



**HAL**  
open science

# Étude des effets modulateurs des plantes médicinales méditerranéennes sur les canaux calciques de type T et l'évaluation de leurs effets anticonvulsivants et antiépileptiques

Chaymae El Alaoui

## ► To cite this version:

Chaymae El Alaoui. Étude des effets modulateurs des plantes médicinales méditerranéennes sur les canaux calciques de type T et l'évaluation de leurs effets anticonvulsivants et antiépileptiques. Neurobiologie. Université Montpellier; Université Hassan II (Mohammedia, Maroc). Faculté des sciences et techniques, 2015. Français. NNT : 2015MONTT014 . tel-02004004

**HAL Id: tel-02004004**

**<https://theses.hal.science/tel-02004004>**

Submitted on 1 Feb 2019

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

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

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
**Docteur**

Délivré par **UFR MEDECINE**  
**UNIVERSITE DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences Chimiques  
et Biologiques pour la Santé

Et de l'unité de recherche Institut de Génomique  
fonctionnelle, CNRS UMR 5203, INSERM U1191, LabEx 'Ion  
Channel Science and Therapeutics'

Spécialité : Neurosciences

Présentée par **Chaymae EL ALAOUI**

**Étude des effets modulateurs des plantes  
médicinales méditerranéennes sur les  
canaux calciques de type T et l'évaluation  
de leurs effets anticonvulsivants et  
antiépileptiques**

Soutenue le 25 Novembre 2015 devant le jury composé de

Pr. Said El ANTRI, PES, FST Mohammedia, Maroc	Président de Jury
Pr. Mohammed ERRAMI, PES, FS Tétouan, Maroc	Rapporteur
Pr. Heinrich BRINKMEIER, PES, University of Greifswald, Allemagne	Rapporteur
Dr. Hamid MOHA OU MAATI, MCF, FS Montpellier, France	Examineur
Pr. Taoufiq FECHTALI, PES, FST Mohammedia, Maroc	Co-directeur
Dr. Philippe LORY, DR2, IGF, CNRS, Montpellier, France	Directeur de thèse



# Résumé

Les plantes médicinales constituent un réservoir important de substances naturelles pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques. L'intérêt de ce travail est d'explorer le potentiel thérapeutique des plantes médicinales connues pour leurs vertus neuromodulatrices et potentiellement d'intérêt pour le traitement de maladies neurologiques, y compris l'épilepsie, en étudiant leur capacité à cibler l'activité des canaux calciques de type T qui jouent un rôle important dans l'hyperexcitabilité neuronale et la physiopathologie des épilepsies.

Le premier objectif de ma thèse était d'étudier l'effet des extraits de plantes méditerranéennes ; *Lavandula stoechas*, *Rosmarinus officinalis* et *Peganum harmala*, ainsi que leurs principes actifs ; le linalol, l'acide rosmarinique et l'harmaline, respectivement, sur des courants calciques de type T en utilisant la technique patch-clamp en configuration cellule-entière. Les enregistrements électrophysiologiques à partir de cellules HEK-293 exprimant les canaux T montrent que la lavande, le romarin et l'harmal réduisent significativement les courants de type T sur la gamme de potentiel membranaire testée. Les produits naturels arrivent à déplacer l'état stable d'inactivation vers des potentiels de membrane plus négatifs et certains (*Peganum harmala*) accélèrent significativement la cinétique d'inactivation des canaux T. Le deuxième objectif était d'étudier l'effet anticonvulsivant et/ou antiépileptique de ces plantes et du TTA-A2 ; un bloqueur sélectif des canaux T, sur un modèle animal d'épilepsie. Nos résultats valident le PTZ et la 4-AP comme inducteurs de crises chez le poisson zèbre, ces deux modèles permettant le criblage pour des molécules anticonvulsivantes et/ou antiépileptiques. Nos résultats montrent que le romarin, la lavande ainsi que le TTA-A2 inhibent les crises pseudo-épileptiques chez ces deux modèles. Dans l'ensemble, ce projet suggère que les canaux T seraient impliqués dans les propriétés neuroprotectrices et anticonvulsivantes des plantes médicinales étudiées et valide le rôle des plantes médicinales comme source intéressante de produits thérapeutiques.

**Mots-clés :** Canaux calciques de type T, Plantes médicinales, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula*, *Peganum harmala*, Patch-clamp, poisson Zèbre, PTZ, 4-AP.

# Abstract

Medicinal plants represent an interesting reservoir of natural substances for the discovery of new therapeutic molecules. The interest of this work is to explore the therapeutic potential of medicinal plants, which are known for their neuromodulation effects, by studying their ability to target the activity of T-type calcium channels which play a major role in neuronal hyperexcitability and the pathophysiology of epilepsy and other neurological diseases.

The first objective of my thesis was to study the effect of Mediterranean plant extracts; *Lavandula stoechas*, *Rosmarinus officinalis* and *Peganum harmala* and their active ingredients; linalool, rosmarinic acid and harmaline, respectively, on T-type calcium currents using the patch clamp technique in whole-cell configuration. Electrophysiological recordings from HEK-293 cells expressing T-type channels show that lavender, rosemary and Harmal significantly reduce T-type currents over the potential range tested. The natural products shifted steady-state inactivation towards more negative membrane potentials and some plants (*Peganum harmala*) significantly accelerate the inactivation kinetics of T-type channels. The second objective was to study the anticonvulsant / antiepileptic activity of these plants as well as TTA-A2, a selective T-type channel blocker, in an epilepsy model in zebrafish. Our results validate the PTZ and 4-AP as inducers of convulsions in zebrafish and both models could be used to screen for anticonvulsant and/or antiepileptic molecules. Our results show that rosemary, lavender and TTA-A2 inhibit seizures-like activity in these two models. Overall, this project suggests that T-type channels are involved in the neuroprotective and anticonvulsant properties of the studied medicinal plants and validates the role of medicinal plants as a valuable source of therapeutic products.

**Keywords:** T-type Calcium Channels, Medicinal plants, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula*, *Peganum harmala*, patch-clamp, zebrafish, PTZ, 4-AP, epilepsy.

## ملخص

تعتبر النباتات موردا مهما للمواد الطبيعية لاكتشاف جزيئات علاجية جديدة. الهدف من هاته الدراسة هو اكتشاف الامكانيات العلاجية لمجموعة من النباتات الطبية من خلال دراسة قدرتها على استهداف نشاط قنوات الكالسيوم من النوع ط التي تلعب دورا اساسيا في فرط الاستثارية العصبية، الفيزيولوجيا المرضية لمرض الصرع بالاضافة الى عدة امراض عصبية اخرى.

الهدف الاول من اطروحتي هو دراسة تأثير المستخلصا النباتية المتوسطة: الضرم المكور *Lavandula stoechas*، الروزماري *Rosmarinus officinalis* والحرمل *Peganum harmala* بالاضافة الى جزيئاتهم النشطة المتمثلة في اللينالول، حمض الروسمارينيك والحرملين، على التوالي، على تيارات الكالسيوم من النوع ط باستخدام تقنية الإلتقاط الرقعي. تبين التسجيلات الكهربية المسجلة من خلال الخلايا المعبرة عن القنوات من النوع ط، ان الضرم المكور ، الروزماري والحرمل يقللون إلى حد كبير من نشاط التيارات من النوع ط. بالاضافة الى ذلك، تقوم هاته المكونات الطبيعية بتحويل الحالة المستقرة المعطلة باتجاه جهد غشائي اكثر سلبية. كما تقوم بعض النباتات كالحرمل بتسريع حركية تعطيل قنوات الكالسيوم من النوع ط. يتمثل الهدف الثاني من هاته الاطروحة في دراسة القدرة العلاجية لهاته النباتات الطبية وكذلك TTA-A2 ؛ الذي يعتبر كايح انتقائي لقنوات الكالسيوم ط ، من خلال استعمال نموذج سمك الزرد للصرع. تبين نتائجنا ان المواد الكيميائية البنثاليننترازول والامينوبيريدين تسبب تشنجات مهمة لسمك الزرد، كما يمكن استخدامهما على حد سواء كنماذج للكشف عن جزيئات مضادة للصرع. تظهر نتائجنا أن الروزماري و الخزامى يقللون من حدة التشنجات في كلا النموذجين.

بشكل عام، تشير هاته الاطروحة إلى الخصائص العصبية و المضادة للتشنجات التي تلعبها النباتات الطبية من خلال تأثيرها على قنوات الكالسيوم من النوع ط، كما تؤكد دور النباتات الطبية بكونها مصدرا قيما للمنتجات العلاجية.

**الكلمات الرئيسية:** قنوات الكالسيوم من النوع ط، النباتات الطبية، الضرم المكور، الروزماري، الحرمل، الإلتقاط الرقعي، سمك الزرد، البنثاليننترازول، الامينوبيريدين، الصرع.

# Sommaire

<b>Résumé .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>2</b>
<b>ملخص.....</b>	<b>3</b>
<b>Sommaire .....</b>	<b>4</b>
<b>Rapporteurs et Membres de Jury .....</b>	<b>7</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>9</b>
<b>List des Figures.....</b>	<b>11</b>
<b>List des tableaux.....</b>	<b>14</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>15</b>
<b>Avant-propos et état de l'art .....</b>	<b>17</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>18</b>
<b>I. Revue Bibliographique .....</b>	<b>21</b>
A. Présentation générale des canaux calciques dépendants du voltage.....	21
a. La sous-famille Cav1.....	22
b. La sous-famille Cav2.....	24
c. La sous-famille Cav3.....	24
B. Les canaux calciques de type T .....	25
a. Clonage des canaux calciques de type T .....	26
b. Propriétés et caractéristiques biophysiques des canaux calciques de type T.....	26
c. Distribution et régulation des canaux calcique de type T.....	28
d. Pharmacologie des canaux calciques de type T.....	30
e. Rôles physiopathologiques des canaux calciques de type T .....	34
C. Modulation des canaux calciques de type T par les plantes médicinales .....	35
a. Les alcaloïdes .....	36
b. Les phénylpropanoïdes.....	38
c. Les curcuminoïdes.....	39
d. Les terpènes.....	40
e. Les cannabinoïdes .....	41
D. Les épilepsies .....	43

a.	Introduction générale.....	43
b.	Type de crises.....	44
c.	Les canaux calciques de type T dans l'épilepsie .....	51
d.	Traitement de l'épilepsie.....	53
e.	Les modèles animaux dans l'épilepsie .....	57
f.	Principales caractéristiques du poisson zèbre ( <i>Danio rerio</i> ).....	61
g.	L'épilepsie et les plantes médicinales .....	69
E.	Objectifs du travail.....	70
<b>II.</b>	<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>73</b>
A.	Matériel biologique .....	73
a.	La collecte .....	73
b.	Préparation du matériel végétal.....	73
c.	Macération, filtration et extraction.....	73
d.	Stockage et estimation de quantité du résidu sec .....	74
B.	Huiles essentielles et principes actifs purifiés.....	74
C.	Electrophysiologie en patch-clamp .....	74
a.	Transformation des cellules XL10 Gold avec des Plasmides Cav3 .....	74
b.	Digestion enzymatique et électrophorèse.....	75
c.	Culture cellulaire et transfection .....	75
d.	Enregistrement de l'activité électrophysiologique.....	76
D.	Poisson zèbre et épilepsie.....	77
a.	Modèle animal.....	77
b.	Substances pharmacologiques et naturelles.....	78
c.	Evaluation toxicologique.....	79
d.	Evaluation de l'activité anticonvulsivante et antiépileptique.....	79
E.	Analyses statistiques.....	81
<b>III.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>83</b>
A.	Extraction des plantes médicinales par solvant.....	83
B.	Détermination des ligands actifs sur les canaux calciques de type T par électrophysiologie en Patch-clamp.....	83
a.	Etude des effets de la lavande et du Romarin sur les canaux calciques de type T .....	83
b.	Etude de la modulation des canaux calciques de type T par <i>Peganum harmala</i> et son principe actif l'harmaline .....	91
C.	Evaluation de l'effet anticonvulsivant et/ou antiépileptique chez le poisson zèbre .....	98
a.	La concentration maximale tolérée : Evaluation toxicologique .....	99

b.	Détermination de la concentration expérimentale des produits convulsivants.....	100
c.	Analyse du profil comportemental chez le modèle poisson zèbre .....	101
d.	Validation des modèles PTZ et 4-AP comme modèles d'étude de l'épilepsie.....	103
e.	Evaluation des effets anticonvulsivants et antiépileptiques du TTA-A2.....	105
f.	Evaluation de l'activité anticonvulsivante des plantes médicinales .....	107
<b>IV.</b>	<b>Discussion générale .....</b>	<b>110</b>
A.	Les canaux calciques de type T: une cible moléculaire intéressante des extraits de lavande..	110
B.	Inhibition des canaux calciques de type T par <i>Peganum harmala</i> et l'harmaline.....	112
C.	Les inhibiteurs des canaux calciques de type T peuvent être utile dans le traitement de la douleur et de l'épilepsie.....	114
D.	Le TTA-A2, la lavande et le romarin atténuent l'activité pseudo-épileptique chez le poisson zèbre .....	115
<b>V.</b>	<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>120</b>
	<b>Annexe I .....</b>	<b>122</b>
	<b>Annexe II.....</b>	<b>157</b>
<b>VI.</b>	<b>Références .....</b>	<b>190</b>
<b>VII.</b>	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>218</b>

# Rapporteurs et Membres de Jury

## **Pr. Said El ANTRI, Président du Jury**

Professeur de l'enseignement supérieur  
Faculté des Sciences et Techniques Mohammedia  
BP 146 Quartier Yasmina  
28800, Mohammedia- Maroc

## **Pr. Mohammed Errami, Rapporteur**

Doyen de la Faculté des Sciences de Tétouan  
Professeur de l'Enseignement Supérieur (C)  
Faculté des Sciences de Tétouan  
Université Abdelamlek Essaâdi  
BP. 2121, Tétouan, Maroc  
Tél.: +212 539 962 344

## **Pr. Heinrich BRINKMEIER, Rapporteur**

Directeur de l'institut de Physiopathologie  
Professeur de Pathophysiologie et de Médecine Moléculaire  
Université de Greifswald  
Institut de Pathophysiologie  
D-17495 Karlsburg, Allemagne  
Tel.: +49 3834 86 19319

## **Dr. Hamid MOHA OU MAATI, Examineur**

Maitre de conférences  
Facultés des Sciences, Université de Montpellier  
2 Place Eugène Bataillon,  
34090, Montpellier, France

## **Pr. Taoufiq FECHTALI, Directeur de Thèse**

Vice doyen chargé de la recherche scientifique et de coopération  
Directeur du CEDoc STI et 2D  
Professeur de l'Enseignement Supérieur  
Faculté des Sciences et Techniques Mohammedia  
BP 146 Quartier Yasmina  
28800, Mohammedia- Maroc

## **Dr. Philippe LORY, Directeur de Thèse**

Directeur de recherche CNRS, Directeur adjoint à L'IGF  
Institut de Génomique fonctionnelle  
Département de Neurosciences & Ion Channel Biology  
CNRS UMR5203 - INSERM U1191 - Université de Montpellier  
141, rue de la Cardonille  
34094 Montpellier Cedex 05 - France  
Téléphone: 33 (0) 434 359 251 / 250

*A mes parents*

*A mon mari et à mon cher enfant Jad...*

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de Jury d'avoir accepté de juger cette thèse.

Pr. Heinrich BRINKMEIER, Pr. Mohammed ERRAMI et Pr. Said EL ANTRI m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse. Je vous remercie sincèrement pour le temps que vous avez consacré à la lecture et à l'évaluation de ce manuscrit ainsi que pour votre présence lors de ma soutenance.

“My very sincere thanks to Pr. BRINKMEIER, Pr. Mohammed ERRAMI and Pr. Said EL ANTRI for reading and reviewing the manuscript as well as for your presence during my thesis defense”

Je tiens à remercier Dr. Hamid MOHA OU MAATI pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse et pour sa participation scientifique ainsi que le temps qu'il a consacré à ma recherche.

J'adresse mes sincères remerciements à mes directeurs de thèse ; Pr. Taoufiq FECHTALI et Dr. Philippe LORY de m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires et de m'avoir fait confiance tout au long de cette thèse. Merci pour votre encadrement et votre soutien durant ces années de thèse.

Je remercie également tous les membres du laboratoire. Jean CHEMIN, Arnaud MONTEIL, Iulia BLESNEAC, Maud COCHET, Tiphaine VOISIN, Malik BOUASS, Isabelle BIDAUD. Merci pour votre aide, vos conseils et votre bonne humeur. J'ai eu un réel plaisir de travailler auprès de vous. Je remercie également les membres du laboratoire JOPLING pour leur collaboration concernant la partie Poisson zèbre. Merci Adèle FAUCHERRE et Girisaran GANGATHRAN pour votre aide et vos précieux conseils.

Mes sincères remerciements à Mme Céline SACCHI-PIETRI ainsi que toute l'équipe du programme Erasmus Mundus Averroès pour leur soutien et leur assistance.

Je tiens à remercier mon mari Anas pour son amour, son encouragement et son soutien indéfectible tout au long de mon parcours. Notre couple a grandi en même temps que mon projet scientifique, le premier servant de socle solide à l'épanouissement du second. Merci d'être le meilleur et le plus compréhensif des maris et des papas.

De plus, mes remerciements seraient incomplets, si je ne fais pas mention de mon enfant. Merci Jad d'avoir partagé avec moi une grande partie de ma thèse et d'avoir été le petit ange qui me soutenait pour mener à bout mon travail.

Je suis également reconnaissante à ma famille pour leur soutien constant et de m'avoir toujours poussé à être la meilleure version de moi-même. Maman et papa, je vous remercie de m'avoir inculqué l'importance de l'éducation et de toujours avoir eu confiance en moi. Merci d'avoir été mes plus grands fans. Mes sincères remerciements à mes frères Mohammed Amine et Hamza et ma douce belle-sœur Amal pour leur soutien immense.

