurotoxine, l'autre les gènes des composants hémagglutinines. Un gène régulateur positif (*botR*) de l'expression de ces gènes a une position variable chez *C. botulinum*. Il est situé soit en partie 5' du locus botulique chez *C. botulinum* C et D, soit entre les deux opérons chez *C. botulinum* A, B, E et F. C'est le seul gène du complexe botulique qui est conservé chez *C. tetani*. Le gène *tetR*, homologue de *botR*, est localisé en amont du gène de la neurotoxine tétanique. Les gènes des protéines non toxiques des complexes botuliques sont absents chez *C. tetani*. Les gènes des neurotoxines et des protéines non toxiques associées aux neurotoxines botuliques ont des localisations diverses: chromosomique chez *C. botulinum* A, B, E et F, plasmidique chez *C. botulinum* G et *C. tetani* et phagique chez *C. botulinum* C et D. De plus, il semble que les loci botuliques soient situés sur des éléments génétiques mobiles tels que des transposons. Ceci rendrait compte de la mobilité des gènes des neurotoxines entre les diverses structures d'ADN et les échanges entre souches. Ainsi, dans chaque type de *C. botulinum* et chez *C. tetani*, il existe des souches variantes qui ont perdu leur toxinogénèse et qui peuvent redevenir toxiques par acquisition des gènes des neurotoxines au moyen de transfert de phage, de plasmide ou de transposon par conjugaison. Certaines souches possèdent plusieurs gènes de neurotoxines ou produisent des toxines hybrides : des toxines mosaïques entre les types C et D ont été décrites. Par ailleurs, certaines souches d'espèces de *Clostridium* habituellement non toxigènes sont productrices de neurotoxines botuliques et sont responsables de botulisme chez l'homme. C'est le cas de souches de *Clostridium butyricum* qui produisent une neurotoxine botulique de type E et de souches de *Clostridium baratii*

qui synthétisent une neurotoxine de type F.

La longueur des séquences des neurotoxines botuliques et tétanique varie de 1251 à 1315 acides aminés. La plus longue séquence est celle de la neurotoxine tétanique. Les homologues sont comprises entre 34 à 97 % d'identité. La neurotoxine botulique B est celle qui est la plus apparentée à la neurotoxine tétanique (42 % d'identité). L'analyse génétique a révélé une grande diversité parmi les neurotoxines botuliques (au moins 11 variants), plus importante que les 7 toxinotypes classiques, alors qu'un seul type de neurotoxine tétanique est connu. Les régions les plus conservées concernent les 100 premiers acides aminés et la région centrale de la chaîne légère, ainsi que la moitié N-terminale de la chaîne lourde. La région centrale des chaînes légères contient un motif (HExxH) caractéristique des métalloprotéases dépendantes du zinc. L'identification de ce motif chez la neurotoxine tétanique qui fut la première à être séquencée, fournit la première indication que les neurotoxines clostridiennes sont des métalloprotéases. Il fut ensuite démontré que chaque chaîne légère lie un atome de zinc et que les agents chélateurs du zinc inhibent l'activité des neurotoxines. La moitié N-terminale de la chaîne lourde est impliquée dans la translocation de la chaîne légère dans le cytosol. Le degré élevé de conservation de ce domaine suppose que toutes les neurotoxines suivent un même processus d'entrée dans les neurones. Par contre, chaque neurotoxine reconnaît un récepteur distinct sur la membrane des neurones. Le faible niveau d'identité de la moitié C-terminale des chaînes lourdes qui est impliquée dans la liaison au récepteur reflète cette divergence (SCHIAVO, MATTEOLI et MONTECUCCO, 2000).

Les structures tridimensionnelles des neurotoxines botuliques A et B ainsi que de la partie C-terminale de la toxine tétanique ont été déterminées. Cette structure révèle trois domaines distincts de 50 kDa environ qui sont en accord avec les trois domaines fonctionnels définis auparavant par des méthodes biochimiques et physiologiques: la chaîne légère qui comporte le site enzymatique, la moitié N-terminale de la chaîne lourde qui correspond au domaine de translocation et sa moitié C-terminale qui est le domaine interagissant avec le récepteur à la surface des neurones.

Les structures du domaine C-terminal des chaînes lourdes des neurotoxines tétanique et botulique A sont très similaires. Il est divisé en deux sous-domaines formés de feuillets bêta. L'un en C-terminal est homologue à d'autres protéines ou domaines ayant des fonctions de liaison à un récepteur. Il serait impliqué dans la reconnaissance d'une glycoprotéine, alors que celui en amont, relativement bien conservé parmi toutes les neurotoxines, reconnaît un ganglioside. Le domaine N-terminal de la chaîne lourde de la neurotoxine botulique A a une forme cylindrique et contient deux hélices alpha inhabituellement longues qui entourent la chaîne légère et plusieurs courtes hélices alpha. Cette structure ressemble à celle de protéines virales qui changent de conformation à pH acide. La chaîne légère possède des hélices alpha et des feuillets bêta. Elle est peu appa-

rentée à d'autres enzymes de structure connue, à l'exception du motif liant le zinc. La coordination du zinc par les deux histidines (H) du motif HExxH, la Tyr-365 et une molécule d'eau liée à l'acide glutamique (E) du motif présentent certaines homologues avec l'organisation du site enzymatique de la thermolysine, autre métalloprotéase bactérienne. Cependant, l'architecture du site enzymatique de la neurotoxine botulique est différente de celle de la thermolysine. Le site actif est masqué par les hélices du domaine N-terminal de la chaîne lourde. De ce fait, la neurotoxine entière est dépourvue d'activité enzymatique, celle-ci est exercée par la chaîne légère dissociée de la chaîne lourde.

• **MODES D'ACTION**

Le mode d'action moléculaire des neurotoxines clostridiennes qui ont pour effet le blocage de la libération des neuromédiateurs par les neurones affectés, fait intervenir quatre étapes: liaison à un récepteur sur la terminaison amyélinique de l' axone des neurones, internalisation, translocation à travers la membrane des vésicules d'endocytose et modification enzymatique d'une cible intracellulaire (revues dans HERREROS *et al.*, 1999; HUMEAU *et al.*, 2000; SCHIAVO *et al.*, 2000; POPOFF et CARLIER, 2001; MEUNIER *et al.*, 2002a; MEUNIER, SCHIAVO et MOLGO, 2002b; LALLI *et al.*, 2003).