La famille EL HAJJAJI est devenue ma famille, par mariage, certes, mais aussi par leur hospitalité chaleureuse et par leurs petits soins. Merci de me considérer en tant que l'une d'entre vous.

Je tiens également à remercier Rajaa et Younes KARTOUBY pour leur amitié ainsi que pour leur soutien durant ma mobilité à Montpellier, sans oublier mon petit Naël adoré.

Enfin, encore un grand merci à tous pour m'avoir conduit à ce jour mémorable.

**« Ce travail a été financé par le Labex « Ion Science Channel and Therapeutics ». Chaymae El Alaoui était soutenue par la bourse du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique du Maroc, les programmes Erasmus Mundus Averroès et L'Oréal-UNESCO pour les femmes et la Science ».**

# List des Figures

Figure 1: Les canaux calciques dépendants du voltage. ....	22
Figure 2: Différentes familles et sous-familles des canaux calciques dépendants du voltage.....	23
Figure 3: Propriétés et caractéristiques biophysiques des canaux calciques de type T...	27
Figure 4: Distribution subcellulaire des isoformes Cav3 dans le néocortex .....	29
Figure 5: Effet du TTA-A2 sur les courants calciques de type T. ....	33
Figure 6: Structure chimique des alcaloïdes inhibant les canaux calciques de type T ....	38
Figure 7: Inhibition des canaux calciques de type T par l'eugénol .....	39
Figure 8: Structure chimique de la curcumine, l'un des composés majeurs de la classe des curcuminoïdes .....	40
Figure 9: Structure chimique du Linalol .....	41
Figure 10: Structure chimique des phytocannabinoïdes modulant les canaux calciques de type T.....	42
Figure 11: Zones fonctionnelles du cerveau.....	43
Figure 12: Les trois types d'épilepsies divisés selon leur étiologie. D'après la ligue suisse contre l'épilepsie.....	45
Figure 13: Types de crises d'épilepsie. ....	46
Figure 14: Représentation schématique des grandes catégories des crises généralisées .	47
Figure 15: Les crises tonico-cloniques (Grand mal) affectent l'ensemble du cerveau. Comparaison entre EEG normale et EEG en cours d'une crise tonico-clonique .....	49
Figure 16: Représentation schématique de la boucle thalamocorticale et de l'expression des canaux calciques de type T.....	52
Figure 17: Saint Séverin de Noricum exorcisant le démon chez une jeune femme.....	53
Figure 18: Schéma représentant les récepteurs glutamatérgiques situés au niveau de la synapse excitatrice.....	57
Figure 19: Schéma représentant les modèles murins des types spécifiques d'épilepsie ou de crises d'épilepsie. ....	60
Figure 20: Caractéristiques physiologiques et dimorphisme sexuel chez le poisson zèbre. ....	62
Figure 21: Principales étapes du développement embryo-larvaire du poisson zèbre.....	63
Figure 22: Larves de poisson zèbre de 7 jours post-fertilisation dans une plaque de 96 puits. ....	65

Figure 23: Image prise avec un microscope confocale représente la barrière hémato-encéphalique chez un embryon de poisson zèbre. ....	66
Figure 24: Crise aigüe chez le poisson zèbre.....	67
Figure 25: Expression du gène c-fos dans l'épilepsie chez le poisson zèbre.....	68
Figure 26: Extraction des plantes médicinales au Rotavapor.....	74
Figure 27: Représentation schématique du système d'électrophysiologie en patch-clamp .....	77
Figure 28: Reproduction et unité d'élevage des poissons zèbres .....	78
Figure 29: Evaluation de l'activité locomotrice chez le poisson zèbre. ....	80
Figure 30: Modulation des canaux Cav3.2 par les extraits méthanoliques des plantes médicinales.....	85
Figure 31: Inhibition des canaux Cav3.2 par les huiles essentielles de lavande et du leur principe actif linalol .....	86
Figure 32: <i>Lavandula stoechas</i> , <i>Lavandula angustifolia</i> et Linalool n'affectent pas les propriétés d'activation des canaux Cav3.2 .....	87
Figure 33: <i>Lavandula stoechas</i> , <i>Lavandula angustifolia</i> Miller et le Linalol modifient l'inactivation à l'état stationnaire.....	88
Figure 34: Inhibition des courants Cav3.2 par <i>Rosmarinus officinalis</i> et son principe actif l'acide rosmarinique.....	89
Figure 35: <i>Rosmarinus officinalis</i> et l'acide rosmarinique modifient l'inactivation à l'état stable sans avoir un effet sur les propriétés d'activation.....	90
Figure 36: L'efficacité de l'inhibition des canaux Cav3.2 par <i>Lavandula stoechas</i> et <i>Rosmarinus officinalis</i> est dépendante du potentiel de membrane au repos .....	91
Figure 37: Inhibition des canaux calciques de type T recombinants par <i>Peganum harmala</i> .....	93
Figure 38: Effets de <i>P. harmala</i> sur les propriétés biophysiques des courants calciques de type T.....	94
Figure 39: <i>P. harmala</i> ralentit les cinétiques d'inactivation sans avoir un effet sur les cinétiques d'activation.....	95
Figure 40: L'harmaline module les canaux calciques de type T.....	96
Figure 41: L'harmaline inhibe les courants T sans avoir d'effet sur les propriétés d'activation.....	97
Figure 42: L'harmaline affecte l'inactivation à l'état stationnaire des canaux T.....	98
Figure 43: Comparaison entre deux larves de poisson zèbre lors des tests toxicologiques .....	99

<b>Figure 44: Effets proconvulsivants du PTZ et du 4-AP chez les larves du poisson zèbre.</b> .....	<b>101</b>
<b>Figure 45: Profil comportemental des larves de poisson zèbre exposées aux substances proconvulsivantes pendant une heure de suivi</b> .....	<b>103</b>
<b>Figure 46: Analyse de l'effet anticonvulsivant de l'acide valproïque chez les larves du poisson zèbre</b> .....	<b>104</b>
<b>Figure 47: Evaluation de l'activité anticonvulsivante du TTA-A2 chez le modèle poisson zèbre épileptique</b> .....	<b>106</b>
<b>Figure 48: Evaluation de l'activité anticonvulsivante du <i>Rosmarinus officinalis</i> chez le modèle poisson zèbre épileptique</b> .....	<b>108</b>

# List des tableaux

<b>Tableau 1: Pharmacologie et fonctions physiologiques des canaux calciques dépendants du voltage .....</b>	<b>25</b>
<b>Tableau 2: Nouvelle classification des crises généralisées selon la ligue internationale contre l'épilepsie. ....</b>	<b>47</b>
<b>Tableau 3: Les médicaments antiépileptiques et leur mécanisme d'action .....</b>	<b>54</b>
<b>Tableau 4: Liste des plantes médicinales et des parties utilisées .....</b>	<b>73</b>
<b>Tableau 5: Rendement obtenu en (%) suite aux extractions des plantes médicinales.....</b>	<b>83</b>
<b>Tableau 6: Détermination des concentrations maximales tolérées chez les larves de poisson zèbre .....</b>	<b>100</b>
<b>Tableau 7: Effet des extraits des plantes médicinales sur l'activité pseudo-épileptique chez les larves de poisson zèbre.....</b>	<b>107</b>

# Liste des abréviations

## A

<b>AMPC</b>	<b>Adénosine monophosphate cyclique</b>
<b>AMPK</b>	<b>AMP-activated protein kinase</b>
<b>ACTH</b>	<b>Adénocorticotrophine</b>
<b>4-AP</b>	<b>4-Aminopyridine</b>

## B

<b>BTZ</b>	<b>Benzodiazépine</b>
<b>BBA</b>	<b>Bis-benzylisoquinoléine</b>

## C

<b>CCDV</b>	<b>Canaux calciques dépendants du voltage</b>
<b>CCTL</b>	<b>Canaux calciques de type L</b>
<b>CCTT</b>	<b>Canaux calciques de type T</b>
<b>CCTPQ</b>	<b>Canaux calciques de type P/Q</b>
<b>CCTN</b>	<b>Canaux calciques de type N</b>
<b>CCTR</b>	<b>Canaux calciques de type R</b>
<b>CFTR</b>	<b>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</b>
<b>CMT</b>	<b>Concentration maximale tolérée</b>

## D

<b>DHP</b>	<b>Dihydropyridine</b>
<b>DPO</b>	<b>Décharge pointe-onde</b>
<b>DRG</b>	<b>Ganglion de la racine dorsale</b>
<b>DMEM</b>	<b>Dulbecco's Modified Eagle's medium</b>

## E

<b>EEG</b>	<b>Electroencéphalogramme</b>
<b>EST</b>	<b>Expressed Sequence Tag</b>

## G

<b>GAERS</b>	<b>Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg</b>
--------------	---

**GAD**            **Glutamate décarboxylase**

**GABA**           **Acide  $\gamma$ -aminobutyrique**

## **H**

**HVA**            **Canaux à haut seuil d'activation**

**5-HT**           **5-hydroxytryptamine**

**HERg**           **Human Ether-a-go-go Related Gene**

## **I**

**ILAE**           **League internationale contre l'épilepsie**

## **L**

**LVA**            **Canaux à bas seuil d'activation**

## **M**

**MAP-2**          **Microtubule-associated protein**

**MAO**            **Monoamine oxydase**

**MAE**            **Médicaments antiépileptiques**

## **N**

**NMDA**          **Acide N-méthyl-D-aspartique**

**NG**             **Neuroblastoma glioma**

## **O-P**

**ORC**            **Cellules réceptrices olfactives**

**PAA**            **Phenylalylamines**

**PTZ**            **Pentylenetétrazole**

## **S-T-V**

**SNC**            **Système nerveux central**

**SOC**            **Store-Operted Channels**

**TSA**            **Trouble du spectre de l'autisme**

**TG**             **Ganglion trijumeau**

**VPA**            **Acide valproïque**

# Avant-propos et état de l'art

Après l'obtention d'un Master en Biotechnologie Médicale de l'Université Al Akhawayn, et dans une suite logique de mon parcours de chercheuse, j'ai entamé une thèse dans le laboratoire de Neurosciences, Physiopathologies intégrées et substances naturelles à la Faculté des Sciences et Techniques Mohammedia sous la direction de Pr. Taoufiq FECHTALI. Le projet de thèse s'intéresse à l'étude de l'effet des plantes médicinales sur les maladies neurologiques, qui sont des affections qui touchent le système nerveux central et périphérique. Elles sont très variées dans leur mode d'expression et présentent des symptômes qui comprennent une multitude de conditions physiologiques y compris une mauvaise coordination, des troubles de mémoire et des convulsions. Elles bénéficient depuis une dizaine d'années d'une gamme de nouveaux traitements qui contribuent à améliorer la qualité de vie des malades.

C'est suite à l'organisation du premier congrès international « Ion Channels Signaling and Mechanisms » à Marrakech (11-2011), par mon directeur de thèse Pr. Taoufiq FECHTALI, trésorier de la société marocaine de Biochimie et de Biologie Moléculaire, et par des professeurs et chercheurs marocains à citer mon professeur Fouad Berrada de l'université Al Akhawayn, et Dr. Mohammed Trebak de l'Albany Medical college, USA, que nous avons rencontré Dr. Philippe LORY, pionnier dans l'étude et la caractérisation des canaux calciques. Les canaux calciques dépendants du voltage constituent des facteurs importants dans la signalisation cellulaire et dont les changements dans les propriétés biophysiques ou au niveau de leur expression peuvent entraîner des changements physiopathologiques conduisant à plusieurs troubles neurologiques. Ainsi, nous avons mis en place une collaboration et une cotutelle de thèse, dans le but de réunir les compétences nécessaires pour la réussite de mes travaux de recherche. Nous avons visé principalement la recherche de l'intérêt des extraits de plantes médicinales méditerranéennes dans le traitement de l'épilepsie. Les travaux ont été effectués grâce à un programme d'échange Erasmus Mundus Averroès. Dans le cadre de ma thèse, j'ai pu recevoir plusieurs récompenses : le prix L'Oréal-UNESCO "Women in Science" en Décembre 2012, le 2ème prix du meilleur poster dans les journées de l'école doctorale CBS2 de Montpellier en Mai 2013 et le prix du meilleur poster dans le meeting du Labex des canaux ioniques (ICST) à l'île d'Oléron, France en Septembre 2013.

Le travail s'intéresse plus précisément à l'étude de l'effet des plantes médicinales sur la modulation des canaux calciques de type T ainsi que l'évaluation de leurs effets anticonvulsants et/ou antiépileptiques.

# Introduction générale

L'épilepsie est l'une des troubles les plus communs du système nerveux central. Elle représente la deuxième maladie neurologique après la migraine. L'épilepsie se caractérise par la récurrence de crises épileptiques qui se manifestent par l'apparition brutale et excessive de décharges de potentiels électriques au sein d'une population de neurones du cerveau, qui peut atteindre soit l'ensemble des deux hémisphères (crises généralisées) soit une région limitée (crises focales).

A l'heure actuelle, le traitement des épilepsies repose essentiellement sur la pharmacologie. Il existe plusieurs composés antiépileptiques commercialisés qui présentent des profils pharmacologiques et des mécanismes d'action variés. Malgré ce nombre important de médicaments antiépileptiques disponibles, les cliniciens restent confrontés à deux problèmes majeurs : 1) aucun médicament ne peut prévenir les mécanismes générateurs de la maladie : l'épileptogénèse, 2) la pharmacorésistance qui touche environ 30% des patients atteints d'épilepsie focale (Epilepsie du lobe temporel).

De nombreuses études montrent que les canaux calciques jouent un rôle important dans la physiopathologie des épilepsies. Sur différents modèles d'épilepsie, il a été montré que les inhibiteurs des canaux calciques sont capables de réduire l'incidence des crises et possèdent des propriétés anticonvulsivantes. Dans ce contexte, de plus en plus d'études décrivent que les canaux calciques activés pour de faibles dépolarisations membranaires : les canaux calciques de type T, sont impliqués dans différents types d'épilepsie.

Les canaux calciques de type T (Cav3) sont une voie d'entrée du calcium dans les cellules excitables. Ils sont activés par de faibles dépolarisations de la membrane plasmique et produisent un courant calcique qui s'inactive rapidement. Ces canaux jouent un rôle important dans l'excitabilité cellulaire, des neurones en particulier, et sont impliqués dans de nombreuses maladies, telles que l'épilepsie, la douleur neuropathique ou encore l'hypertrophie cardiaque et le cancer. C'est l'augmentation de l'activité des canaux calciques de type T qui est souvent retrouvée dans ces situations pathologiques et l'identification d'inhibiteurs sélectifs des canaux calciques de type T est un enjeu actuel. Rechercher des ligands naturels inhibiteurs de l'activité des canaux T représente une activité importante de l'équipe de Philippe Lory (IGF, Université de Montpellier). L'équipe a en particulier identifié de nombreux lipides naturels qui inhibent très efficacement les canaux T. C'est le cas des dérivés de l'anandamide, un endocannabinoïde, et de certains lipoaminoacides qui apparaissent sélectifs des canaux T.

Les produits actifs de nombreuses plantes médicinales représentent une réserve potentielle et insuffisamment explorée de modulateurs des canaux calciques de type T. Il a pourtant été montré que la capsaïcine, le principe actif du piment connue pour son action sur les canaux TRPV1, inhibe également des canaux calciques de type T.

L'objectif général de mon travail de thèse était d'étudier l'effet des extraits de plantes médicinales à citer la lavande, le romarin et l'harmal ainsi que leurs principes actifs, le linalol, l'acide rosmarinique et l'harmaline, respectivement, sur la modulation des canaux calciques de type T (mécanisme d'action) par électrophysiologie en patch-clamp sur des canaux Cav3 recombinants, exprimés en système hétérologue (cellules HEK-293 transfectées). La deuxième partie de mon travail vise l'étude de l'effet de ces extraits ainsi que l'effet des bloqueurs sélectifs des canaux calciques de type T (TTA-A2) sur un modèle animale ; le poisson zèbre, et ce pour déterminer leurs effets sur l'activité pseudo-épileptique induite pharmacologiquement suite à l'administration de substances proconvulsivantes à citer le Pentylènetétrazole et le 4-Aminopyridine. Grâce à ce projet collaboratif, nous avons mis en évidence la modulation des canaux calciques de type T par de nouvelles molécules d'origine naturelles et nous avons pu évaluer leurs effets anticonvulsivants chez les deux modèles PTZ et 4-AP.