Liaison au récepteur

Les toxines botuliques transitent par le tube digestif, traversent la barrière intestinale par un mécanisme encore mal compris, puis diffusent par le sang et/ou la lymphe jusqu'aux motoneurones où elles se fixent sur les extrémités non myélinisées de leur axone (figure 1). La neurotoxine tétanique produite localement dans la plaie d'inoculation se lie également aux motoneurones, mais aussi aux fibres sensitives et noradrénergiques. La nature du récepteur des neurotoxines est encore controversée. De nombreux travaux ont montré que les neurotoxines se lient à des gangliosides tels que G_{D1B}, G_{T1B} et G_{Q1B}. Cependant, cette interaction est de faible affinité et ne rend pas compte de la spécificité de reconnaissance de chaque neurotoxine. Un modèle de double récepteur comprenant une glycoprotéine et un ganglioside a été proposé à partir d'études de liaison des neurotoxines sur cultures cellulaires et d'après la structure du domaine de liaison au récepteur en deux sous-domaines. Ceci est conforté par le fait que la neurotoxine botulique B se fixe avec une forte affinité à la synaptotagmine II des membranes des vésicules synaptiques en présence de gangliosides. D'autres isoformes de synaptotagmine seraient également les récepteurs des neurotoxines botuliques A et E. Celui de la neurotoxine tétanique n'a pas encore été identifié. Sa partie protéique correspondrait à une protéine membranaire de 15 kDa qui aurait un rôle déterminant dans le routage de la toxine (HERREROS *et al.*, 2000). Cette protéine qui serait apparentée à la protéine Thy1 est liée à un glycosylphosphatidylinositol et est localisée dans des microdomaines lipidiques à la surface des cellules neuronales. (HERREROS, NG et SCHIAVO, 2001 ; LALLI *et al.*, 2003).

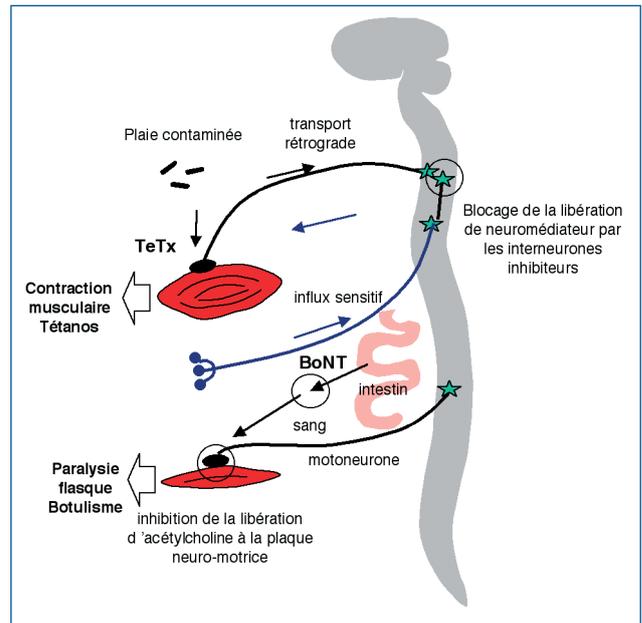


Figure 1 : Cheminement et sites d'action des neurotoxines botuliques et tétanique. La neurotoxine botulique (BoNT) transite par le tube digestif, traverse la muqueuse intestinale et est véhiculée par le sang ou la lymphe jusqu'aux extrémités axonales amyéliniques des motoneurones, où elle est internalisée. La toxine botulique bloque la libération d'acétylcholine aux jonctions neuromusculaires et induit de ce fait une paralysie flasque. La toxine tétanique migre par voie retroaxonale jusqu'aux centres nerveux. La toxine tétanique (TeTx) inhibe la libération de neuromédiateurs (glycine, acide gamma aminobutyrique) par les interneurons inhibiteurs. Par suite de l'absence de rétrocontrôle négatif des circuits réflexes, tout stimulus induit chez un sujet tétanisé des réponses motrices exacerbées, d'où des contractions musculaires généralisées à la phase d'état.

Internalisation

Les neurotoxines clostridiales ne traversent pas directement la membrane cytoplasmique. Elles sont internalisées par endocytose dans des compartiments intracellulaires acides. Il a été supposé que la neurotoxine tétanique serait internalisée dans des vésicules synaptiques, au cours du recyclage exocytose/endocytose. La majorité des vésicules synaptiques, après leur phase d'exocytose libérant le neuromédiateur dans la fente synaptique, est recyclée par endocytose et rechargée en neuromédiateur. Ceci est en accord avec l'observation que la stimulation nerveuse facilite l'intoxication. Mais ces résultats sont actuellement controversés, en effet la toxine tétanique est capable d'entrer dans des neurones affectés par la toxine botulique A, c'est-à-dire quand l'exocytose est bloquée (HERREROS *et al.*, 1999). L'identité des vésicules permettant l'entrée des neurotoxines botuliques n'est pas encore connue. Il est probable que les neurotoxines botuliques et tétanique entrent dans des vésicules différentes. Une grande différence entre les deux sortes de neurotoxines est que les neurotoxines botuliques restent à l'extrémité présynaptique des motoneurones, alors que les vésicules contenant la neurotoxine tétanique suivent un transport rétrograde le long de l'axone jusqu'aux corps cellulaires des motoneurones dans la moelle épinière.

Translocation dans le cytosol

Quelles que soient les vésicules d'endocytose contenant les neurotoxines, la chaîne légère doit traverser la membrane vésiculaire pour se localiser dans le cytosol où elle exerce son activité. L'acidification des vésicules par l'ATPase vésiculaire est une étape indispensable pour la translocation. La baisse de pH induit un changement de conformation d'une forme hydrophile à pH neutre en une forme dont les segments hydrophobes sont exposés en surface à pH acide permettant l'insertion de l'ensemble de la neurotoxine dans la bicouche lipidique. L'acidification induit l'oligomérisation des chaînes lourdes de neurotoxine en tétramères qui s'insèrent dans la bicouche lipidique et forment des canaux ioniques. Ces tétramères résultent de l'association d'hélices amphiphiles localisées dans le domaine N-terminal des chaînes lourdes.

Le mécanisme de translocation est encore hypothétique. Selon un premier modèle, la chaîne légère, dépliée à pH acide, passerait à travers le canal formé par les chaînes lourdes oligomérisées. L'exposition au pH neutre dans le cytosol permettrait le repliement de la chaîne légère et sa dissociation de la vésicule par réduction du pont disulfure entre les deux chaînes de neurotoxine. Cependant, les valeurs expérimentales de la taille des pores sont incompatibles avec le passage d'une molécule de la taille de la chaîne légère. Les canaux formés par les chaînes lourdes pourraient altérer le gradient électrochimique et induire une lyse osmotique permettant la traversée de la neurotoxine à travers la membrane de la vésicule d'endocytose. Mais ce phénomène de lyse cellulaire n'a pas été observé expérimentalement. Un troisième modèle est celui du sillon. Les chaînes lourdes insérées dans la membrane formeraient un sillon hydrophile. La chaîne légère, partiellement dépliée, s'engagerait dans ce sillon, sa partie hydrophile du côté des chaînes lourdes et sa partie hydrophobe faisant face aux lipides membranaires.

Rappels sur la libération de neuromédiateur

Avant de détailler le mode d'action des neurotoxines clostridiennes, envisageons la libération des neuromédiateurs par les neurones dans les conditions physiologiques. La plupart des neurones communiquent entre eux par libération de messagers chimiques ou neuromédiateurs. Il en est de même dans les interactions entre motoneurones et cellules musculaires.