# **Revue bibliographique**

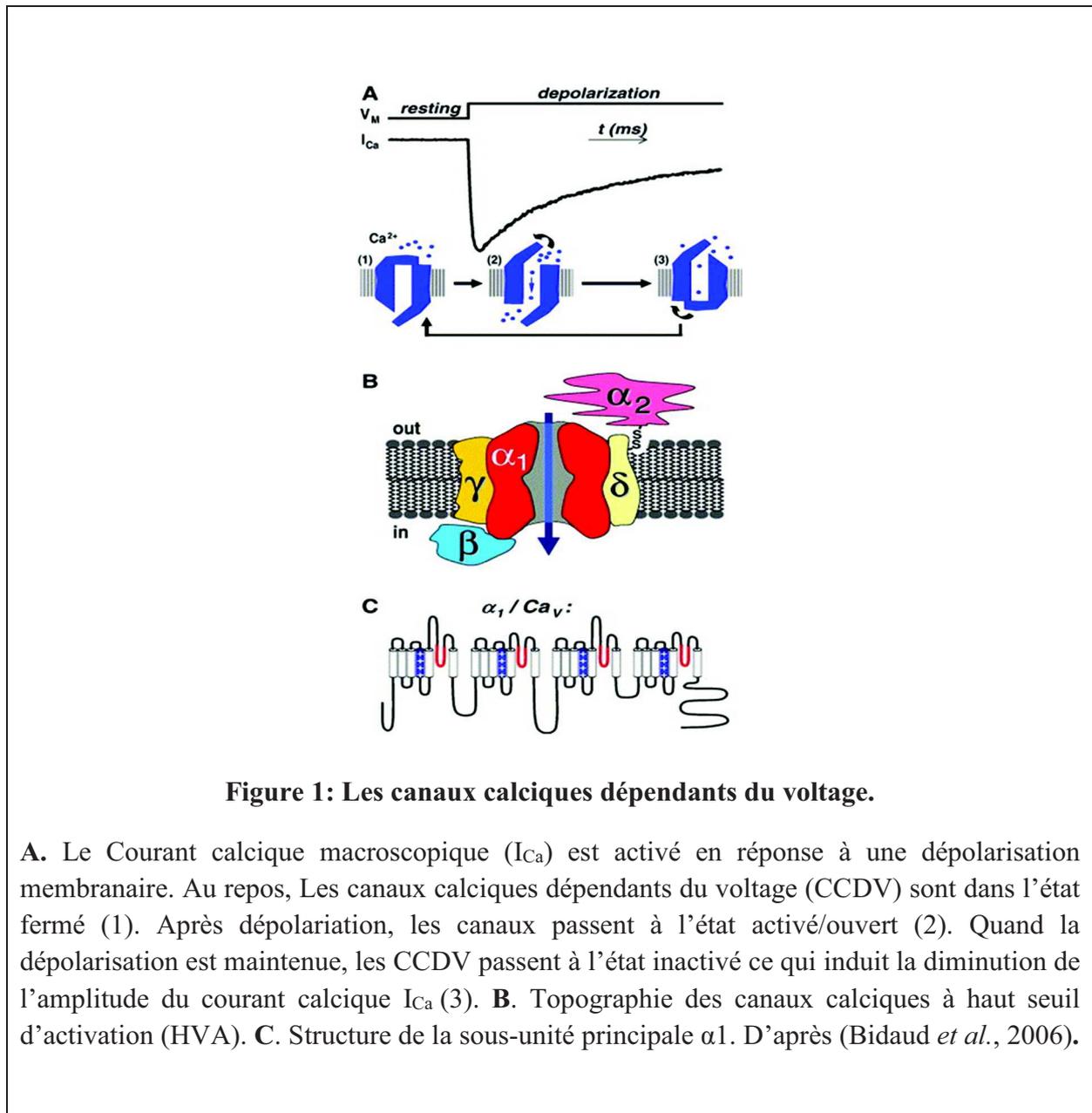
# I. Revue Bibliographique

## A. Présentation générale des canaux calciques dépendants du voltage

Le calcium est l'une des molécules les plus importantes dans la signalisation cellulaire et dont l'entrée au niveau des cellules excitables se fait en réponse à des potentiels d'action et des dépolarisations membranaires. Le calcium sert de second messenger pour l'activation de plusieurs événements physiologiques dans différents types de cellules; il peut déclencher la sécrétion hormonale, entraîner la contraction musculaire, et activer la transcription génique (Berridge *et al.*, 2000; Berridge *et al.*, 2003; Clapham, 2007). Les canaux calciques dépendants du voltage (CCDV) sont les principaux facteurs responsables de la régulation de ces processus intracellulaires par la médiation de l'entrée du calcium dans les cellules suite à la dépolarisation de la membrane cellulaire (Clapham, 2007). Les CCDV sont divisés en deux grandes familles en fonction de leurs propriétés structurales et biophysiques: Les canaux calciques à haut-seuil d'activation (HVA: High-voltage activated); activables par de fortes dépolarisations membranaires et les canaux calciques à bas-seuil d'activation (LVA: Low-voltage activated) qui s'active en réponse à de faibles dépolarisations membranaires proches du potentiel de repos membranaire (Armstrong *et al.*, 1985). Cette dépendance au voltage permet à ces canaux de remplir des rôles spécialisés dans des types cellulaires spécifiques. Cependant, le dysfonctionnement des canaux calciques peut être responsable d'une multitude de troubles physiologiques, y compris l'arythmie, l'ataxie et l'épilepsie.

Les deux familles des CCDV présentent une sous-unité  $Cav\alpha1$  commune qui se compose de quatre domaines homologues (I-IV). Chaque domaine contient six segments transmembranaires (S1-S6) et une boucle intracellulaire qui permet le passage sélectif des ions  $Ca^{2+}$ . Les variations des potentiels membranaires sont détectées par les résidus d'acides aminés, positivement chargés, présents au niveau du segment 4 (S4) de chaque domaine. Ces résidus régulent l'ouverture et la fermeture des canaux. Les domaines transmembranaires sont reliés par des grandes boucles cytoplasmiques et présentent des extrémités N- et C-terminales au niveau des parties cytoplasmiques (Catterall *et al.*, 2005a). Ces régions sont des sites importants pour la régulation des canaux par des facteurs endogènes comme les seconds messagers, les protéines G ou encore les protéines kinases (Zamponi *et al.*, 1997; Chemin *et al.*, 2007). En plus de la sous-unité  $Cav\alpha1$ , Les canaux HVA contiennent la sous-unité intracellulaire  $\beta$  et la sous-unité transmembranaire  $\alpha2-\delta$  ce qui fait des HVA des protéines transmembranaires multimériques. En revanche, Les LVA sont des monomères (Fig. 1) (Curtis *et al.*, 1984; Catterall *et al.*, 2005b).

Selon les études pharmacologiques et biophysiques, les CCDV comportent trois sous-familles avec différents sous-types: Cav1, Cav2 (HVA) et Cav3 (LVA) (Fig. 2) (Catterall *et al.*, 2005b).



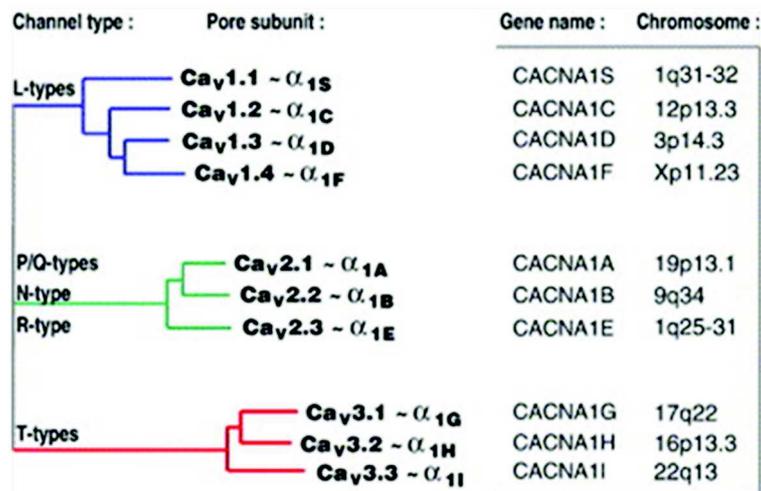
**Figure 1: Les canaux calciques dépendants du voltage.**

**A.** Le Courant calcique macroscopique ( $I_{Ca}$ ) est activé en réponse à une dépolarisation membranaire. Au repos, Les canaux calciques dépendants du voltage (CCDV) sont dans l'état fermé (1). Après dépolariation, les canaux passent à l'état activé/ouvert (2). Quand la dépolarisation est maintenue, les CCDV passent à l'état inactivé ce qui induit la diminution de l'amplitude du courant calcique  $I_{Ca}$  (3). **B.** Topographie des canaux calciques à haut seuil d'activation (HVA). **C.** Structure de la sous-unité principale  $\alpha_1$ . D'après (Bidaud *et al.*, 2006).

### a. La sous-famille Cav1

La sous-famille Cav1 regroupe les canaux calciques de type L (CCTL), qui sont les principaux canaux calciques présents dans les cellules musculaires et endocrines (Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 et Cav1.4). Ils sont principalement présents dans les tubules transverses qui sont les sites majeurs d'entrée et de libération du calcium au niveau du réticulum sarcoplasmique suite à l'activation des récepteurs de la ryanodine (RyR) (Brette *et al.*, 2004). Les CCTL « L pour Long

lasting » sont activés par de fortes dépolarisations et présentent une inactivation lente (Fox *et al.*, 1987). Ils sont principalement régulés par les voies de phosphorylation impliquant les protéines kinases AMPc-dépendantes (Tsien *et al.*, 1988). Les CCTL sont inhibés sélectivement par les bloqueurs organiques des canaux calciques; les dihydropyridines (DHP), les phenylalylamines (PAA) et les benzothiazépines (BTZ) (Williams *et al.*, 1992; Wheeler *et al.*, 1995; Bech-Hansen *et al.*, 1998). L'entrée du calcium à travers les CCTL permet le couplage excitation-contraction dans les muscles squelettique, cardiaque et lisse (Catterall, 1991), la régulation de la transcription génique (Pandey *et al.*, 2010), la sécrétion des hormones par les glandes endocrines (Yang *et al.*, 2006) ou encore la libération des neurotransmetteurs dans les neurones sensoriels (Barnes *et al.*, 2002). Cependant, le dysfonctionnement de ces canaux a été lié à de nombreux troubles pathologiques, tels que le syndrome de Timothy qui est une maladie multisystémique associée à une mutation dans le gène CACNA1C (Tableau 1) (Splawski *et al.*, 2004; Splawski *et al.*, 2005).



**Figure 2: Différentes familles et sous-familles des canaux calciques dépendants du voltage.**

Représentation schématique de l'arbre phylogénique des différentes sous-familles des CCDV. Quatre gènes codent les canaux calciques de type L (CCTL). Trois gènes codent les canaux calciques neuronaux de type P/Q- N- et R. Trois gènes codent également les canaux calciques de type T (CCTT). Noter que tous les gènes ont été localisés sur les chromosomes humains (colonne à droite). OMIM and HUGO/GDB web sites. D'après (Bidaud *et al.*, 2006).

## **b. La sous-famille Cav2**

La sous-famille des canaux Cav2 est principalement exprimée dans le système nerveux central où elle déclenche la neurotransmission et conduit le flux calcique au niveau des cellules excitables. Elle regroupe les canaux calciques de type P/Q (CCTPQ) avec la sous-unité Cav2.1, les canaux calciques de type N (CCTN) avec la sous-unité Cav2.2, et les canaux calciques de type R (CCTR) avec la sous-unité Cav2.3. Etant des membres des HVA, Ils s'activent en réponse à des dépolarisations membranaires fortes et sont spécifiquement inhibés par la  $\omega$ -agatoxine (type P/Q) (Adams *et al.*, 1993), la  $\omega$ -conotoxine MVIIA-GVIA (Type N) (McCleskey *et al.*, 1987; Olivera *et al.*, 1987) et le SNX-482 (Type R) (Bourinet *et al.*, 2001). Des mutations dans les canaux Cav2 ont été associées à de nombreux troubles héréditaires. Les mutations perte de fonction dans le gène CACNA1A, codant la sous-unité Cav2.1 des CCTPQ, ont été liées à l'ataxie épisodique de type 2 et à l'épilepsie (Rajakulendran *et al.*, 2010; Salvi *et al.*, 2014). En outre, des mutations dans le gène CACNA1B, codant les CCTN, sont associées au syndrome de dystonie myoclonique (Tableau 1) (Groen *et al.*, 2015).

## **c. La sous-famille Cav3**

Les LVA regroupent la sous-famille Cav3 qui comprend les canaux calciques de type T (CCTT) avec les sous-unités Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3. Contrairement aux HVA, les CCTT sont spécifiquement activés par de faibles dépolarisations membranaires et présentent une cinétique plus rapide ainsi qu'une amplitude du canal unique plus petite (Perez-Reyes, 2003). Les CCTT sont exprimés dans une grande variété de cellules et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques, y compris la prolifération (Chemin *et al.*, 2000; Chemin *et al.*, 2002), le sommeil (Anderson *et al.*, 2005), la nociception (Bourinet *et al.*, 2005a; Todorovic *et al.*, 2011) et l'épilepsie (Tsakiridou *et al.*, 1995; Song *et al.*, 2004). (Voir la partie : 2. Les canaux calciques de type T).

**Tableau 1: Pharmacologie et fonctions physiologiques des canaux calciques dépendants du voltage**

	sous-unité $\alpha 1$	Localisation	sélectifs	Rôles physiologiques	Maladies
<b>L</b>	Ca <sub>v</sub> 1.1	Muscle squelettique, tubules transverses, Couplage à RyR1	DHP PAA BTZ	Couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique, régulation de la transcription	Paralysie périodique hypokaliémique
	Ca <sub>v</sub> 1.2	Cardiomyocytes; myocytes, cellules endocrines, péricaryon des neurones, dendrites proximales		Couplage excitation-contraction dans le muscle cardiaque et lisse, sécrétion endocrine, Passage du Ca <sup>2+</sup> dans le péricaryon et les dendrites, régulation de l'activité enzymatiques et de la transcription	Syndrome de Timothy
	Ca <sub>v</sub> 1.3	Cellules endocrines, Soma des neurones, cardiomyocytes, cellules pacemakers, cellules ciliées cochléaires		Sécrétion endocrine, Activité pacemaker, Passage du Ca <sup>2+</sup> dans le péricaryon et les dendrites	Sick Sinus Syndrome
	Ca <sub>v</sub> 1.4	Bâtonnet et cellules bipolaires de la rétine, moelle épinière, glande surrénale, mastocytes		Libération des neurotransmetteurs des photorécepteurs	La cécité nocturne congénitale stationnaire
<b>P/Q</b>	Ca <sub>v</sub> 2.1	Terminaisons nerveuses et dendrites, cellules neuroendocrines	$\omega$ -Agatoxin	Libération des neurotransmetteurs, passage du calcium dans les dendrites, libération des hormones.	Ataxie épisodique de type 2, Epilepsie, ataxie spinocérébelleuse de type 6
<b>N</b>	Ca <sub>v</sub> 2.2	Terminaisons nerveuses et dendrites, cellules neuroendocrines	$\omega$ -Conotoxin-GVIA-MVIA	Libération des neurotransmetteurs, passage du calcium dans les dendrites, libération des hormones.	Syndrome de dystonie myoclonique
<b>R</b>	Ca <sub>v</sub> 2.3	Soma des neurones	SNX-482	Libération des neurotransmetteurs, passage du calcium dans les dendrites, libération des hormones.	
<b>T</b>	Ca <sub>v</sub> 3.1	Soma des neurones et dendrites, cardiomyocytes et myocytes lisses	TTA NCC55-0396	Activité pacemaker et décharges répétitives	Epilepsie absence
	Ca <sub>v</sub> 3.2	Soma des neurones et dendrites, cardiomyocytes et myocytes lisses		Activité pacemaker et décharges répétitives	
	Ca <sub>v</sub> 3.3	Soma des neurones et dendrites		Activité pacemaker et décharges répétitives	

### ■ Les canaux calciques de type T

Les canaux calciques à bas seuil d'activation (Cav3), appelés également les canaux calciques de type T (T pour « Transient »), sont une famille des canaux calciques dépendants du voltage

exprimés dans divers tissus y compris le cerveau et le cœur. Ces canaux contribuent à la régulation de l'afflux du calcium dans les cellules après un potentiel d'action ou une dépolarisation ce qui permet l'activation d'un nombre de mécanismes cellulaires et de fonctions physiologiques telles que, la sécrétion hormonale, la contraction musculaire, et l'excitabilité neuronale.

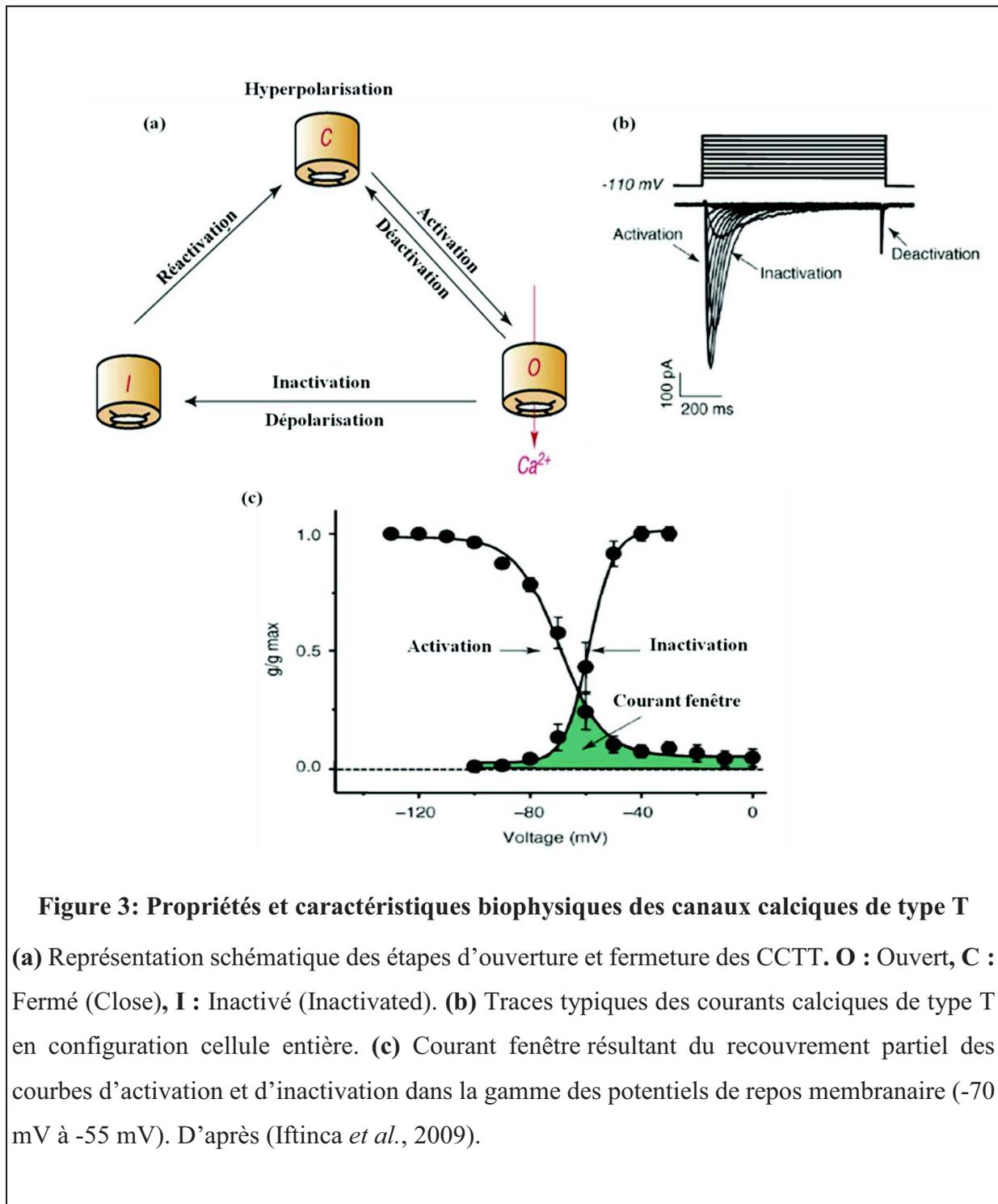
### **a. Clonage des canaux calciques de type T**

Le clonage d'une troisième classe des CCVD représentés par la sous-unité Cav3 a permis aux chercheurs de mener des études approfondies sur la structure et la fonction des CCTT. Cette identification majeure a été précédée par le clonage des CCTL grâce à la purification et au microséquençage du récepteur de la DHP dans le muscle squelettique (Tanabe *et al.*, 1987). C'est grâce à l'analyse des séquences au niveau des bases de données génétiques par les deux équipes Perez-Reyes (IL, USA) et Lory (MTP, France) que le clonage des CCTT est rendu possible en 1998 (Perez-Reyes *et al.*, 1998). L'identification des sous-unités Cav3 était effectuée suite au criblage *in silico* des séquences ayant une homologie avec les canaux calciques pour déterminer des étiquettes de transcrits (EST) codant pour des protéines ayant homologie avec les CCVD. Ainsi, ces EST ont permis d'identifier les trois isoformes des CCTT (Cav3.1, Cav3.2, Cav3.3) grâce à la technique de clonage d'ADN complémentaires (ADNc) chez le rat et chez l'homme (Perez-Reyes *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999a; Monteil *et al.*, 2000a). De plus, les études ont montré l'existence de plusieurs variants des CCTT résultants du phénomène d'épissage différentiel (Monteil *et al.*, 2000a; Chemin *et al.*, 2001; Murbartian *et al.*, 2002)

### **b. Propriétés et caractéristiques biophysiques des canaux calciques de type T**

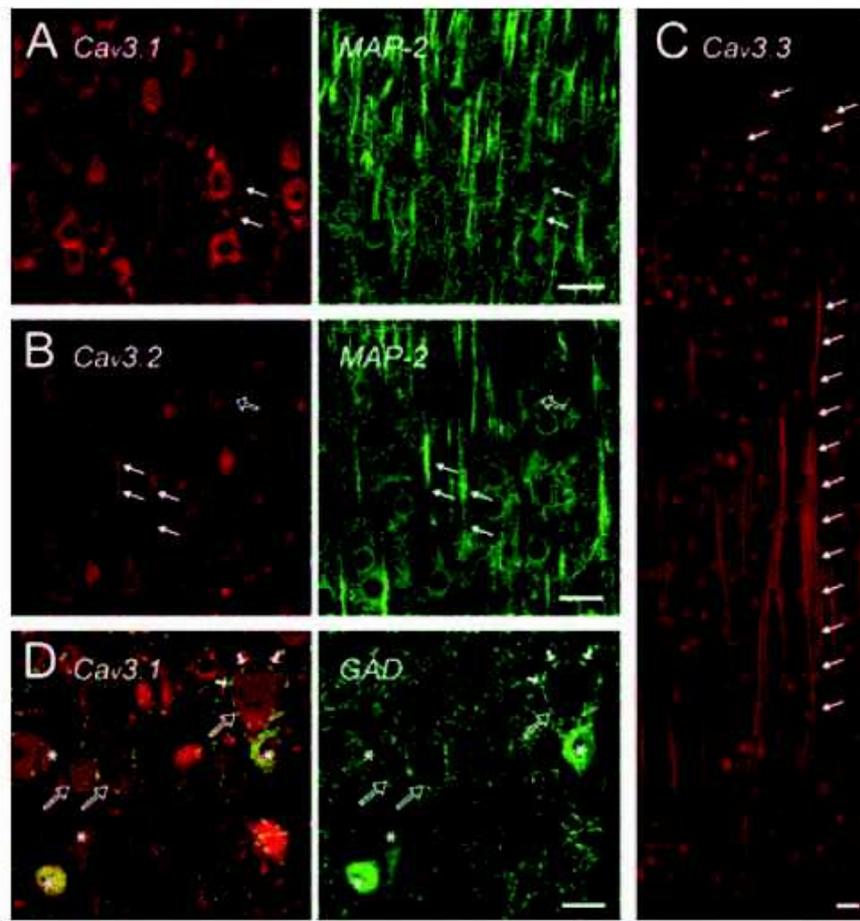
Les CCTT possèdent des propriétés électrophysiologiques différentes des canaux HVA. Contrairement à ces derniers, les canaux T sont activés à des faibles dépolarisations membranaires proches du potentiel de repos et présentent une désactivation lente et une faible sensibilité aux DHP. Ces canaux génèrent des courants transitoires et rapidement inactivés ainsi qu'un courant de queue après dépolarisation. De plus, les CCTT sont fortement plus sensibles au Nickel ( $\text{Ni}^+$ ) que les HVA avec une affinité plus importante pour l'isoforme Cav3.2 que pour Cav3.1 et Cav3.3 (Lee *et al.*, 1999b; Traboulsie *et al.*, 2006). Les canaux T présentent un rapport de perméation  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$  plus important par rapport aux HVA (1 contre 0.5 pour les HVA). Une autre particularité importante des canaux de type T est le chevauchement partiel des propriétés

d'activation et d'inactivation entre -70 et -50 mV ; un phénomène connu sous le nom de « courant fenêtre » (Monteil *et al.*, 2000a). Dans cette fenêtre comprenant le potentiel de repos, Il existe en permanence une fraction des canaux T activables d'où la possibilité qu'un influx de calcium de faible amplitude s'installe, contribuant ainsi à un rôle physiologique important lié à l'automatisme cardiaque (Chemin *et al.*, 2000; Mangoni *et al.*, 2008) (Fig. 3)



### c. Distribution et régulation des canaux calcique de type T

Les différentes approches moléculaires ont montré que les CCTT sont exprimés dans plusieurs organes et sont impliqués dans différents processus physiologiques. Monteil et al. ont étudié le profil d'expression des canaux T par technique de Northern blot et ont montré que les trois isoformes sont fortement exprimés au niveau du système nerveux central (SNC) avec une distribution et degré d'expression qui varient selon l'isoforme (Monteil *et al.*, 2000a). Une étude détaillée de l'expression des canaux T au niveau du SNC par hybridation *in situ* a montré que les Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3 sont exprimés de façon importante dans certaines structures telles que les neurones pyramidaux de l'hippocampe et les cellules granulaires du bulbe olfactif (Talley *et al.*, 1999). D'autres structures expriment soit Cav3.1 et Cav3.3 telles que le cervelet et l'olive inférieure ou Cav3.2 et Cav3.3 comme le noyau rético-thalamique. Entre outre, l'utilisation des anticorps polyclonaux spécifiques des CCTT indique que l'isoforme Cav3.1 est fortement présent dans le corps cellulaire alors que l'isoforme Cav3.3 est exprimé aussi bien dans le corps cellulaire que dans les parties proximales et distales de l'arbre dendritique des cellules pyramidales du néocortex (Fig. 4) (McKay *et al.*, 2006). Les études électrophysiologiques ont montré que contrairement au SNC, les tissus périphériques expriment uniquement Cav3.1 et Cav3.2 qui sont retrouvés au niveau du cœur, tissus musculaires lisses ou encore au niveau du poumon. Cav3.1 est exprimé de façon importante au niveau du cœur, du placenta et plus particulièrement au niveau des tissus fœtaux (Monteil *et al.*, 2000a) alors que Cav3.2 se trouve au niveau du rein et des tissus sécréteurs (Cribbs *et al.*, 1998). En plus de leur distribution ubiquitaire dans l'organisme, les CCTT sont modulés par de nombreux ligands endogènes et seconds messagers.



**Figure 4: Distribution subcellulaire des isoformes Cav3 dans le néocortex**

Le Marquage rouge indique les isoformes des canaux Cav3 (A-D) et le marquage vert indique la MAP-2 (A-B) et GAD (D). (A) L'isoforme Cav3.1 est limitée principalement au soma. (B) l'isoforme Cav3.2 est localisée au niveau du soma des cellules pyramidales, et s'étendent plus loin dans mes dendrites apicales (flèches pleines). (C) L'isoforme Cav3.3 est localisé dans le corps cellulaire, les dendrites apicales (colonne de flèches). Il est présent dans toutes les couches du cortex. D'après (McKay *et al.*, 2006).

Les canaux de type T sont inhibés par les cations divalents tels que le Zinc et le cuivre. Le Zinc ( $Zn^{2+}$ ) est impliqué dans de nombreux processus physiologiques en tant que molécule de signalisation ou encore comme élément structurel de plusieurs protéines (Berg, 1990; Weiss *et al.*, 2000). Les études ont montré que le zinc module les trois isoformes des CCTT avec une inhibition préférentielle du canal Cav3.2 (Traboulsie *et al.*, 2007). Tout comme le nickel (Nosal *et al.*, 2013), le zinc inhibe les canaux T en se fixant sur le résidu H191 (Nelson *et al.*, 2007), ce qui suggère l'importance de ce site dans la modulation des CCTT. Récemment, il a été montré que les CCTT sont bloqués par l'anandamide, agoniste endogène des récepteurs

cannabinoïdes, à des concentrations submicromolaires. Pour produire son effet, l'activation des récepteurs cannabinoïdes n'est pas nécessaire mais en revanche l'anandamide doit pénétrer à l'intérieur de la cellule. Il se fixe sur le canal dans l'état inactivé et le stabilise dans cet état (Chemin et al. 2001). En plus de ces modulateurs, plusieurs études ont montré que les canaux T sont modulés par nombreux récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) tels que la sérotonine, CAMKII, le récepteur muscarinique M1, le récepteur à la corticotropine (CRFR1) et l'angiotensine (Iftinca, 2011). Dans leur étude, Welsby et al. montrent que l'activation des protéines kinase II dépendants de la calmoduline (CaMKII) module l'activité du canal  $\text{Ca}_v3.2$  via le résidu Ser1198 situé au niveau de la loop II–III qui est unique aux canaux  $\alpha_{1H}$  (Welsby *et al.*, 2003). De même, l'activation du récepteur à la corticotropine inhibe le courant  $\text{Ca}_v3.2$  par la voie  $\text{G}\beta\gamma$  (Wolfe *et al.*, 2003). De plus, Hildebrand et al. ont également montré que l'activation du récepteur muscarinique M1 inhibe le courant  $\text{Ca}_v3.3$  via la voie  $\text{G}\alpha_q/\alpha_{11}$  (Hildebrand *et al.*, 2007). L'activité des CCTT peut être également modulée par les facteurs redox. La L-cystéine active l'augmentation de l'excitabilité des neurones nociceptifs en réduisant les courants calcique de type T. Cette modulation redox se produit de manière sélective chez les canaux  $\text{Ca}_v3.2$  (Todorovic *et al.*, 2001).

L'expression des canaux calciques dans plusieurs organes et tissus ainsi que leur régulation par une série de modulateurs endogènes suggère leur rôle important dans nombreux processus physiologiques comme la neurotransmission, la sécrétion, la contraction musculaire, la prolifération ainsi que pathologiques comme l'épilepsie. De ce fait, l'étude de ces canaux présente un enjeu actuel.

#### **d. Pharmacologie des canaux calciques de type T**

L'inhibition des CCTT joue un rôle important dans l'effet thérapeutique de nombreux médicaments (Lory *et al.*, 2007). Ainsi, les bloqueurs pharmacologiques qui modulent sélectivement les CCTT suscitent un intérêt considérable pour l'étude et la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques ciblant les canaux T. Le nickel a été proposé comme un inhibiteur sélectif des CCTT (Lee *et al.*, 1999b; Obejero-Paz *et al.*, 2008). A travers leur étude, Nosal et al. ont montré que l'inhibition des CCTT par le  $\text{Ni}^{2+}$  se fait via des résidus d'histidine 191 (H191) situés au niveau du domaine extracellulaire IS3-IS4 du canal  $\text{Ca}_v3.2$ . En l'absence des ions  $\text{Ni}^{2+}$ , les sites H191 peuvent être occupés par des cations divalents ce qui influence la perméabilité du canal (Nosal *et al.*, 2013). Cependant, des études menées sur des canaux HVA ont indiqué que certains sous-types, tels que  $\text{Ca}_v2.3$ , sont également bloqués par de faibles concentrations de  $\text{Ni}^{+2}$  (Perez-Reyes, 2003).

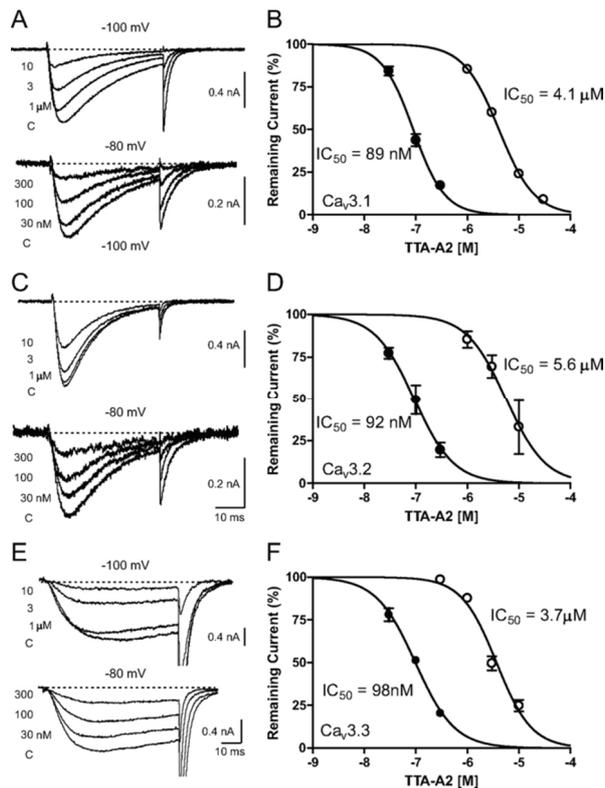
Mibéfradil a été le premier bloqueur sélectif des canaux T approuvé pour une utilisation clinique. Il a été indiqué dans le traitement de l'hypertension et a été présenté comme un bloqueur sélectifs des canaux T (Clozel et al., 1997) vu qu'il bloque 10 à 30 fois mieux les canaux T par rapport aux CCTL avec une  $IC_{50}$  estimée à 1.5  $\mu$ M chez les courants T natives (Martin et al., 2000). Cette grande sélectivité du Mibéfradil pour les canaux T natives peut être expliquée par le faite que le mibéfradil présente une meilleur affinité pour les canaux à l'état inactivé (McDonough *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2000). De ce fait, il module les canaux T qui sont préférentiellement dans l'état inactivé à des potentiels proches du potentiel de repos (-70 mV), alors que les canaux HVA ont besoin d'une forte dépolarisation pour s'inactiver. Cependant plusieurs travaux ont montré qu'en plus des canaux HVA (Mehrke *et al.*, 1994; Moosmang *et al.*, 2006), Mibéfradil bloque également les canaux potassiques dépendants du voltage (Liu et al., 1999), les canaux potassiques activés par l'ATP (Gomora et al., 1999), les canaux sodium (Eller *et al.*, 2000; McNulty *et al.*, 2004), et les canaux calciques plasmiques SOC (Store-operated calcium channels) (Gackiere *et al.*, 2006). En Juin 1998, Roche a annoncé le retrait volontaire du médicament du marché, un an après son approbation par la FDA, en raison d'interactions médicamenteuses, dont certaines sont mortelles.

Plusieurs autres médicaments exercent leur effet thérapeutique à travers l'inhibition des CCTT. Gomora et al. ont démontré que l'inhibition des CCTT peut expliquer l'utilité thérapeutique des antiépileptiques de la famille des succinimides (Gomora *et al.*, 2001) comme l'Ethosuximide (Matthews *et al.*, 2001). D'autres médicaments qui inhibent l'activité des canaux T sont présents dans le marché, à citer l'antihypertenseur amiloride (Tang *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 2004) , les médicaments antipsychotiques ou neuroleptiques comme le pimozide et le penfluridole (Santi et al., 2002) dont le plus puissant est le penfluridole qui inhibe les canaux T à une  $IC_{50}$  estimée à 224 nM (Enyeart *et al.*, 1992), ou encore les médicaments anesthésiques à citer l'isoflurane, l'halothane et l'oxyde nitrique (NO), qui bloquent non sélectivement les CCTT au niveau du ganglion de la racine dorsale (DRG) à des concentrations thérapeutiques (Todorovic *et al.*, 1998; Todorovic *et al.*, 2000; Perez-Reyes, 2003).

Depuis quelques années, des études intensives étaient menées dans le but de synthétiser des molécules sélectives des canaux de type T en se basant sur les parties pharmacologiquement actives (pharmacophores) des bloqueurs déjà existants. Il a fallu plus de 24 ans pour développer une nouvelle génération d'inhibiteurs sélectifs des CCTT (Shipe *et al.*, 2008) qui pourraient surmonter la faible sélectivité des médicaments antihypertenseurs (Mibéfradil) (Clozel *et al.*, 1989; Mehrke *et al.*, 1994) et des cations bivalents ( $Ni^{2+}$ ) envers les CCTT.