Dans les terminaisons nerveuses, le neuromédiateur (acétylcholine pour les motoneurones, glycine et acide gamma-aminobutyrique pour les interneurones inhibiteurs) s'accumule dans les vésicules synaptiques par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques et par un pH de gradient généré par la pompe à proton, l'ATPase vésiculaire. Le cycle des vésicules synaptiques comprend la mobilisation et l'amarrage à la membrane présynaptique (docking), puis une phase d'apprêtage (priming) permettant aux vésicules d'effectuer l'étape de fusion membranaire et d'exocytose du neuromédiateur en réponse à une entrée cellulaire d'ions calcium. Les vésicules synaptiques sont ensuite recyclées.

Les vésicules synaptiques sont liées aux filaments d'actine par l'intermédiaire de la synapsine et elles sont mobilisées vers la zone active de la membrane présynaptique. Cette étape de mobilisation est dépendante du cytosquelette et d'ATP. L'arrimage des vésicules synaptiques à la membrane présynaptique (docking) n'a pas lieu n'importe où mais à proximité des canaux calciques dans la zone active. De nombreuses protéines de grande taille s'assembleraient en un échafaudage permettant un amarrage fort des vésicules synaptiques, telles que aczonin (550 kDa), bassoon (550 kDa) et piccolo (MARTIN et KOWALCHYK, 1997; TOM DIECK *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1999). Trois protéines, dénommées protéines SNAREs qui comprennent la VAMP (vesicle associated membrane protein) ou synaptobrevine, la SNAP25 et la syntaxine, jouent un rôle majeur dans l'assemblage des vésicules synaptiques à la membrane présynaptique et dans la libération des neuromédiateurs.

VAMP est une protéine de 13 kDa qui est ancrée dans la membrane des vésicules synaptiques. Elle possède quatre domaines : un segment variable riche en proline correspondant aux 33 acides N-terminaux, suivi d'un segment conservé formant une structure enroulée, d'un domaine transmembranaire et d'une extrémité conservée intravésiculaire. Dix isoformes ont été identifiées à ce jour, et sont distribuées dans divers tissus, certaines étant plus spécifiques du tissu nerveux (VAMP1, VAMP2) et d'autres plus ubiquitaires (VAMP3 ou cellubrevine). Dans les vésicules synaptiques, VAMP est associée à d'autres protéines telles que la synaptophysine, l'ATPase vésiculaire, un accepteur pour la protéine Rab. VAMP2 interagit avec la protéine adaptatrice AP3 et aurait un rôle dans la formation du manteau des vésicules synaptiques.

SNAP25 est palmytoilée (modification lipidique) au niveau d'une cystéine localisée au milieu de la molécule permettant ainsi son insertion dans la membrane présynaptique. SNAP25 forme un complexe avec la synaptotagmine qui est une protéine Ca^{++} senseur et aurait un rôle important dans la neurotransmission dépendante du calcium. Les deux isoformes A et B de SNAP25 sont localisées dans les neurones.

La syntaxine (35 kDa) est localisée principalement dans la membrane présynaptique en association à différents types de canaux calciques. Le domaine N-terminal est constitué de trois longues hélices alpha qui sont impliquées dans des interactions protéine-protéine. Un domaine transmembranaire est situé en C-terminal. La famille des syntaxines regroupe au moins 20 isoformes localisées dans le tissu nerveux et aussi au niveau des granules chromaffines.

La syntaxine, SNAP25 et VAMP s'associent pour former un complexe (complexe SNARE) qui a un rôle essentiel dans la neuroexocytose. La structure de ce complexe a été récemment élucidée. Il est formé de quatre hélices alpha enroulées parallèlement les unes sur les autres et provenant de l'association de la majeure partie de domaines cytoplasmiques de VAMP, de la syntaxine et des segments N- et C- terminaux de SNAP25. Cette dernière protéine contribue à la formation de deux hélices alpha parallèles. Les protéines restent

associées aux membranes vésiculaire et présynaptique. Ces enroulements ont pour effet de rapprocher fortement les deux types de membrane, les complexes SNAREs étant dirigés parallèlement à la membrane. Le modèle SNARE propose que des protéines de la membrane vésiculaire (vSNAREs) s'associent à des protéines d'une membrane cible (tSNAREs) de façon à former un complexe permettant l'accrochage des deux types de membrane et ensuite leur fusion.

Les complexes SNAREs (coefficient de sédimentation 7 s) ainsi formés sont stables et ont la possibilité de recruter d'autres protéines cytosoliques pour former un complexe de plus grande taille (complexe 20 s). Les facteurs cytosoliques sont le N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) et les NSF attachment proteins (aSNAPs). NSF est une ATPase qui a été initialement identifiée comme une protéine essentielle dans le transport vésiculaire entre les différents compartiments de l'appareil de Golgi. En présence d'ATP, NSF catalyse la dissociation des complexes SNAREs en leurs monomères.

Le complexe SNARE 7s serait en partie présent sur les membranes des vésicules synaptiques (complexe cis non fonctionnel) et préviendrait l'interaction avec la membrane présynaptique. La liaison avec NSF et aSNAPs génère la formation du complexe 20s qui désassemble ce complexe par l'hydrolyse de l'ATP au moyen de NSF. Les protéines VAMP seraient alors disponibles pour former un complexe SNARE (complexe trans) avec les protéines de la membrane présynaptique (SNAP25 et syntaxine). Ce serait au cours de cette étape que les protéines SNAREs, sous forme monomérique, seraient sensibles au clivage par les neurotoxines tétanique et botulique. Le réassemblage des complexes SNAREs en complexe trans rapprocherait les vésicules synaptiques de la membrane présynaptique (docking) en les mettant sous tension, prêtes à fusionner (priming).

L'étape de priming fait également intervenir les PITPs (phosphatidylinositol transfer protein) qui recrutent le phosphatidylinositol-4-phosphate (PI(4)P) pour le présenter à la phosphatidylinositol kinase (PI(4)P5K) et générer ainsi du phosphatidylinositol biphosphate (PI(4,5)P₂). Ce dernier a un rôle essentiel dans les étapes de fusion membranaire. Les PITPs réguleraient également les interactions entre les protéines SNAREs (KLENCHIN et MARTIN, 2000). D'autres processus de phosphorylation ont été proposés dans l'étape ATP-dépendante du priming des vésicules synaptiques. En effet, les protéines synaptobrevine, SNAP25, syntaxine, synaptotagmine, Munc18 sont des substrats de kinases comme la protéine kinase II dépendante de la calmoduline, la protéine kinase A et la protéine kinase C. La signification de ces phosphorylations reste à préciser (KLENCHIN et MARTIN, 2000).

Munc18 (ou nSEC1) s'associe avec une forte affinité à la syntaxine. La liaison de la syntaxine à la synaptobrevine et SNAP25 fait intervenir le motif SNARE en C-terminal de la molécule, alors que la majeure partie cytoplasmique de la syntaxine est impliquée dans l'association avec Munc18.