C'est en 2004 que les chercheurs ont élaboré un nouvel inhibiteur des CCTT sous le nom de NCC 55-0396. NCC 55-0396 est un analogue du Mibéfradil qui présente une sélectivité plus élevée pour les CCTT, qui n'exerce aucun effet sur les HVA même à des concentrations de 100  $\mu\text{M}$  et qui inhibe les canaux T recombinants avec une puissance comparable à celle du mibéfradil ( $\text{IC}_{50}$  de 6,8  $\mu\text{M}$  contre 10,1  $\mu\text{M}$ ). Afin de développer ce produit sélectif aux canaux T, les chercheurs ont formé une nouvelle structure de Mibéfradil non-hydrolysable afin d'empêcher l'hydrolyse intracellulaire du composé qui conduit à la production d'un métabolite actif bloquant les HVA (Huang *et al.*, 2004). Une étude récente a montré que l'inhibition des CCTT par le NCC 55-0396 réduit la prolifération et la mort des cellules cancéreuses dans le cas de leucémie (Huang *et al.*, 2015). Une autre étude a démontré que l'inhibition des CCTT par le NCC 55-0396 diminue la transmission pré- et post-synaptique de l'activité neuronale au niveau du cortex cingulaire antérieur suite à une constriction chronique. Cela conduit à l'atténuation de la douleur neuropathique (Shen *et al.*, 2015).

Ensuite, les laboratoires MERCK ont pu développer d'autres molécules dérivées de la famille des pipéridines (TTA-P : T-Type Antagoniste Piperidine) et des quinazolinones (TTA-Q : T-Type Antagonist Quinazolinone) qui inhibent de façon efficace et sélective les CCTT (Shipe *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Choe *et al.*, 2011). Une troisième famille des bloqueurs des canaux T a été développée suite à la modification de la nature des groupements chimiques associés au motif pipéridine : les TTA-A (T-type Antagoniste pyridyl Amide) (Reger *et al.*, 2011). Kraus et ses collaborateurs ont montré que les TTA-A bloquent les canaux de type T préférentiellement dans l'état inactivé avec une  $\text{IC}_{50}$  estimée à 21,5 nM pour le TTA-A1 et de 94 nM pour le TTA-A2 sur l'isoforme Cav3.3 à un potentiel test de -100 mV (Fig. 5) (Kraus *et al.*, 2010). François *et al.* suggèrent que l'inhibition des CCTT par le TTA-A2 confère les propriétés analgésiques dans la douleur (Francois *et al.*, 2013).



**Figure 5: Effet du TTA-A2 sur les courants calciques de type T.**

**(A-B)** Effet du TTA-A2 sur l'isoforme Cav3.1. **(C-D)** Effet du TTA-A2 sur l'isoforme Cav3.2. **(E-F)** Effet du TTA-A2 sur l'isoforme Cav3.3. D'après (Kraus et al., 2010)

Plus récemment, Abbvie ont développé l'ABT-639 comme un inhibiteur périphérique qui inhibe les CCTT de manière sélective et dépendante à la concentration. Les études précliniques ont montré que l'administration orale de l'ABT-639 est responsable des effets analgésiques dans la douleur neuropathique (Jarvis et al., 2014). Toutefois, Des études cliniques en phase II utilisant la microneurographie ; une technique d'enregistrement électrophysiologique qui évalue l'activité spontanée anormale dans les fibres nociceptives périphériques, ont révélé que l'administration de l'ABT-639 à une dose de 100 mg deux fois par jour, n'a pas réduit la douleur neuropathique chez les patients diabétiques (Serra et al., 2015; Ziegler et al., 2015). Contrairement à l'ABT-639, le Z944, un bloqueur sélectif puissant des CCTT (50-160 nM) a montré son efficacité dans le soulagement de la douleur chez le rat ainsi que chez l'homme (Lee, 2014a).

Des études récentes ont rapporté que les CCTT sont une cible moléculaire intéressante pour différentes substances organiques comme les toxines et les produits naturels. En 1998, des chercheurs ont identifié une nouvelle molécule qui inhibe efficacement les CCTT chez les ovocytes du xénope. Il s'agit de la kurtoxine, un peptide isolé du venin du scorpion *Parabuthus*

*transvaalicus* qui réduit à 85% les courants des isoformes Cav3.1 et Cav3.2 avec des concentrations estimées à 350 nM (Chuang *et al.*, 1998). La kurtoxine inhibe les CCTT en modifiant les propriétés de leur déclenchement. Cette conclusion est renforcée par l'homologie de la séquence entre la kurtoxine et les toxines  $\alpha$ -scorpion, un groupe de toxines largement étudié pour sa modification des propriétés de déclenchement des canaux sodium (Meves *et al.*, 1986). Une étude plus récente sur les neurones centraux et périphériques du rat a montré que la kurtoxine est moins sélective que prévu en raison du blocage des CCTL et CCTN (Sidach *et al.*, 2002). De plus, les CCTT représentent une cible importante pour plusieurs produits naturels y compris l'harmaline (Spletstoesser *et al.*, 2005), le Curcuma, le Syzium (Enyeart *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2013) et le cannabis (Ross *et al.*, 2008). Ceci est développé dans la partie: Modulation des CCVD par les plantes médicinales.

#### **e. Rôles physiopathologiques des canaux calciques de type T**

Les CCTT ont gagné, 15 ans après leur clonage, un immense intérêt en tant que nouveaux acteurs de nombreuses fonctions cellulaires. Les CCTT sont exprimés dans des cellules excitables et même dans les cellules non excitables. La dépendance au voltage lors des phénomènes d'activation et d'inactivation confère aux canaux de type T des propriétés uniques dans une multitude de processus physiologiques (Nilius *et al.*, 2014).

Le potentiel de membrane au repos d'un neurone est compris entre -90 et -70 mV. Ceci permet aux CCTT de jouer un rôle dans l'activité répétitive de type stimulateur cardiaque (pacemaker) en contrôlant l'activité des canaux sodiques et calciques dans cette gamme de potentiel proche du potentiel de repos membranaire (Nilius, 1986; Hagiwara *et al.*, 1988). Plusieurs études ont montré que les CCTT sont impliqués dans la génération des décharges en bouffées en réponse à des dépolarisations pointes-ondes (DPO) (Destexhe *et al.*, 1998; Molineux *et al.*, 2006; Cain *et al.*, 2010). Les DPO sont souvent observés après une hyperpolarisation déclenchée par un potentiel postsynaptique inhibiteur (PPSI). Une fois entré au milieu intracellulaire, le calcium active les canaux potassiques activés par le calcium qui représentent des facteurs importants dans la repolarisation et l'hyperpolarisation après un potentiel d'action (Llinas *et al.*, 1981; Beurrier *et al.*, 1999). De plus, la régulation du phénomène de la décharge neuronale par les CCTT, conjointement avec les canaux potassiques SK2 et SERCAs dans les dendrites thalamiques, est essentielle durant le processus du sommeil qui est caractérisé par des activités électriques synchronisées (Lee *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2005; Steriade, 2005; Cueni *et al.*, 2008). D'autres études ont suggéré l'implication des CCTT dans la différenciation musculaire squelettique. Grâce à l'utilisation des bloqueurs pharmacologiques des canaux T ou encore des

séquences antisens spécifiquement dirigées contre l'ARNm de l'isoforme Cav3.2 (alpha1H), Bijlenga et al ont démontré que Cav3.2 est responsable de la fusion des myoblastes humains (Bijlenga *et al.*, 2000). Cette fusion ne résultant pas de l'activation transitoire des CCTT mais plutôt met en jeu le courant de fenêtre ; courant très faible inférieur à 1 pA mais qui permet néanmoins une entrée calcique importante et continue dans une gamme de potentiel physiologiquement importante (Bijlenga et al., 2000). L'ouverture des canaux T en réponse à la dépolarisation membranaire joue un rôle primordial dans la signalisation calcique du spermatozoïde, plus précisément dans la réaction acrosomique du spermatozoïde de certaines espèces ainsi que dans d'autres processus importants comme la motilité et la capacitation (Arnoult *et al.*, 1997; Darszon *et al.*, 2006). De plus, Chemin et al. ont montré que les CCTT sont impliqués dans la prolifération et la différenciation neuronale (Chemin *et al.*, 2002).

L'importance physiologique des processus contrôlés par les CCTT permet de penser qu'ils sont impliqués dans la physiopathologie de certaines maladies. Plusieurs données ont montré leur contribution à de nombreuses pathologies telles que l'arythmie cardiaque et l'autisme (Splawski *et al.*, 2006), la douleur (Todorovic *et al.*, 2011), le cancer (Santoni *et al.*, 2012), l'ischémie (Nikonenko *et al.*, 2005) et l'épilepsie (Heron *et al.*, 2004; Cain *et al.*, 2013; Powell *et al.*, 2014). Les mutations au niveau des canaux Cav3.2 ont également été décrites dans l'autisme aussi connu comme le trouble du spectre de l'autisme (TSA). Six mutations faux-sens liées à l'autisme ont été identifiées au niveau du gène CACNA1H codant pour le canal Cav3.2 (Splawski *et al.*, 2006). Bien qu'il était clair que les mutations identifiées n'étaient pas les seules facteurs responsables du TSA vu que certains individus porteurs des mutations ne sont pas affectés, il a été suggéré que les mutations pourraient contribuer au développement du phénotype de TSA ou d'influencer son expression. Il convient de noter que le tiers des patients à TSA souffrent de crises d'épilepsie (Splawski *et al.*, 2006). Voir la partie « Les canaux calciques de type T dans l'épilepsie ».

## **■ Modulation des canaux calciques de type T par les plantes médicinales**

Les plantes médicinales ont été utilisées depuis l'antiquité comme une source de traitement contre divers problèmes de santé. Des preuves solides provenant de plusieurs sources telles que la littérature archéologique indiquent le lien étroit entre l'homme et sa recherche de médicaments dans la nature (Farnsworth *et al.*, 1985; Petrovska, 2012). Malgré l'utilisation de molécules synthétiques comme agents de guérison, les matières organiques naturelles ont persisté comme le traitement de choix pour un large éventail de problèmes de santé chez de

nombreuses populations à travers le monde (Halberstein, 2005). Selon l'Organisation mondiale de la santé, les plantes médicinales sont utilisées intensivement dans les pays en développement et leur utilisation se développe rapidement, même dans les pays développés. En Chine, les préparations médicinales traditionnelles représentent 30 à 50% de la consommation totale de médicaments et le marché mondial annuel de la médecine à base de plantes est estimé à plus de 60 milliards de dollars (Eddouks *et al.*, 2012).

Grâce à leur capacité à synthétiser un grand nombre de molécules bioactives (des alcaloïdes, des stéroïdes, des terpènes, etc.) soit pour leur développement ou contre des conditions stressantes et menaçantes, les plantes médicinales ont été intensivement étudiées en tant que source intéressante de nouvelles molécules thérapeutiques (Sen *et al.*, 2014). Beaucoup de médicaments disponibles sur le marché ont longtemps étaient utilisés comme remèdes naturels, y compris l'aspirine, la quinine, et l'opium. Par conséquent, l'objectif principal de cette partie est de mettre en évidence l'intérêt des plantes médicinales et de leurs composants comme source intéressante de molécules thérapeutiques modulant les CCTT. Les composants actifs qui ont montré une activité pharmacologique sur les CCTT sont classés par type de structure, à savoir, les alcaloïdes, les phénylpropanoïdes, les curcuminoïdes, les terpènes, et les cannabinoïdes.

### **a. Les alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont un groupe de molécules hétérocycliques à bases azotées souvent d'origine naturelle. Ils sont présents dans une grande variété de plantes à fleurs et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques. En 1804, le premier alcaloïde individuel, la morphine, a été isolée à partir du pavot à opium (*Papaver somniferum*) et utilisé comme un analgésique puissant contre la douleur, ce qui a permis de souligner le rôle important des alcaloïdes dans le domaine des « médicaments chimiques » à partir de la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. La morphine interagit avec les récepteurs opioïdes et produit ainsi un effet sédatif/analgésique par hyperpolarisation des neurones, conduisant à une libération de neurotransmetteurs associés à la transmission de la douleur (Lipp, 1991).

#### **i. Groupe des indoles : Les $\beta$ -carbolines**

L'harmaline, l'harmane et l'harmalol sont les principes actifs présents dans les graines de *Peganum harmala* (Fig. 6), ainsi que dans d'autres plantes médicinales telle que *Banisteriopsis caapi* (Handforth, 2012). Un nombre croissant d'études ont montré la répartition endogène de

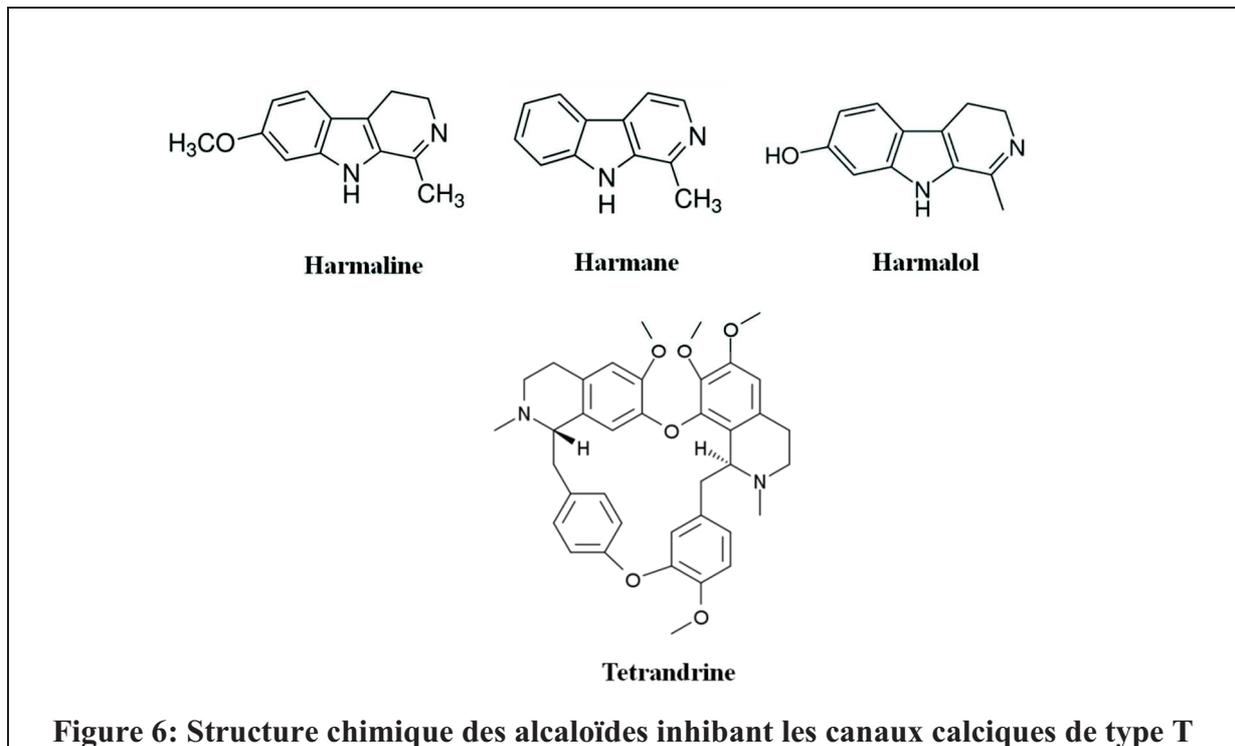
ces alcaloïdes dans les différents tissus de mammifères où ils exercent diverses rôles pharmacologiques (Parker *et al.*, 2004; Miralles *et al.*, 2005; Herraiz *et al.*, 2006b; Herraiz *et al.*, 2006a). Les alcaloïdes de *Peganum harmala* ont été impliqués dans les troubles neurodégénératifs, mais aussi dans des importants processus neuroprotecteurs en raison de leur interaction avec une large gamme de récepteurs et de neurotransmetteurs. Ils interagissent avec les récepteurs GABA (Rommelspacher *et al.*, 1980), activent les récepteurs 5HT<sub>2A</sub> et 5HT<sub>2C</sub> (McCormick *et al.*, 1998), ou encore inhibent l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> et les monoamines oxydases (MAO) (Glennon *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2003; Grella *et al.*, 2003; Herraiz *et al.*, 2010). En outre, des études ont indiqué leur aptitude à moduler les canaux ioniques (I<sub>NA</sub>, I<sub>K</sub>), en particulier les CCDV, sur une large gamme de potentiels et d'une manière dépendante à la concentration. Haraki *et al.* ont montré que l'efficacité de *P. harmala* dans le traitement de la colique est due à son effet antispasmodique lié à l'inhibition des canaux calciques intestinaux par les alcaloïdes de *P. harmala* particulièrement l'harmaline (Karaki *et al.*, 1986). Dans le SNC, l'harmaline inhibe les HVA (I<sub>Ca,L</sub>, I<sub>Ca,N</sub>) et les CCTT natifs exprimés dans les DRG (Spletstoesser *et al.*, 2005) et les neurones de l'olive inférieure (Park *et al.*, 2010b; Zhan *et al.*, 2012), ce qui suggère que les canaux calciques, et plus précisément les CCTT, sont une cible moléculaire intéressante dans les processus neuroprotecteurs des β-carbolines. Des études électrophysiologiques approfondies sur l'effet du *Peganum harmala* et de son principe actif l'harmaline ont été menées par notre équipe. (Voir partie résultats).

## ii. Groupe des bisbenzylisoquinolines

Les alcaloïdes bis-benzylisoquinoléines (BBA) représentent un groupe de produits naturels distribués dans une grande variété de plantes, y compris les ménispermacées, les berbéridacées et les lauracées (Schiff, 1991).

La tétrandrine est un BBA isolé de la plante médicinale chinoise *Stephania tetrandra* (Zhang *et al.*, 2009) et qui est utilisé comme un remède pour divers problèmes de santé, y compris l'arythmie cardiaque et l'hypertension (Liu *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995). La tétrandrine agit comme inhibiteur calcique dans plusieurs types cellulaires y compris les cellules du neuroblastome, les terminaisons nerveuses de la neurohypophyse, les artères mésentériques ou encore les cellules cardiaques, ayant ainsi des effets anti-hypertenseurs, anti-arythmiques et anti-ischémiques (Liu *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995). La tétrandrine inhibe les CCDV et augmente le calcium intracellulaire en bloquant les pompes endoplasmiques et d'autres pompes dépendantes du calcium (Bickmeyer *et al.*, 1998). King *et al.* ont montré que la tétrandrine bloque l'activité des CCTL en interagissant avec leur site de fixation localisé au niveau du

récepteur benzodiazépine de la sous-unité alpha-1 des CCTL (King *et al.*, 1988). La tétrandrine inhibe également les CCTN neuronaux (Wiegand *et al.*, 1990) et les CCTT (Liu *et al.*, 1992; Rossier *et al.*, 1993) dans différents types cellulaires avec des  $IC_{50}$  estimée à 4-20  $\mu$ M, ce qui indique un large spectre non-sélectif d'inhibition des canaux calciques par la tétrandrine (Kwan *et al.*, 2002).

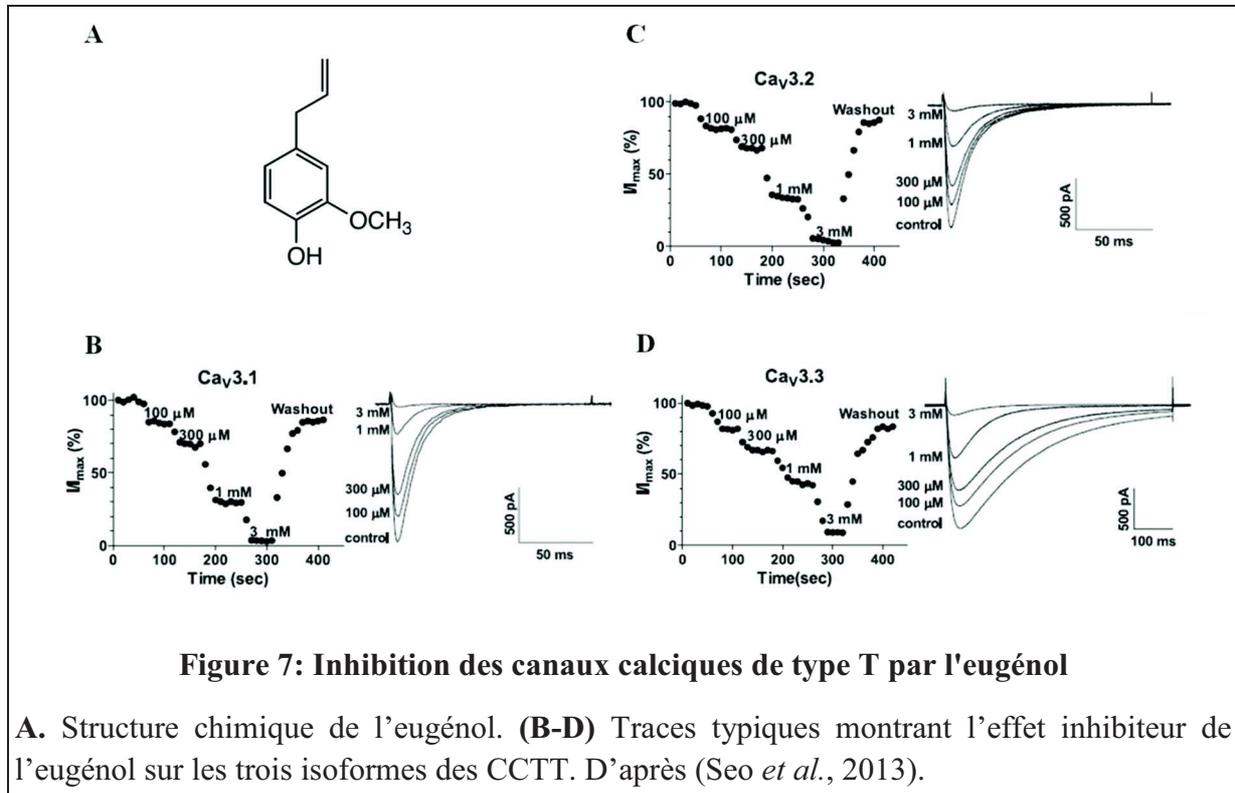


## b. Les phénylpropanoïdes

### i. L'eugénol

L'eugénol est un membre de la classe des phénylpropanoïdes. Il se produit naturellement dans une variété de plantes médicinales telles que le basilic, la cannelle et la muscade. Il est principalement extrait des plantes *Eugenia aromatica* et *Eugenia caryophyllata* (Clous de girofles). En plus de son utilisation dans les préparations culinaires et dans l'aromathérapie, l'eugénol est utilisé comme produit analgésique contre les douleurs dentaires (Markowitz *et al.*, 1992). Des études menées pour découvrir les mécanismes impliqués dans les propriétés analgésiques de l'eugénol ont révélé que cette molécule inhibe les CCDV exprimés dans les neurones du ganglion trijumeau (TG), connus comme des capteurs de la douleur/nocicepteurs dentaire. L'eugénol inhibe les canaux HVA et LVA à des  $IC_{50}$  estimée à 1 mM et 500  $\mu$ M, respectivement, ce qui suggère que l'eugénol inhibe plus efficacement les CCTT par rapport aux canaux HVA (Fig. 7). L'eugénol modifie les propriétés biophysiques des CCDV en

déplaçant la courbe d'inactivation à des potentiels plus négatifs ce qui pourrait suggérer que l'eugénol se lie aux CCDV stabilisés dans l'état inactif et inhibe la formation des potentiels d'action et la conduction neuronale des signaux sensoriels dans les neurones TG, conduisant à un effet analgésique (Lee *et al.*, 2005; Seo *et al.*, 2013).

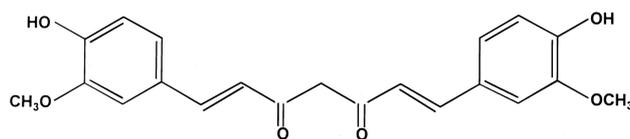


## c. Les curcuminoïdes

### i. La curcumine

La curcumine est le composé actif majeur de *Curcuma longa*, une plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle (Fig. 8). La curcumine est intensivement étudiée pour ses vertus thérapeutiques contre le cancer, les troubles cognitifs et l'épilepsie (Schaffer *et al.*, 2011; Orellana-Paucar *et al.*, 2012; Nam *et al.*, 2014). La curcumine module un large éventail de canaux et transporteurs ioniques, y compris les canaux chlorure CFTR (Bernard *et al.*, 2009) et les canaux potassiques hERG (Hu *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013). Les CCDV ont été identifiés comme une cible moléculaire intéressante pour la curcumine. Elle inhibe les canaux HVA natifs exprimés au niveau des neurones de l'hippocampe du rat via une nouvelle voie dépendante de la protéine kinase C-thêta. La diminution de la concentration du calcium intracellulaire en réponse à l'inhibition des CCTL par la curcumine pourrait contribuer à son effet neuroprotecteur contre la mort des cellules nerveuses (Liu *et al.*, 2013). En outre, l'inhibition

des courants calciques présynaptiques de type P/Q (Cav2.1) et N (Cav2.2) contribue à la diminution de la libération du glutamate dans les terminaisons nerveuses du cortex préfrontal chez le rat, ce qui suggère un mécanisme intéressant dans les effets antidépresseurs et anticonvulsivants de la curcumine (Lin *et al.*, 2011). En plus des HVA, Enyeart et al. montrent que la curcumine inhibe les CCTT d'une manière dépendante à la concentration. 20  $\mu$ M de curcumine diminuent de 53,3% les courants de l'isoforme Cav3.2. Cette inhibition conduit à la diminution de la sécrétion du cortisol stimulé par l'adrénocorticotrophine (ACTH) et l'angiotensine II (AngII). Ces résultats suggèrent que la curcumine peut inhiber la sécrétion stimulée par ces deux hormones à travers un mécanisme commun. Elle pourrait donc être utile dans le traitement des troubles de la sécrétion de corticostéroïdes, y compris le syndrome de Cushing caractérisé par un hypercorticisme chronique (Enyeart *et al.*, 2009).



**Figure 8: Structure chimique de la curcumine, l'un des composés majeurs de la classe des curcuminoïdes**

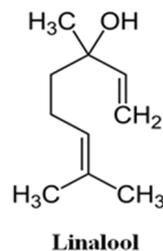
#### **d. Les terpènes**

Les terpènes constituent une classe de produits organiques naturels très abondants dans les plantes médicinales. Les terpènes et les terpénoïdes sont les principaux constituants des huiles essentielles largement utilisés dans la gastronomie, l'aromathérapie et la médecine traditionnelle et moderne.

##### **i. Le Linalol**

Le linalol est un monoterpénoïde qui se produit naturellement dans plusieurs plantes à fleurs, en particulier chez la vraie lavande « *Lavandula angustifolia* » (Fig. 9). Plusieurs études ont signalé les propriétés sédatives et anticonvulsivantes du linalol (Linck et al., 2009; Linck et al., 2010). Il module l'activation du glutamate en réponse à la modulation des récepteurs NMDA dans le cortex cérébral (Elisabetsky et al., 1999) et réduit la libération de l'Acétylcholine (ACh) au niveau de la jonction neuromusculaire chez la souris suite à la modification de la cinétique des récepteurs nicotiques (Re et al., 2000). D'autres études menées pour déterminer les mécanismes moléculaires associés aux propriétés pharmacologiques du linalol montrent une

modulation des CCDV. La technique d'imagerie calcique à base du calcium-Fura-2 a été utilisée pour tester l'effet du linalol sur les cellules réceptrices olfactives (ORC) du triton exprimant à la fois les courants calciques de type L et les CCTT. Le linalol bloque de façon réversible les courants calciques au niveau des ORC avec une inhibition de  $44,9 \pm 2,6$  % (KCl élevé contenant 3 mM de linalol) (Narusuye *et al.*, 2005). De même, Schuwald et al. montrent une diminution de l'influx du calcium induit par le  $KCl^+$  dans les synaptosomes de souris après traitement avec le linalol et l'acétate de linalyle (1  $\mu M$ ). Ces résultats suggèrent que le linalol dispose des propriétés anxiolytiques considérables via la modulation des CCVD. (Schuwald *et al.*, 2013). Des études électrophysiologiques évaluant l'effet de la lavande et de son principe actif linalol ont été menées par notre équipe (Voir partie résultats, article : « Modulation of T-type  $Ca^{2+}$  Channels by Lavender and Rosemary extracts »).

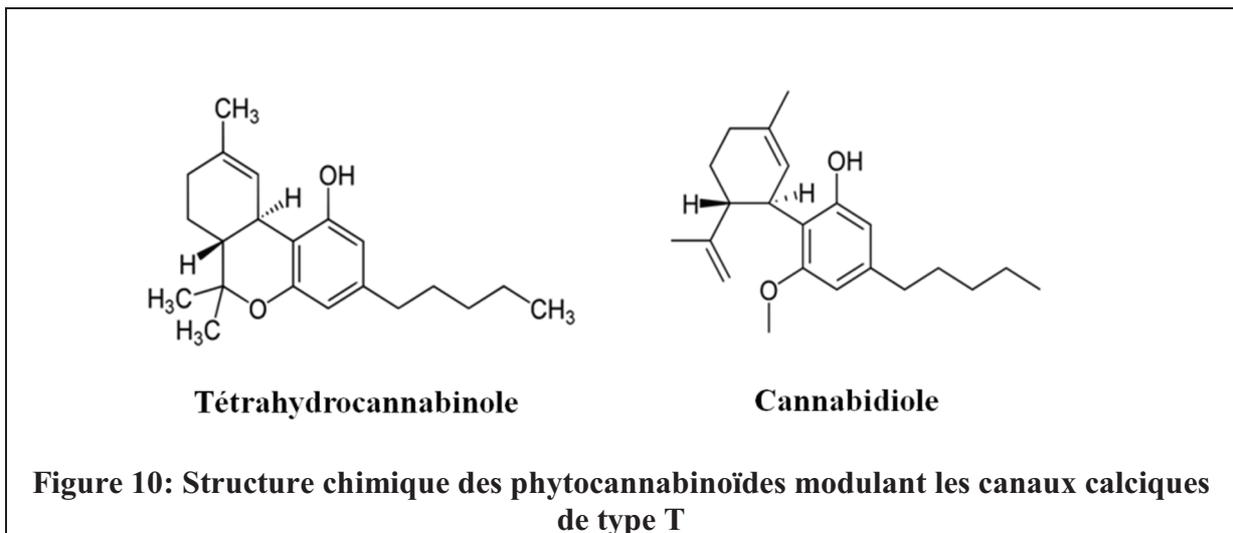


**Figure 9: Structure chimique du Linalol**

### e. Les cannabinoïdes

Les extraits de cannabis (Cannabaceae) ont été utilisés socialement et thérapeutiquement depuis l'Égypte ancienne. Le tétrahydrocannabinol et le cannabidiol représentent les principes actifs de la plante *Cannabis sativa* (Fig. 10). Les phytocannabinoïdes imitent l'activité des endocannabinoïdes ; des cannabinoïdes endogènes impliqués dans une multitude de rôles biologiques y compris le traitement des signaux neuronaux pour la mémoire, l'humeur et les fonctions cognitives supérieures. Ces effets sont liés à la modulation des récepteurs cannabinoïdes (CB) qui appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (Matsuda *et al.*, 1990). Selon Twitchell et al, les CCTPQ et les CCTN exprimés dans l'hippocampe en culture néonatale, sont inhibés par les cannabinoïdes à des concentrations submicromolaires ( $EC_{50} \sim 20$  nM). Ces résultats suggèrent que l'inhibition des canaux HVA par les cannabinoïdes, exprimés dans la région présynaptique (Rieckhof *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2005) réduit la libération de neurotransmetteurs des récepteurs cannabinoïdes de type CB1.

Les canaux LVA représentent une cible additionnelle des phytocannabinoïdes. Ross et al. ont étudié les effets du tétrahydrocannabinol et du cannabidiol sur les CCTT. L'étude montre que les deux composés naturels inhibent les canaux T recombinants et natifs isolés à partir de neurones TG. L'IC<sub>50</sub> est de 1 μM à ~ -86 mV et de ~ 100 nM à -70 mV (Ross *et al.*, 2008). L'inhibition repose sur le transfert de l'état d'équilibre d'inactivation des canaux T à des potentiels plus négatifs. Cette étude confirme les données antérieures revendiquant l'inhibition des CCTT dans les cellules NG-108 par le tétrahydrocannabinol (Caulfield *et al.*, 1992). Il est intéressant de noter que le cannabidiol est actuellement en cours de développement en tant que médicament antiépileptique (Bialer et al., 2015). Il est probable que l'activation des récepteurs CB, l'atténuation de la conductance des canaux calciques, en particulier les canaux T ainsi que la stimulation des canaux potassiques (canaux potassiques de la rectification rentrante Kir, K2P...), entraînent une diminution importante de la libération de neurotransmetteurs et une réduction de la durée du potentiel d'action. ce qui contribuent aux effets psychoactifs bien connus des cannabinoïdes, et aux propriétés anti-nociceptives et anticonvulsivantes (Hosking et al., 2008; Ross et al., 2008; Hill et al., 2013; Bialer et al., 2015).



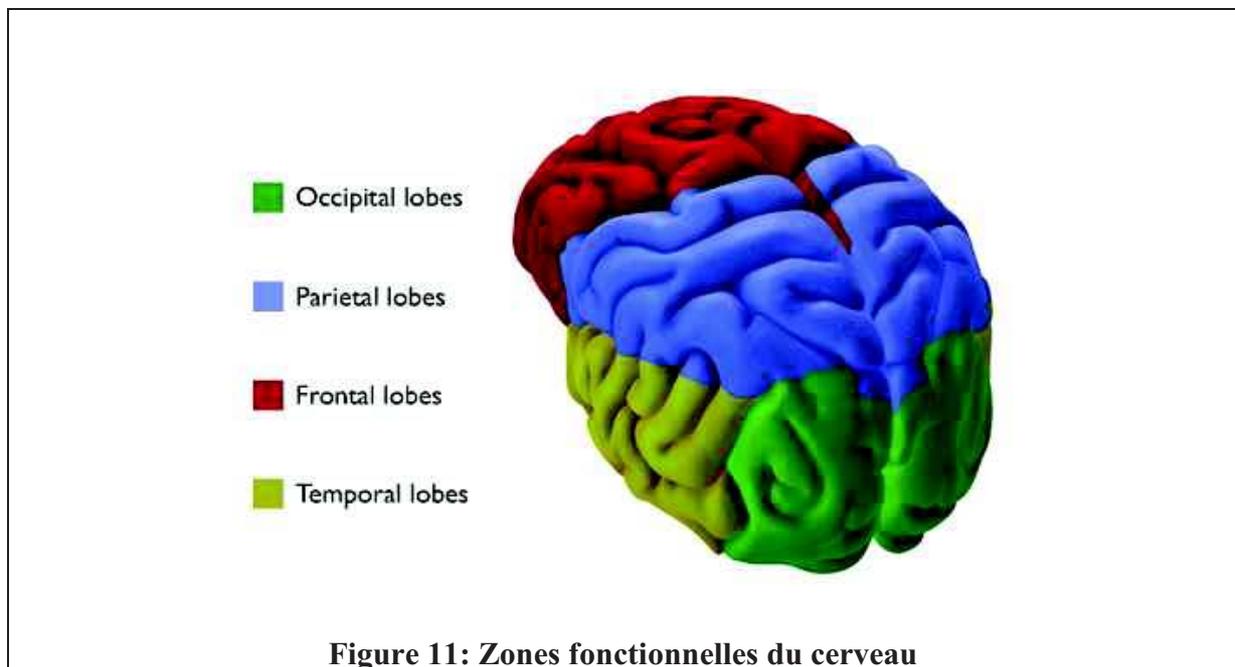
L'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire est considérée comme un facteur important pour le développement de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Ainsi, l'inhibition des canaux calciques est considérée parmi les stratégies thérapeutiques les plus intéressantes. Ces études ont fourni des preuves importantes sur le pouvoir des plantes médicinales dans la modulation des CCDV, en particulier les CCTT, et donc, représentent un outil puissant pour l'étude des canaux calciques ainsi qu'une source importante de molécules thérapeutiques.