Munc18 se lie à la syntaxine dans sa forme fermée et prévient son association avec la synaptobrevine et SNAP25, inversement lorsque la syntaxine (forme ouverte) est engagée dans le complexe SNARE, elle ne peut pas s'associer à Munc18 (DULUBOVA *et al.*, 1999; MISURA, SCHELLER et WEIS, 2000). En présence des vésicules synaptiques, l'action de Rab/Rab effecteur induirait un changement de conformation de Munc18 et dissocierait le complexe Munc18-syntaxine, favorisant ainsi la formation du complexe SNARE trans (VAMP, SNAP25 et syntaxine). De plus, l'analogue Munc13 qui interagit avec Munc18, pourrait convertir la forme fermée de la syntaxine liée à Munc18 en sa forme ouverte capable de former le SNARE complexe (KLENCHIN et MARTIN, 2000).

Un potentiel d'action se traduit par une entrée de Ca⁺⁺ par les canaux calciques de la zone active de la membrane présynaptique, qui déclenche la fusion membranaire entre vésicules synaptiques et membrane présynaptique et la libération de neurotransmetteur dans la fente synaptique dans un délai de 0.3 ms environ. La synaptotagmine I qui a la propriété de fixer le Ca⁺⁺ a un rôle essentiel dans l'étape de fusion. L'influx de Ca⁺⁺ pourrait induire un changement de liaison de la synaptotagmine au complexe SNARE, ou un changement de conformation de ces protéines. La liaison aux phospholipides et à la syntaxine, ainsi que la multimerisation de la synaptotagmine pourraient intervenir dans l'étape de fusion dépendante du Ca⁺⁺ (GEPPERT et SÜDHOF, 1998 ; LIN et SCHELLER, 2000). D'autres protéines pourraient avoir un rôle calcium senseur telles que DOC2 (double C2 domain), UNC13, les effecteurs de Rab3 Rabphilin et RIM (Rab interacting molecule), les annexines et CAPS (calcium dépendant activator protein for secretion) (LIN et SCHELLER, 2000). Rab3 régulerait l'étape de fusion en limitant le nombre de vésicules synaptiques capables de fusionner en réponse à un influx de Ca⁺⁺, de façon à obtenir un signal limité dans le temps et reproductible. La forme active de Rab3 (Rab3-GTP) s'associe aux vésicules synaptiques et recrute ses effecteurs Rabphiline et RIM. Rabphiline se lie à Rab3 sur toutes les vésicules synaptiques alors que RIM s'associe à Rab3 uniquement sur les vésicules arrimées à la membrane présynaptique. L'activité régulatrice de ces protéines reste à définir (GEPPERT et SÜDHOF, 1998).

L'étape de fusion membranaire permettant la formation d'un pore et la libération du neurotransmetteur est loin d'être comprise en détail. La GTPase ARF6 interviendrait en activant la phospholipase D qui hydrolyse la phosphatidylcholine en acide phosphatidique et choline. L'acide phosphatidique régule la PI4P5K qui synthétise le PIP₂. Celui-ci module l'activité des protéines liant l'actine en région corticale et est impliqué dans le réarrangement des fibres d'actine nécessaire pour l'exocytose. Par ailleurs, une élévation locale d'acide phosphatidique en présence de Ca⁺⁺ induit une courbure de la membrane lipidique et faciliterait la fusion entre membrane de la vésicule synaptique et plasmique et ainsi la formation de pore (KLENCHIN et MARTIN, 2000; VITALE *et al.*, 2001).

NSF et α SNAPS interviendraient à nouveau pour dissocier les complexes SNAREs, et recycler VAMP dans la membrane vésiculaire ainsi que SNAP25 et la syntaxine dans la membrane présynaptique. Cependant, une partie de SNAP25 et de la syntaxine resteraient dans la membrane vésiculaire sous forme de complexes cis non fonctionnels. Les vésicules synaptiques sont ensuite recyclées par endocytose et rechargées en neuromédiateur (LIN et SCHELLER, 2000; SCHIAVO *et al.*, 2000).

Inhibition de la neuroexocytose par les neurotoxines clostridiennes

Les neurotoxines clostridiennes sont des protéases d'une remarquable spécificité. Leur activité est supportée par la chaîne légère qui contient dans sa région centrale un motif conservé (HExxH) correspondant au site enzymatique. Les substrats des neurotoxines clostridiennes sont les protéines SNAREs.

La neurotoxine tétanique et les neurotoxines botuliques B, D, F et G clivent la protéine VAMP, les neurotoxines botuliques A et E clivent SNAP25 et la neurotoxine botulique C1 clive à la fois la syntaxine et SNAP25 (figure 2). Les sites de clivage sont différents pour chaque neurotoxine, sauf pour la neurotoxine tétanique et la neurotoxine botulique B. Ces deux neurotoxines ont le même substrat, la protéine VAMP, qu'elles coupent au même site, et pourtant elles causent des tableaux cliniques opposés à savoir le tétanos et le botulisme respectivement. Ceci souligne que les symptômes différents observés résultent du site de l'intoxication plutôt que du mécanisme moléculaire d'action des deux toxines.

Certaines sont clivables par les neurotoxines clostridiennes, d'autres sont résistantes (TI-VAMP) du fait de mutations dans le site de clivage et les sites de liaison aux neurotoxines (GALLI *et al.*, 1998). Ceci rend compte, du moins en partie, de la résistance ou de la sensibilité de certaines espèces animales au tétanos et au botulisme. Ainsi, l'isoforme 1 de VAMP du rat et du poulet n'est pas clivable par la neurotoxine tétanique ni par la neurotoxine botulique B, du fait d'une mutation (Gln-Val) au niveau du site de clivage. Or, le rat et le poulet présentent une résistance élevée à la neurotoxine tétanique par rapport à l'homme et à la souris chez lesquels VAMP1 est clivable. Certaines isoformes telle la syntaxine 3 ne sont pas clivées par la neurotoxine botulique C1 (GALLI *et al.*, 1998).

Les cibles (VAMP, SNAP25 et syntaxine) ne présentent pas de séquence conservée en acides aminés au niveau et dans la proche région des sites de clivage par les neurotoxines. De plus, des peptides synthétiques courts comprenant les sites de clivage ne sont pas protéolysés par les neurotoxines neuromusculaires. Des peptides longs (40 acides aminés et plus) sont seulement clivés. Ceci suggère que les neurotoxines reconnaissent principalement la structure tertiaire de leurs cibles. Un motif de neuf acides aminés adoptant une structure en hélice alpha avec trois résidus chargés négativement sur une face et trois résidus hydrophobes sur l'autre face est conservé parmi les trois cibles des neuro-

toxines. Ce motif, appelé motif SNARE, existe en deux copies chez VAMP (V1 et V2) et la syntaxine (X1 et X2), et en quatre copies chez SNAP25 (S1, S2, S3 et S4). Il a été montré expérimentalement que ce motif est impliqué dans la liaison avec les neurotoxines. Ainsi, les peptides synthétiques incluant le site de clivage et ces motifs sont efficacement protéolysés par les neurotoxines. De plus, la neurotoxine tétanique dont la cible est VAMP reconnaît le motif V1 et un motif chargé positivement (SCHIAVO *et al.*, 2000). Ces deux motifs sont situés de part et d'autre du site de clivage. La neurotoxine tétanique se comporterait comme une enzyme allostérique et serait activée par changement de conformation après liaison à ces deux motifs de VAMP (CORNILLE *et al.*, 1997). Les régions des neurotoxines tétanique et botuliques impliquées dans la liaison avec le substrat ne sont pas connues.