## D. Les épilepsies

### a. Introduction générale

L'épilepsie, aussi appelée mal comitial, est une maladie chronique qui touche plus de 70 millions de personnes dans le monde (Harries *et al.*, 2010; Ngugi *et al.*, 2010), ce qui en fait l'une des affections les plus communes qui touchent le SNC (Kramer *et al.*, 2012). Elle s'exprime sous la forme d'une activité neuronale paroxysmique récurrente liée à un dysfonctionnement d'une ou plusieurs régions du cerveau, causée par des décharges neuronales anormales, excessives et hypersynchrones. Les manifestations de cette maladie sont très variées. Malgré les grands progrès accomplis, les causes de crises épileptiques restent encore souvent mystérieuses.

Les crises d'épilepsie se manifestent par des signes visibles (motrices). Les plus connues sont les convulsions de type tonico-clonique dite aussi « grand mal » (Voir type de crises d'épilepsie), mais peuvent se traduire par des perturbations comportementales plus discrètes (ex : Crises absence). Les patients développent des manifestations particulières selon les zones fonctionnelles du cerveau atteintes (Fig. 11).



**Figure 11: Zones fonctionnelles du cerveau**

Les crises épileptiques et les épilepsies peuvent être contrôlées avec succès chez beaucoup de patients grâce à l'administration des médicaments antiépileptiques (MAE). Malheureusement, 25-30% de cette population souffrant des épilepsies de type « grand mal » (Epilepsie du lobe temporal) ne répond pas aux traitements actuels et présentent donc une pharmaco-résistance

(Remy *et al.*, 2006). De ce groupe, seulement 25% des patients peuvent subir une intervention chirurgicale et seulement 45-75% des personnes ayant subi la chirurgie mènent une vie sans crises d'épilepsie (Kotagal, 2011).

Dans les zones en développement, en particulier l'Afrique, la prévalence de l'épilepsie est élevée, elle est en moyenne de 15 personnes épileptiques pour 1000 personnes (Moshi *et al.*, 2005). Au Maroc, les personnes épileptiques représentent 1% de la population marocaine. On en compte plus que 300.000 personnes dans le royaume.

L'épilepsie a été attribuée depuis longtemps à la possession par des esprits maléfiques et est considérée comme une maladie hautement contagieuse. Malheureusement, le lexique pour désigner les épileptiques est très riche, toujours péjoratif, et renvoie à des clichés qui demeurent tenaces malgré le progrès de la médecine, déplore la Ligue marocaine contre l'épilepsie (LMCE), association créée en 1987 par quelques médecins (neurologues, pédiatres et psychiatres), pour sensibiliser l'opinion publique sur la maladie, mais aussi, et surtout, pour contrer les préjugés qui l'entourent.

La majorité de ces patients dans les pays en développement comptent sur le traitement accordé par les guérisseurs traditionnels dont beaucoup peuvent présenter un compte rendu exact des symptômes de la maladie, y compris les étourdissements, la perte de conscience, la chute brutale, l'écume de la bouche, la perte de mémoire, la morsure de la langue, de la confusion et l'agitation (Moshi *et al.*, 2005).

Les personnes épileptiques peuvent mener une vie normale. Cependant, ils présentent des risques accrus de blessures lors des crises épileptiques ou de mort vu que les études ont montré que l'épilepsie peut conduire à un comportement suicidaire. La mort soudaine inattendue dans l'épilepsie (MSIE) peut également se produire. Il s'agit de la cause la plus fréquente de la mort chez les personnes atteintes d'épilepsie pharmacorésistante. Les mécanismes exacts de la MSIE restent à découvrir mais les mécanismes potentiels comprennent l'arythmie cardiaque, la cardiomyopathie postcritique, et une insuffisance respiratoire liée à une crise épileptique. Ainsi, le contrôle réussi des crises est la meilleure mesure préventive contre la MSIE (Surges *et al.*, 2012).

## **b. Type de crises**

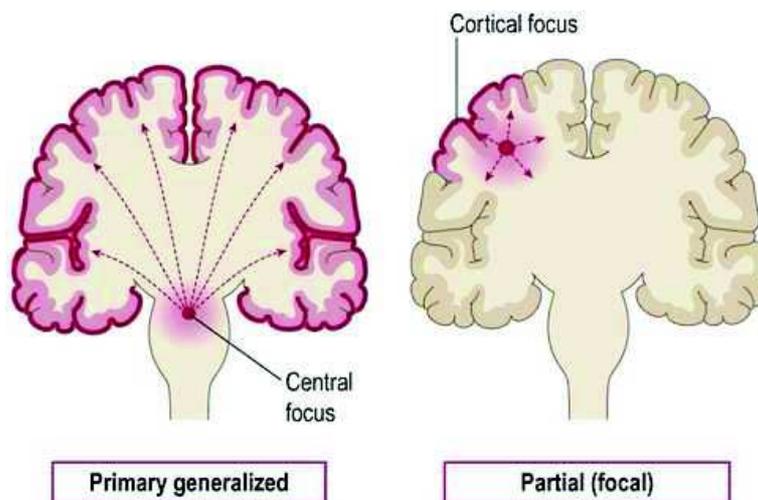
La compréhension de la classification des crises d'épilepsie représente la première étape vers le bon diagnostic, le traitement et le pronostic de la maladie.

En 1981, La Ligue Internationale contre l'épilepsie (ILAE) a établi une classification et une terminologie normalisée pour les crises épileptiques afin que tous les professionnels de la santé parlent le même langage. Il est important de reconnaître que cette classification se basait uniquement sur les constatations des manifestations épileptiques et sur l'électroencéphalographie (EEG). Les premières classifications ont été réalisées selon la classification de la ligue internationale contre l'épilepsie des crises 1981 (ILAE 1981) et des syndromes 1989 (ILAE, 1989). 30 ans depuis lors, les progrès scientifiques et médicaux, en particulier dans l'imagerie cérébrale (aussi dite la neuroimagerie) et la génétique, ont eu un impact majeur sur notre compréhension de l'épilepsie. L'ILAE a reconnu donc le besoin pressant de réformer une nouvelle classification. Depuis, une nouvelle classification a été proposée en 2010. Elle se fait selon le foyer des crises ou selon leur étiologie (Berg et al., 2010). Les épilepsies peuvent être divisées en trois catégories selon que leur étiologie est connue (épilepsie symptomatique), non connue (épilepsie idiopathique) ou bien supposée mais non mise en évidence par les moyens médicaux actuels (épilepsie cryptogénique) (Fig. 12).

<b>idiopathiques</b>	<b>symptomatiques/cryptogéniques</b>
<p>la plupart des épilepsies généralisées primaires, p.ex.:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• épilepsies d'absence</li> <li>• épilepsie myoclonique juvénile</li> <li>• épilepsie grand mal du réveil</li> </ul> <p>quelques épilepsies focales:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• épilepsie rolandique</li> <li>• épilepsie de la lecture</li> </ul>	<p>la plupart des épilepsies focales, ex.:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• épi. après traumatisme obstétrical</li> <li>• épi. en cas de tumeurs au cerveau</li> <li>• épilepsies après des lésions crâniennes graves</li> <li>• épilepsies après apoplexie cérébr.</li> <li>• épilepsies du lobe temporal (p.ex. sclérose hippocampique)</li> <li>• épilepsies du lobe frontal</li> <li>• syndrome de West</li> <li>• syndrome de Lennox-Gastaut</li> </ul>

**Figure 12: Les trois types d'épilepsies divisés selon leur étiologie. D'après la ligue suisse contre l'épilepsie.**

On peut également distinguer deux grandes catégories d'épilepsie selon la localisation du siège initial de la décharge épileptique et de son éventuelle propagation au reste du cortex : les crises généralisées et les crises partielles. Chaque catégorie est subdivisée à plusieurs formes en fonction des symptômes présentés par le patient au cours de la crise épileptique (Fig. 13).

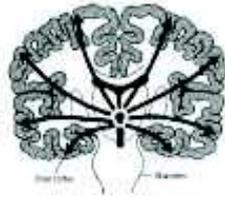


**Figure 13: Types de crises d'épilepsie.**

Les crises généralisées primaires proviennent d'un point central dans la tige du thalamus ou du cerveau et impliquent dès le début les deux hémisphères cérébraux. Les crises partielles (focales) commencent dans une région corticale discrète et sont dues à une anomalie dans les matières grise ou blanche voisines. Une crise focale peut se propager et devenir une crise secondairement généralisée.

#### **i. Crises généralisées**

Les crises généralisées sont caractérisées par une activité électrique synchrone et bilatérale qui se propage dans l'ensemble du cortex cérébral. On distingue deux grandes catégories d'épilepsie généralisées ; Des crises principalement généralisées, c'est-à-dire des décharges qui se développent au niveau des deux hémisphères et se propagent à l'ensemble du cortex dès le départ, et les crises secondairement généralisées, c'est-à-dire des décharges qui se développent au niveau corticale locale et se propagent ultérieurement de façon bilatérale (Fig. 14) (Elger *et al.*, 2008). Les épilepsies généralisées peuvent également être soit d'origine génétique ou structurelle (Infection, encéphalite...).



**Crise généralisée d'emblée :**  
la décharge envahit  
dès l'origine la totalité du cerveau



**Crise secondairement généralisée :**  
la décharge est initiée dans une  
partie du cerveau puis diffuse largement

**Figure 14: Représentation schématique des grandes catégories des crises généralisées**

Les enregistrements EEG montrent une activité cérébrale anormalement synchronisée dans les deux hémisphères dès le départ de la crise. On distingue plusieurs catégories de crises selon les manifestations cliniques observées. Les crises généralisées sont subdivisées en crises convulsives qui sont caractérisées par des contractions des muscles parfois violentes et soutenues et des crises non convulsives qui ne présentent pas d'activité motrice et qui ne sont pas facilement remarquées (Tableau 2) (Berg et al, 2010; Fisher et al. 2014).

**Tableau 2: Nouvelle classification des crises généralisées selon la ligue internationale contre l'épilepsie.**

## **Crises généralisées**

### **Crises tonico-cloniques**

#### **Absence**

- Typique
- Atypique
- Absence avec des caractéristiques particulières
- Absence myoclonique
- Myoclonie oculaire

#### **Crise myoclonique**

- Myoclonie
- Myoclonie atonique
- Myoclonie tonique

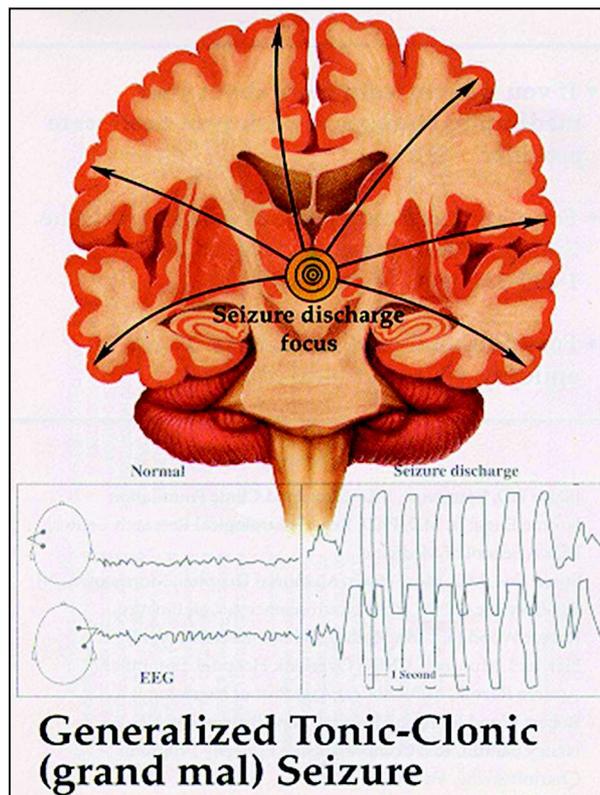
#### **Crise clonique**

#### **Crise tonique**

#### **Crise atonique**

### *1. Crises tonico-cloniques*

Les crises tonico-cloniques (aussi dite grand mal) représentent la forme la plus spectaculaire des crises épileptiques (Fig. 15). Les crises tonico-cloniques peuvent se produire indépendamment ou dépendamment d'autres crises généralisées (Ochs *et al.*, 1984). Dans sa forme classique, cette crise apparaît sous forme d'une séquence d'événements qui commence souvent par des secousses myocloniques bilatérales suivie d'une contraction tonique des extrémités et des muscles axiaux du tronc, ce qui entraîne le raidissement du cou et des extrémités. Le patient peut développer une cyanose au cours de cette phase. Les contractions deviennent progressivement plus longues et interrompues, entraînant des secousses cloniques des extrémités. Il peut y avoir vidange de la vessie et des intestins, et le patient peut mordre sa langue. Après la crise épileptique, on observe un aplatissement du tracé EEG appelé dépression poste-ictale. Le patient est dans un coma profond, et il prend habituellement 15-60 minutes, parfois des heures (rarement des jours) pour reprendre conscience. Le patient se sent souvent complètement épuisé, et évoque des douleurs musculaires, des maux de tête, ou une humeur dépressive qui peut persister jusqu'à plusieurs jours après la crise généralisée tonico-clonique. Un faible pourcentage (5-8%) de ces patients reconnaîtront à l'avenir une longue série de crises tonico-cloniques sans reprise de conscience complète entre les crises. Cette condition est connue sous le nom d'état de mal épileptique (Status epilepticus) qui représente la complication médicale la plus redoutée à cause du grand risque de séquelles neurologiques définitives (Berg *et al.*, 2010; Fisher *et al.*, 2014).



**Figure 15: Les crises tonico-cloniques (Grand mal) affectent l'ensemble du cerveau.**  
 Comparaison entre EEG normale et EEG en cours d'une crise tonico-clonique

## 2. Les crises absence

### *Les absences typiques*

Les absences typiques sont caractérisées par une suspension de la conscience et du comportement qui dure quelques secondes. Après la crise, le patient reprend normalement son activité comme si de rien n'était. Il peut y avoir des mouvements saccadés des muscles du visage. Les EEG montrent des complexes pointe-onde de 3 Hz. Dans la plupart des cas, il s'agit d'une forme bénigne d'épilepsie qui disparaît à l'adolescence sans laisser de séquelles cognitives ou motrices. Cependant, quand cette forme d'épilepsie apparaît à l'adolescence, elle évolue généralement vers la forme tonico-clonique (Berg *et al.*, 2010; Fisher *et al.*, 2014).

### *Les absences atypiques*

Pour les symptômes des crises d'absences atypiques, on remarque une suspension plus importante du comportement. Les mouvements sont plus saccadés ou automatiques et la crise dure environ 20 secondes alors qu'elle est généralement entre 5 et 10 secondes pour une crise

d'absence typique. On peut également voir une perte incomplète de la conscience associée à d'autres types de crises. L'EEG chez les patients à absence atypique montre généralement des anomalies de fond (ralentissement), et des complexes pointe-onde de moins de 3 Hz.

### *Les Absences avec des caractéristiques particulières*

La myoclonie palébrale (Myoclonie des paupières) associée à une interruption de conscience est le type de crise caractéristique dans le syndrome de Jeavons. Les crises myocloniques peuvent également être associées à la perte momentanée de la connaissance (Fisher *et al.*, 2014).

### **3. Les crises myocloniques**

Les crises myocloniques consistent en de brèves saccades des extrémités et/ou des muscles axiaux du tronc. Une secousse myoclonique générée dans le cortex est de courte durée (généralement moins de 50 ms). Il arrive que les crises myocloniques ne soient pas suffisamment fortes pour provoquer des mouvements visibles, mais l'enfant ressent une forme d'état de choc au niveau de ses muscles (Fisher *et al.*, 2014).

### **4. Les crises atoniques**

Les crises atoniques sont marquées par une perte soudaine du tonus musculaire, ce qui fait que l'enfant devient mou et tombe par terre. Les crises atoniques sont rares et se produisent plus souvent chez les enfants qu'à l'âge adulte. Environ 1 % à 3 % des enfants épileptiques ont des crises atoniques (Berg *et al.*, 2010).

## **ii. Les crises partielles**

Il s'agit des crises épileptiques les plus communes, qui touchent environ 60% des personnes atteintes d'épilepsie. Les crises épileptiques focales se développent au niveau d'un seul hémisphère et peuvent être discrètement localisées ou plus largement distribuées. Les crises focalisées peuvent se développer également dans les structures sous-corticales. Cela peut entraîner une diminution transitoire de la cognition ou du langage, des modifications du comportement (par exemple des mouvements cloniques d'une partie du corps), et les manifestations autonomes (par exemple tachycardie, pâleur, hypersalivation) (Berg *et al.*, 2010).