Il faut noter que les neurotoxines clivent leurs substrats quand ils sont sous forme monomérique et non quand ils sont associés dans le complexe SNARE. Lorsqu'une des trois protéines VAMP, SNAP25 ou la syntaxine est clivée par une neurotoxine clostridienne, elle peut former des complexes SNAREs, mais ceux-ci ne sont plus fonctionnels. La fusion des vésicules avec la membrane présynaptique n'intervient alors pas et il n'y a pas de libération de neuromédiateur.

• PARTICULARITÉS DU BLOCAGE DE LA NEUROEXOCYTOSE PAR DIFFÉRENTES NEUROTOXINES CLOSTRIDIENNES

Les neurotoxines botuliques et tétanique sont les toxines les plus puissantes connues. La dose mortelle de neurotoxine botulique A chez l'homme adulte est estimée à 0.1-1 microgramme par voie orale (SCHANTZ et JOHNSON, 1992) et celle de la neurotoxine tétanique à la suite de tétanos survenu après blessure, à 10 doses létales 100 souris (soit 250 pg +/-150) (RETHY et RETHY, 1997). Pourtant, leur activité enzymatique n'est pas très élevée. Le Km de la neurotoxine tétanique pour son substrat VAMP est d'environ 200 μ M. Or, environ six molécules de neurotoxine tétanique par μ m³ dans le neurone sont suffisantes pour provoquer un blocage total de la libération de neurotransmetteur en 2-3 h, alors que le nombre de molécules de VAMP est estimé à 20 000-50 000 par μ m³ (POULAIN *et al.*, 2000). En fait, VAMP, comme les autres partenaires SNAP25 et syntaxine, ne se dissocient du complexe SNARE qu'un court instant (1-5 s) lors de l'arrimage des vésicules sur la membrane présynaptique et ce n'est qu'au cours de cette phase qu'elles sont accessibles aux neurotoxines clostridiennes. Comme ces protéines sont recyclées, les neurotoxines clivent progressivement la totalité des molécules substrats. Mais, les signes cliniques apparaissent bien avant. Chez l'animal, une inhibition de libération d'acétylcholine de 20 % au niveau de la jonction neuromusculaire est suffisante pour empêcher la contraction musculaire. De plus, quand 10-15 % des fibres musculaires du diaphragme sont paralysées, des troubles respiratoires avec asphyxie surviennent (POULAIN *et al.*, 2000). Ceci rend compte de l'extrême potentialité des neurotoxines clostridiennes chez l'animal.

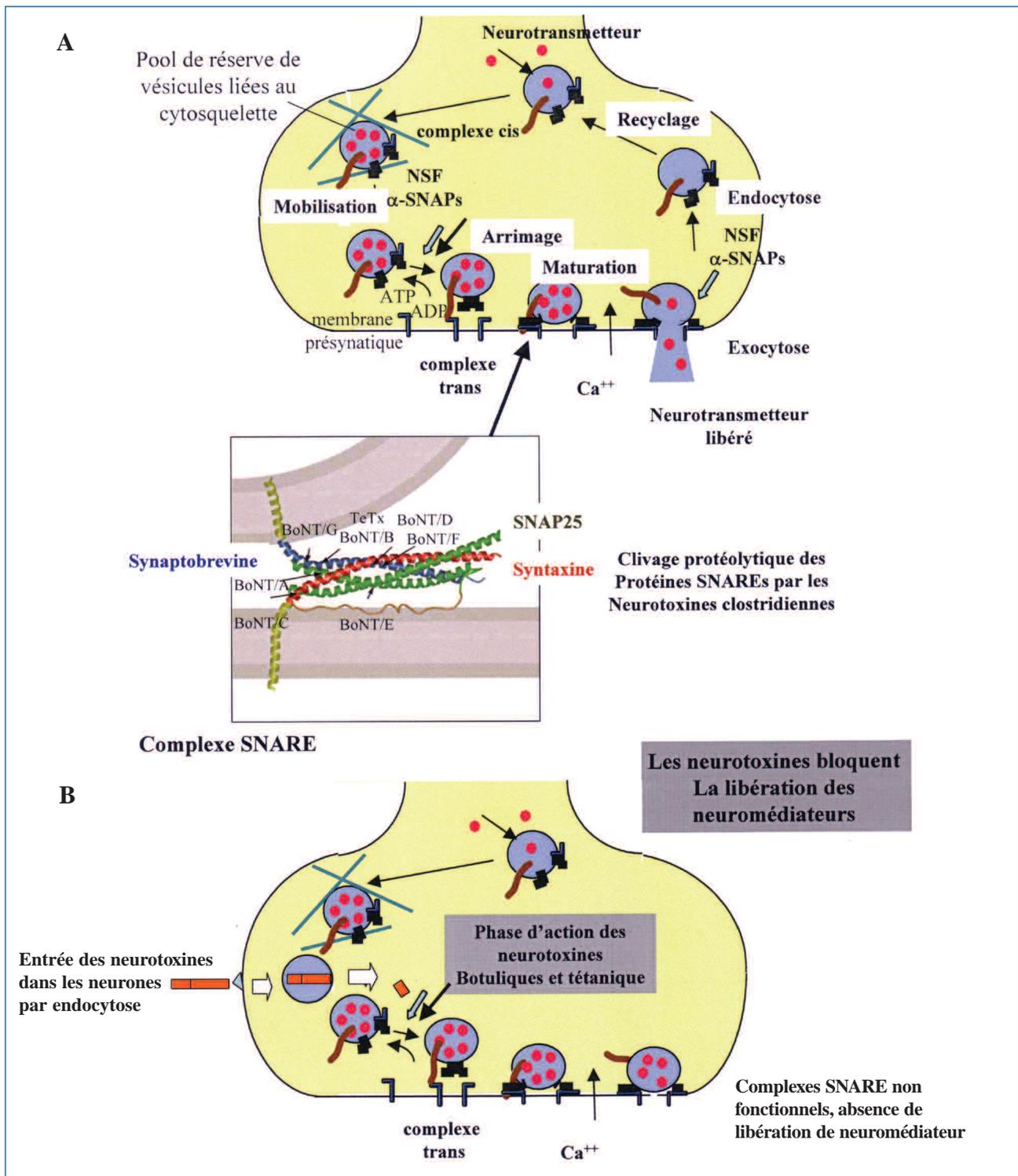


Figure 2 : Mécanisme moléculaire du blocage de la neuroexocytose par les neurotoxines botuliques et tétanique.
 Le neuromédiateur s'accumule dans des vésicules synaptiques. À partir d'un pool de réserve, où elles sont liées au cytosquelette d'actine, les vésicules synaptiques sont mobilisées pour s'arrimer près de la membrane présynaptique et acquérir la capacité de fusionner à la membrane (maturation). Une entrée de calcium généré par le potentiel d'action déclenche la fusion des vésicules avec la membrane présynaptique et la libération de neuromédiateur (A). Les neurotoxines botuliques et tétanique ont le même mode d'action au niveau de leur cellule neuronale cible. Après leur entrée dans la cellule neuronale par endocytose par l'intermédiaire de leur liaison à un récepteur, la chaîne légère est transloquée dans le cytosol (B). Les neurotoxines botuliques et tétanique clivent spécifiquement une des trois protéines du complexe SNARE qui ont un rôle déterminant dans le processus de fusion des vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique et donc dans la libération de neuromédiateur dans la fente synaptique (cartouche). BoNT, neurotoxine botulique, TeTx, neurotoxine tétanique ; SNARE, SNAP-receptor ; α -SNAP, soluble accessory-protein ; NSF, N-ethylmaleimide sensitive factor.

Les neurotoxines clostridiennes n'altèrent pas la structure des synapses. La seule modification morphologique consiste en une augmentation du nombre de vésicules synaptiques à proximité de la membrane présynaptique. D'un point de vue électrophysiologique, les neurotoxines clostridiennes bloquent la libération stimulée de neuromédiateur. Dans les conditions physiologiques, cette libération stimulée est synchrone, c'est-à-dire qu'un grand nombre de vésicules synaptiques libèrent leur contenu en neuromédiateur en même temps en réponse à une stimulation (entrée de Ca^{++} à l'extrémité nerveuse). Lors de l'intoxication par les neurotoxines botuliques A, E et C dont la cible est SNAP25, et aussi la syntaxine pour le type C, la libération d'acétylcholine reste synchrone. Mais, les neurotoxines botuliques B, D et F ainsi que la neurotoxine tétanique dont le substrat est VAMP, provoquent une désynchronisation importante (SCHIAVO *et al.*, 2000).

Les aminopyridines sont des agents bloquant les canaux potassiques. Elles provoquent indirectement une entrée de Ca^{++} et par conséquent augmentent la libération stimulée de neuromédiateur. Ces agents synchronisent et restaurent partiellement la neurotransmission des jonctions neuromusculaires intoxiquées par les neurotoxines botuliques A, E et C alors qu'ils sont inefficaces dans l'intoxication par les neurotoxines botuliques B, D et F ainsi que par la neurotoxine tétanique.

Les neurotoxines botuliques A et E clivent le même substrat SNAP25, mais à deux sites différents. La neurotoxine botulique A relargue 9 acides aminés C-terminaux, tandis que la neurotoxine botulique E excise un plus long peptide (25 résidus). Les effets cliniques causés par ces deux toxines sont différents. La neurotoxine botulique A induit une paralysie de longue durée (plusieurs mois) alors que l'intoxication par la neurotoxine botulique E est courte (quelques semaines) (ELEOPRA *et al.*, 1998). Ceci pourrait être dû à une plus longue persistance de la neurotoxine botulique A dans les jonctions neuromusculaires par rapport à la neurotoxine botulique E. Cependant, la durée de vie des deux toxines semble identique. Dans les cellules chromaffines, il a été montré que la neurotoxine botulique A peut persister au moins 21 jours alors que la persistance de la neurotoxine botulique B et de la neurotoxine tétanique est plus courte (O'SULLIVAN *et al.*, 1999). La différence de durée d'intoxication est fonction de la rapidité de remplacement de SNAP25 modifiée par les neurotoxines dans les jonctions neuromusculaires. SNAP25 tronquée par la neurotoxine botulique A persiste pendant une plus longue période, alors que SNAP25 clivée par le type E est remplacée rapidement par la forme native fonctionnelle. La modification par la neurotoxine botulique A altère peu SNAP25 qui n'est reconvenue que tardivement par le système de réparation de la cellule, mais cette altération est suffisante pour inhiber sa fonction. Au contraire, la protéolyse plus large par la neurotoxine botulique E induit une rapide néosynthèse de SNAP25 (ELEOPRA *et al.*, 1998; MOLGO *et al.*, 1999).

Au cours de l'intoxication par les neurotoxines botuliques, des bourgeons secondaires se développent aux extrémités nerveuses intoxiquées, au niveau des boutons synaptiques et des noeuds de Ranvier. Le muscle paralysé s'atrophie transitoirement et sécrète des facteurs trophiques comme l'insulin growth factor, qui sont probablement res-

pensables du bourgeonnement nerveux. Les bourgeons nerveux secondaires reforment des jonctions neuromusculaires fonctionnelles et le muscle récupère une activité normale. Ultérieurement, la jonction neuromusculaire initiale retrouve une morphologie et une activité normales, et les bourgeons secondaires dégénèrent (De PAIVA *et al.*, 1999; MEUNIER *et al.*, 2002b). Les cibles clivées par les neurotoxines sont resynthétisées. Ainsi, une intoxication botulique subaiguë s'accompagne de guérison. L'effet paralysant des toxines botuliques est variable selon le type de toxine. Par exemple, les toxines botuliques A et C induisent une paralysie prolongée, alors que les neurotoxines botuliques B, E et F ont un effet de courte durée. Ceci est dû à une persistance plus ou moins longue des neurotoxines dans les neurones. Le temps demi-vie du clivage des cibles et du blocage de la neuroexocytose dans un modèle de cellules nerveuses qui est équivalent à la durée de paralysie neuromusculaire chez la souris a été estimé supérieur à 31, supérieur à 25, à 10, 2 et 0.8 jours pour les toxines botuliques A, C1, B, F et E respectivement (KELLER *et al.*, 1999; ADLER *et al.*, 2001; FORAN *et al.*, 2003). La chaîne légère de la neurotoxine botulique A reste liée à la membrane dans les cellules neuronales grâce à un signal de rétention situé en début de séquence, alors que celle de la neurotoxine E est cytoplasmique. La neurotoxine botulique A éviterait ainsi la dégradation par la voie du protéasome (FERNANDEZ-SALAS *et al.*, 2004). La persistance (temps demi-vie) de la toxine tétanique dans des cultures de neurones de moelle épinière serait de l'ordre de 6 jours.

• APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES DES NEUROTOXINES CLOSTRIDIENNES

Si les neurotoxines clostridiennes sont des poisons très puissants, elles sont aussi des agents thérapeutiques largement utilisés. Du fait que les toxines botuliques sont des agents paralysants qui à faible dose agissent localement au muscle injecté sans diffuser vers les muscles voisins, elles sont utilisées dans le traitement de dystonies. Ces affections se traduisent par des contractions permanentes d'un ou de quelques muscles. L'injection de toxine botulique dans les muscles concernés supprime leur hyperactivité et assure au patient confort et récupération fonctionnelle. Depuis les travaux pionniers du Dr Scott dans le traitement du blépharospasme, les indications thérapeutiques se sont considérablement étendues : paralysie hémifaciale, torticolis spasmodique, crampe de l'écrivain, dystonie oro-mandibulaire et linguale, dysphonie spasmodique, spasticité des membres, spasticité chez les enfants avec paralysie cérébrale, tremblements, tics... (JANKOVIC et BRIN, 1997; JOHNSON, 1999). La neurotoxine botulique a également un effet vis-à-vis de certaines douleurs : douleur myofaciale, certaines formes de migraine et maux de tête. Des indications en dermatologie sont aussi concernées telle que rides profondes dues à des contractions permanentes des muscles peauciers. La neurotoxine botulique A qui a un effet prolongé (4-6 mois, voire plus) est la plus utilisée.

Du fait de ses propriétés à transiter jusqu'au système nerveux central, la toxine tétanique représente un outil de

choix pour véhiculer des agents thérapeutiques pour lutter contre certaines affections nerveuses. Jusqu'à présent, la toxine tétanique a été utilisée avec succès pour suivre le développement et l'organisation des neurones.

• CONCLUSION

Pourquoi des bactéries de l'environnement, comme *C. botulinum* et *C. tetani*, produisent-elles des toxines capables de reconnaître des récepteurs spécifiques des cellules neuronales des organismes supérieurs, d'emprunter une voie de trafic cellulaire propre aux facteurs de croissance et d'interagir avec des cibles spécifiques du système de neu-

roexocytose ? Cette question n'a reçu jusqu'alors aucune réponse satisfaisante, d'autant plus que la synthèse des neurotoxines n'est pas indispensable pour la croissance et la survie de *C. botulinum* ou *C. tetani*. Cependant, le botulisme et le tétanos restent des maladies redoutables, encore largement présentes, principalement le tétanos, dans certaines parties du globe malgré une prévention efficace et d'un coût abordable grâce à la vaccination. Si les neurotoxines botuliques et tétanique constituent une menace sévère, elles représentent des agents thérapeutiques très performants.

BIBLIOGRAPHIE

- ADLER M, KELLER JE, SHERIDAN RE, DESHPANDE SS (2001) Persistence of botulinum neurotoxin A demonstrated by sequential administration of serotypes A and E in rat EDL muscle. *Toxicon*, **39**, 233-243.
- AURELI P, FENICIA L, PASOLINI B, GIANFRANCESCO M, McCROSKEY LM, HATHEWAY CL (1986) Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy. *J. Infect. Dis.*, **154**, 207-211.
- BIGALKE H, SHOER LF (2000) Clostridial neurotoxins. In: AKTORIES K, JUST I, editors. *Bacterial Protein Toxins*, Berlin: Springer, 407-443.
- BRÜGGEMANN H, BÄUMER S, FRICKE WF, WIEZR A, LIESAGANG H, DECKER I, HERZBERG C, MARTINEZ-ARIAS R, HENNE A, GOTT-SCHALK G (2003) The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **100**, 1316-1321.
- BYTCHENKO B (1981) Microbiology of tetanus. In: VERONESI R, editors. *Tetanus: important new concepts*, Amsterdam: *Excerpta Medica*, 28-39.
- CORNILLE F, MARTIN L, LENOIR C, CUSSAC D, DOQUES BP, FOURNIEZALUSKI MC (1997). Cooperative exosite-dependent cleavage of synaptobrevin by tetanus toxin light chain. *J. Biol. Chem.*, **272**, 3459-3464.
- DE PAIVA A, MEUNIER F, MOLGO J, AOKI KR, DOLLY JO (1999) Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **96**, 3200-3205.
- DULUBOVA I, SUGITA S, HILL S, HOSAKA M, FERNANDEZ I, SÜDHOF TC, RIZO J (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J.*, **18**, 4372-4382.
- EBISAWA I, KURATA M (1985) A quantitative study of *C. tetani* in the earth. Seventh International Conference on Tetanus, Rome, Cangemi.
- EISEL U, JARAUSCH W, GORETZKI K, HENSCHEN A, ENGELS J, WELLER U, HUDEL M, HABERMANN E, NIEMANN H (1986) Tetanus toxin: primary structure, expression in *E. coli*, and homology with botulinum toxins. *EMBO J.*, **5**, 2495-2502.
- ELEOPRA R, TUGNOLI V, ROSETTO O, DE GRANDIS D, MONTECUCCO C (1998) Different time courses of recovery after poisoning with botulinum neurotoxin serotypes A and E in humans. *Neurosci. Lett.*, **256**, 135-138.
- FAIRWEATHER NF, LYNES VA (1986) The complete nucleotide sequence of tetanus toxin. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 7809-7812.
- FENICIA L, FRANCIOSA G, POURSHABAN M, AURELI P (1999) Intestinal toxemia botulism in two young people, caused by *Clostridium butyricum* Type E. *Clin. Infect. Dis.*, **29**, 381-387.
- FERNANDEZ-SALAS E, STEWARD LE, HO H, GARAY PE, SUN SW, GILMORE MA, ORDAS JV, WANG J, FRANCIS J, AOKI KR (2004) "Plasma membrane localization signals in the light chain of botulinum neurotoxin." *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **101**, 3208-3213.
- FORAN PG, MOHAMMED N, LISK GO, NAGWANNEY S, LAWRENCE GW, JOHNSON E, SMITH L, AOKI KR, DOLLY OJ (2003) Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinum neurotoxin B, C1, E and F compared with the long lasting type A. *J. Biol. Chem.*, **278**, 1363-1371.
- GALLI T, ZAHRAOUI A, VAIDYANATHAN VV, RAPOSO G, TIAN JM, KARIN M, NIEMANN H, LOUWARD D (1998) A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1437-1448.
- GEORGE WL, FINEGOLD SM (1985) Clostridia in the human gastrointestinal flora. In: BORRIELLO SP, editor. *Clostridia in Gastrointestinal Disease*, Boca Raton: CRC Press, 1-37.
- GEPPERT M, SÜDHOF TC (1998) Rab3 and synaptotagmin: the yin and yang of synaptic membrane fusion. *Annu. Rev. Neurosci.*, **21**, 75-95.
- HATHEWAY CL (1989) Bacterial sources of Clostridial neurotoxins. In: SIMPSON LL, editor. *Botulinum Neurotoxin and Tetanus toxin*, San Diego: Academic Press, 3-24.
- HERREROS J, LALLI G, MONTECUCCO C, SCHIAVO G (1999) Pathophysiological properties of clostridial neurotoxins. In: ALOUF JE, FREER JH, editors. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, London: Academic Press, 202-228.
- HERREROS J, LALLI G, MONTECUCCO C, SCHIAVO G (2000) Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons. *J. Neurosci.*, **20**, 1941-1950.
- HERREROS J, NG T, SCHIAVO G (2001) Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 2947-2960.
- HSU SC, HAZUKA CD, FOLETTI DL, SCHELLER RH (1999) Targeting vesicles to specific sites in the plasma membrane: the role of sec6/8 complex. *Trends Cell Biol.*, **9**, 150-153.

- HUMEAU Y, DOUSSAU F, GRANT NJ, POULAIN B (2000) How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie*, **82**, 427-446.
- JANKOVIC J, BRIN MF (1997) Botulinum toxin: historical perspective and potential new indications. *Muscle Nerve Suppl.*, **6**, S129-S145.
- JOHNSON EA (1999) Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits and nature's most toxic proteins. *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**, 551-575.
- KELLER JE, NEALE EA, OYLER G, ADLER M (1999) Persistence of botulinum neurotoxin action in cultured spinal cord cells. *FEBS Lett.*, **456**, 137-142.
- KLENCHIN VA, MARTIN TFJ (2000) Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie*, **82**, 399-407.
- LALLI G, BOHNERT S, DEINHARDT K, VERASTEGUI C, SCHIAVO G (2003) The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol.*, **11**, 431-437.
- LIN RC, SCHELLER RH (2000) Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**, 19-49.
- MARTIN TFJ, KOWALCHYK JA (1997) Docked vesicles undergo Ca⁺⁺-activated exocytosis in a cell free system. *J. Biol. Chem.*, **272**, 14447-14453.
- MATSUDA M (1989) The structure of Tetanus Toxin. In: SIMPSON LL, editor. *Botulinum neurotoxin and Tetanus Toxin*, San Diego: Academic Press, 69-92.
- MENG X, KARASAWA T, ZOU K, KUANG X, WANG X, LU C, WANG C, YAMAKAWA K, NAKAMURA S (1997) Characterization of a neurotoxic Clostridium butyricum strain isolated from the food implicated in an outbreak of foodborne type E botulism. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2160-2162.
- MEUNIER FA, HERREROS J, SCHIAVO G, POULAIN B, MOLGO J (2002a) Molecular mechanism of action of botulinum neurotoxins and the synaptic remodeling they induce in vivo at the skeletal neuromuscular junction. In: MAS-SARO J, editor. *Handbook of Neurotoxicology*, Totowa, NJ: Humana Press, 305-347.
- MEUNIER FA, SCHIAVO G, MOLGO J (2002b) Botulinum neurotoxins: from paralysis to recovery of functional neuromuscular transmission. *J. Physiol.*, **96**, 105-113.
- MISURA KM, SCHELLER RH, WEIS WI (2000) Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature*, **404**, 355-362.
- MOLGO J, MEUNIER F, FAILLE L, CIFUENTES-DIAZ C, COMELLA JX, POPOFF MR, POULAIN B (1999) Bourgeonnement des terminaisons nerveuses motrices déclenché par différents sérotypes de neurotoxines botuliques. In: CHRISTEN Y, NIEOUILLOU A, RASCOL O, éditeurs. *Les Amis du Clostridium*, Marseille : Solal, 77-91.
- NIEMANN H (1991) Molecular biology of Clostridial neurotoxins. In: ALOUF JE, FREER J, editors. *Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, New York: Academic Press, 299-344.
- O'SULLIVAN GA, MOHAMMED N, FORAN PG, LAWRENCE GW, DOLLY JO (1999) Rescue of exocytosis in botulinum toxin A-poisoned chromaffin cells by expression of cleavage-resistant SNAP-25. *J. Biol. Chem.*, **274**, 36897-36904.
- POPOFF MR (1995) Ecology of neurotoxic strains of Clostridia. In: MONTECUCCO C, editor. *Clostridial neurotoxins*, Heidelberg: Springer-Verlag, 1-29.
- POPOFF MR, CARLIER JP (2001) Botulisme, épidémiologie, approches thérapeutiques et préventives, utilisation thérapeutique des neurotoxines. *Antibiotiques*, **3**, 149-162.
- POPOFF MR, MARVAUD JC (1999) Structural and genomic features of clostridial neurotoxins. In: ALOUF JE, FREER JH, editors. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, London: Academic Press, 174-201.
- POULAIN B, HUMEAU Y, KOJIMA H, MOLGO J (2000) Les neurotoxines de Clostridium : des toxines agissent sur la transmission synaptique. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, Poulain et al. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, **15**, 81-89.
- PRÉVOT AR, TURPIN A, KAISER P (1967). *Les bactéries anaérobies*. Paris, Dunod.
- RETHY L, RETHY LA (1997) Human lethal dose of tetanus toxin. *Lancet*, **350**, 1518.
- SCHANTZ EJ, JOHNSON EA (1992) Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol. Rev.*, **56**, 80-99.
- SCHIAVO G, BENFENATI F, POULAIN B, ROSSETTO O, POLVERINO DE LAURETO P, DASGUPTA BR, MONTECUCCO C (1992a) Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature (London)*, **359**, 832-835.
- SCHIAVO G, MATTEOLI M, MONTECUCCO C (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.*, **80**, 717-766.
- SCHIAVO G, POULAIN B, ROSSETTO O, BENFENATI F, TAUC L, MONTECUCCO C (1992b) Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc. *EMBO J.*, **11**, 3577-3583.
- SMITH LD, WILLIAMS BL (1984) *The pathogenic anaerobic bacteria*. Springfield, Ill., Charles C. Thomas, Publisher.
- SMITH LDS (1975) Clostridium tetani. In: SMITH LDS, editor. *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*. Springfield III: Charles C. Thomas Publisher, 177-201.
- TOM DIECK S, SANMARTI-VILA L, LANGNAESE K, RICHTER K, KINDLER S (1998) Basson, a novel zinc-finger CAG/glutamine repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J. Cell Biol.*, **142**, 499-509.
- UMLAND TC, WINGERT LM, SWAMINATHAN S, FUREY WF, SCHMIDT JJ, SAX M (1997) The structure of the receptor binding fragment Hc of tetanus neurotoxin. *Nature Struct. Biol.*, **4**, 788-792.
- VAN HEYNINGEN WE (1961) The fixation of tetanus toxin by ganglioside. *J. Gen. Microbiol.*, **24**, 107-119.
- VITALE N, CAUMONT AS, CHASEROT-GOLAZ S, DU G, WU S, SCIORRA VA, MORRIS AJ, FROHMAN MA, BADER MF (2001) Phospholipase D1: a key factor for the exocytic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J.*, **20**, 2424-2434.
- WANG X, KIBSCHULL M, LAUE MM, LICHT B, PETRASCH-PARVEZ E, KILIMANN MW (1999) Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology with Rim and Bassoon and binds profilin. *J. Cell Biol.*, **147**, 151-162.
- WEINBERG M, NATIVELLE R, PRÉVOT AR (1937) *Les Microbes Anaérobies*. Paris, Masson et Cie.