### **iii. Crises non épileptiques**

Les crises non épileptiques sont des épisodes qui changent le comportement d'une personne pour un court laps de temps et ressemblent à des crises d'épilepsie. Une différence importante entre les deux est que les crises non épileptiques ne sont pas causées par l'activité électrique anormale dans le cerveau. Les crises non épileptiques peuvent être classées en deux groupes en fonction de la cause des convulsions. Les crises non épileptiques physiologiques qui sont causées par une perturbation du métabolisme dans le cerveau dont les causes médicales peuvent être liées à une arythmie cardiaque ou à une hypoglycémie ainsi que les crises non épileptiques psychogènes qui semblent être causées par des expériences psychologiques stressantes ou un traumatisme émotionnel.

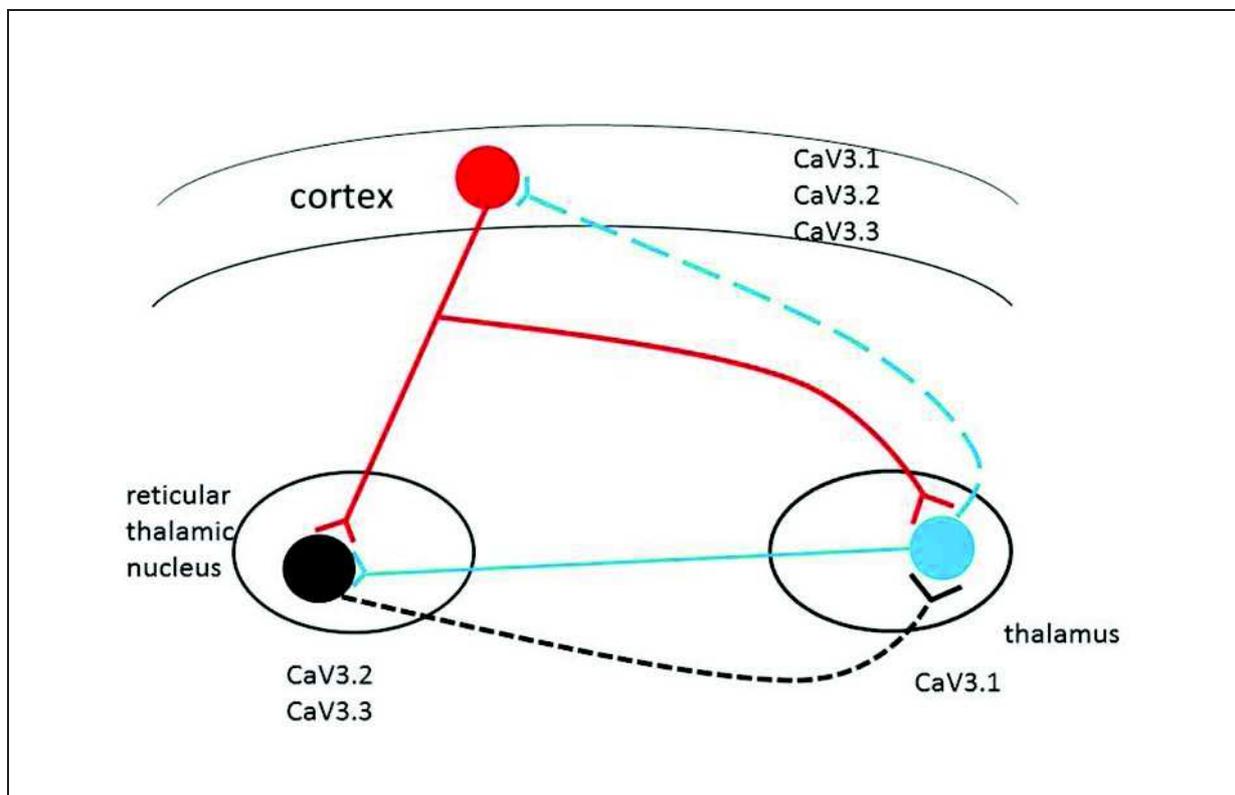
### **iv. L'état de mal épileptique (status epilepticus)**

L'état de mal épileptique signifie un état continu de crises. Le taux de mortalité suite à l'état de mal épileptique est très élevé (au moins 20%), surtout si la crise n'est pas prise en charge rapidement. L'état de mal épileptique est souvent déclenché par des tumeurs ou des infections cérébrales, des maladies cérébrovasculaires ou suite à l'ingestion de cocaïne ou d'autres drogues.

### **c. Les canaux calciques de type T dans l'épilepsie**

Les CCTT jouent un rôle primordial dans le maintien de l'équilibre de l'excitabilité cellulaire. Dans l'épilepsie, un dysfonctionnement de l'activité des canaux T au niveau de la boucle thalamocorticale (Fig. 16), est impliqué dans les crises généralisées chez le modèle animal ainsi que l'homme (Tsakiridou *et al.*, 1995; Khosravani *et al.*, 2004; Zamponi *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014). Chez des patients souffrant de l'épilepsie absence infantile et d'autres formes d'épilepsie généralisée, l'activité des CCTT, spécifiquement l'isoforme Cav3.2, augmente significativement par rapport au modèle contrôle. Chez le modèle rat de l'épilepsie absence (GAERS), les neurones réticulaires thalamiques présentent une augmentation de 16% sur l'expression de l'ARN messager de l'isoforme Cav3.2 ainsi qu'une élévation de l'amplitude des courants calciques de type T de 55% par rapport à la souche contrôle (Tsakiridou *et al.*, 1995; Talley *et al.*, 2000). Les mêmes résultats ont été obtenus chez le modèle WAG/Rij d'épilepsie absence (Broicher *et al.*, 2008). La majorité des mutations dans l'épilepsie absence infantile sont présents au niveau de la liaison entre le domaine I et II du canal Cav3.2, ce qui suggère un rôle fonctionnel de cette partie intracellulaire. Des études utilisant la technique

d'électrophysiologie en patch-clamp ont rapporté l'existence de plusieurs mutations au niveau du gène CACNA1H qui modifient les propriétés biophysiques du canal  $Ca_v3.2$  et participent dans la physiopathologie de l'épilepsie absence infantile. Ces mutations au niveau du canal  $Ca_v3.2$  (F161L and E282K) sont responsables d'un effet hyperpolarisant de  $\sim 10$  mV des courbes d'activation, tandis que d'autres mutations (V831M) sont associées à un ralentissement de  $\sim 50$  % d'inactivation avec un déplacement de  $\sim 10$  mV de la courbe d'inactivation vers des potentiels plus dépolarisés. Ces modifications permettent une plus grande charge calcique lors de l'activation, en augmentant la prédisposition à générer des crises chez les patients souffrant d'épilepsie absence infantile (Khosravani *et al.*, 2004).



**Figure 16: Représentation schématique de la boucle thalamocorticale et de l'expression des canaux calciques de type T**

Les canaux  $Ca_v3.2$  et  $Ca_v3.3$  sont principalement exprimés dans les neurones reticulothalamiques (nRT); les canaux  $Ca_v3.1$  sont fortement exprimés dans les neurones thalamocorticaux (nTC). Les trois isoformes des CCTT se trouvent dans différentes structures mais se chevauchent dans les couches du néocortex. Les changements de l'expression ou des propriétés biophysiques des gènes codant les CCTT (Mutations uniques/faux-sens, transcrits alternatifs, facteurs épigénétiques) dans le circuit peuvent induire des modifications physiopathologiques dans le cerveau avec le potentiel d'induire des crises de type absence. D'après (Chen *et al.*, 2014)

## d. Traitement de l'épilepsie

### i. Médicaments antiépileptiques

Dans le passé, le traitement de l'épilepsie a inclus plusieurs formes de punitions, des incantations, des amulettes, des régimes spéciaux, de l'exorcisme (Fig. 17), des produits végétaux; des irradiations aux rayons X, la chirurgie; et les médicaments synthétiques depuis la seconde décennie du 20<sup>ème</sup> siècle (Gross, 1992; Berg *et al.*, 2010; Magiorkinis *et al.*, 2010; Fisher *et al.*, 2014). Actuellement, l'approche la plus commune pour traiter l'épilepsie est l'utilisation de médicaments antiépileptiques (MAE).



**Figure 17: Saint Séverin de Noricum exorcisant le démon chez une jeune femme**

Peinture d'autel de 1300. © Musée allemand de l'épilepsie à Kork - Musée pour l'épilepsie et pour l'histoire de l'épilepsie.

Les MAE ont un effet anticonvulsivant, à savoir, qu'ils préviennent ou réduisent la survenue de crises sans prévenir l'épileptogénèse, par exemple, après une lésion ou traumatisme cérébrale (Schmidt, 2012). Il existe plus de 20 différents MAE sur le marché et qui présentent une multitude d'avantages ainsi que d'effets secondaires. Le choix du médicament à utiliser dépend de différents facteurs tels que le type des crises, la fréquence, le mode de vie et l'âge de la personne souffrant des troubles épileptiques. Le phénobarbital représente le premier MAE qui a été introduit par Hauptmann en 1912. Le phénobarbital a surpassé les médicaments à base de bromure utilisés depuis 1857. En 1938, la phénytoïne (diphénylhydantoïne) était introduite comme un MAE puissant et était utilisée comme un médicament de choix dans le traitement d'urgence des crises épileptiques et de l'état de mal épileptique (Shorvon, 2009). En 1960, il y

a eu l'introduction de la «deuxième génération» des MAE tels que la carbamazépine et l'acide valproïque dont les effets anticonvulsivants étaient découverts par hasard en 1962. Dans les années 1990, il y a eu l'émergence d'une « troisième génération » des MAE qui présentent moins d'interactions pharmacocinétiques avec d'autres médicaments ainsi que moins d'effets secondaires par rapport aux générations précédentes (Loscher *et al.*, 2013; Lee, 2014b; Schmidt *et al.*, 2014).

Les MAE peuvent être classés en fonction de leur mécanisme d'action principal. Les principaux groupes sont les bloqueurs des canaux sodiques, les activateurs de la transmission GABAérgique, les inhibiteurs du glutamate et les bloqueurs des canaux calciques (Tableau 3).

**Tableau 3: Les médicaments antiépileptiques et leur mécanisme d'action**

	CSDV	HVA Ca <sup>2+</sup>	LVA Ca <sup>2+</sup>	CPDV	RGABA <sub>A</sub>	Recap. GABA	RGlu
<b>Phenobarbitale</b>		+			+++		+
<b>Phénytoïne</b>	+++						
<b>Ethosuximide</b>			+++				
<b>Carbamazépine</b>	+++						
<b>Valproate sodium</b>	++		++			++	
<b>Benzodiazépine</b>					+++		
<b>Vigabatrine</b>						+++	
<b>Lamotrigine</b>	+++	++					
<b>Gabapentin</b>	+	++				+	
<b>Felbamate</b>	++	++			++		++
<b>Topiramate</b>	++	++		+	++		++
<b>Tiagabine</b>						+++	
<b>Oxcarbamazépine</b>	+++						
<b>Levetiracetam</b>		+			+		
<b>Pregabalin</b>		++					
<b>Zonisamide</b>	+++		++				
<b>Stiripentole</b>					+++		
<b>Rufinamide</b>	+++						
<b>Lacosamide</b>	+++						
<b>Eslicarbazépine acetate</b>	+++						
<b>Rétigabine</b>				+++			
<b>Perampanel</b>							+++

+++ : cible principale, ++ : cible probable, + : cible possible. Recap. GABA : Recapture GABA.

### **1. Les inhibiteurs des canaux sodium**

Les canaux sodiques sont des canaux ioniques spécifiques aux ions sodium. Il s'agit de protéines membranaires intégrales comprenant deux types; les canaux sodium dépendants du

voltage (CSDV) et les canaux sodium récepteur-dépendants. Dans les cellules excitables, les canaux sodiques sont responsables de la phase ascendante du potentiel d'action. Ils se présentent sous trois conformations : ouvert, fermé et inactivé. Le blocage des CSDV est le mécanisme d'action le plus commun entre les MAE actuellement disponibles. Les MAE qui ciblent les canaux sodiques (comme la carbamazépine, la phénytoïne, la lamotrigine, l'oxcarbazépine et rufinamide) empêchent le retour des canaux sodiques à l'état actif en les stabilisant à l'état inactif. Ainsi, les décharges répétitives au niveau des axones sont atténuées (Catterall, 2014).

## ***2. Les bloqueurs des canaux calciques***

Les CCDV représentent une des voies principales d'entrée du calcium dans les cellules excitables où ils participent activement à l'excitabilité cellulaire, la contraction musculaire et la libération des neurotransmetteurs (Clapham, 2007). Ils représentent, de ce fait, depuis longtemps la cible pharmacologique d'analgésiques et de produits antiépileptiques. Les CCTT ont été identifiés pour leur implication dans les crises de type absence. Ceci a été démontré par des études sur des modèles animaux (Tsakiridou *et al.*, 1995). Des mutations dans les gènes codant pour les canaux T ont été identifiées chez les patients atteints de l'épilepsie absence infantile (Nelson *et al.*, 2006). Les bloqueurs des CCTT sont capables d'inhiber les crises d'absence et de réduire la durée et la fréquence du cycle des DPO chez le modèle GAERS (Tringham *et al.*, 2012). Les MAE inhibiteurs des CCTT tels que l'éthosuximide sont utiles pour contrôler les crises épileptiques (Powell *et al.*, 2014). (Voir la partie : Pharmacologie des canaux calciques de type T).

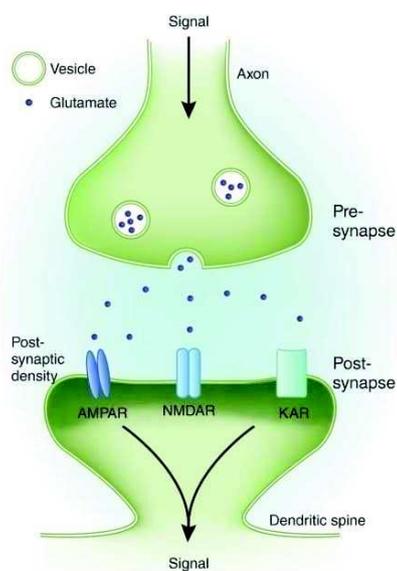
## ***3. Les activateurs de la transmission GABAérgique***

L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le SNC des mammifères et des oiseaux. Il joue un rôle important chez l'adulte en empêchant l'excitation prolongée des neurones en modulant les récepteurs GABA au niveau des synapses inhibitrices du cerveau. Ce processus permet l'activation et l'ouverture des canaux ioniques conduisant à un flux intracellulaire des ions chlorure ou extracellulaire des ions potassium. Ces mécanismes sont responsables de la diminution du potentiel de membrane conduisant à une hyperpolarisation. Ainsi, les effets inhibiteurs du GABA servent à contre balancer les effets excitateurs du glutamate. Un déséquilibre entre ces deux neurotransmetteurs est impliqué dans l'épilepsie. Il existe différentes possibilités pour augmenter l'activité du GABA. La première possibilité implique les agonistes des récepteurs GABA (le diazépame et la primidone) qui stimulent l'activité du récepteur. Deuxièmement, les inhibiteurs de la recapture du GABA (tels

que la tiagabine et la vigabatrine) permettent l'augmentation de la concentration de GABA dans la fente synaptique (Pfeiffer *et al.*, 1996). Troisièmement, les inhibiteurs de la GABA transaminase (tels que la vigabatrine, l'acide valproïque) qui empêchent le métabolisme du GABA (Treiman, 2001).

#### *4. Les inhibiteurs de l'activité glutamatergique*

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur dans le cerveau des mammifères. Suite à sa libération au niveau des terminaisons nerveuses présynaptiques, le glutamate interagit avec les récepteurs glutamatergiques localisés dans la membrane post-synaptique. L'activation de ces récepteurs par le glutamate augmente la conductance des cations ce qui entraîne une dépolarisation neuronale. Il existe deux types de récepteurs glutamatergiques ; les récepteurs ionotropiques (AMPA, kaïnate et NMDA) et les récepteurs métabotropiques (mGluR). Pour les récepteurs ionotropiques, il s'agit de canaux cations non sélectifs qui permettent le flux des ions  $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$  en réponse à la fixation du glutamate. Ce flux d'ions provoque un courant post-synaptique exciteur qui provoque la dépolarisation membranaire (Fig. 18). Si plusieurs récepteurs de glutamate sont activés, un potentiel d'action peut être déclenché dans les neurones postsynaptiques (Dingledine, 2012). Tandis que les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) sont couplés aux protéines G et agissent indépendamment sur les canaux ioniques postsynaptiques (Dingledine, 2012). Les MAE interagissant avec les récepteurs du glutamate en exercent un effet inhibiteur. Le topiramate inhibe les récepteurs AMPA et kaïnate tandis que le felbamate inhibe les récepteurs NMDA (Meldrum *et al.*, 2007; Gecz, 2010).



**Figure 18: Schéma représentant les récepteurs glutamatérgiques situés au niveau de la synapse excitatrice**

L'activation des récepteurs AMPA, NMDA et Kaïnate par le glutamate est impliquée dans l'épilepsie. D'après (Gecz, 2010).

### e. Les modèles animaux dans l'épilepsie

Les modèles animaux jouent un rôle essentiel pour avoir un aperçu sur l'origine de l'épilepsie, les différents syndromes, l'activité cérébrale chez un modèle épileptique ainsi que pour le développement de nouveaux médicaments anticonvulsivants et antiépileptiques. La recherche et la découverte de médicaments antiépileptiques repose essentiellement sur l'utilisation des modèles animaux épileptiques. Ces modèles animaux permettent de 1) évaluer l'efficacité d'un médicament contre différents types de crises d'épilepsie, 2) comparer l'efficacité d'une nouvelle molécule par rapport aux médicaments antiépileptiques existants chez un modèle pour les convulsions pharmacorésistantes, 3) étudier l'efficacité préclinique de nouveaux composés, 4) vérifier si l'épileptogenèse peut changer les effets potentiels d'un médicament. 5) estimer les concentrations plasmatiques efficaces des médicaments antiépileptiques et finalement, ils sont essentiels à la découverte de thérapies pour empêcher ou modifier le développement de l'épilepsie suite aux traumatismes cérébraux (Loscher, 2011).

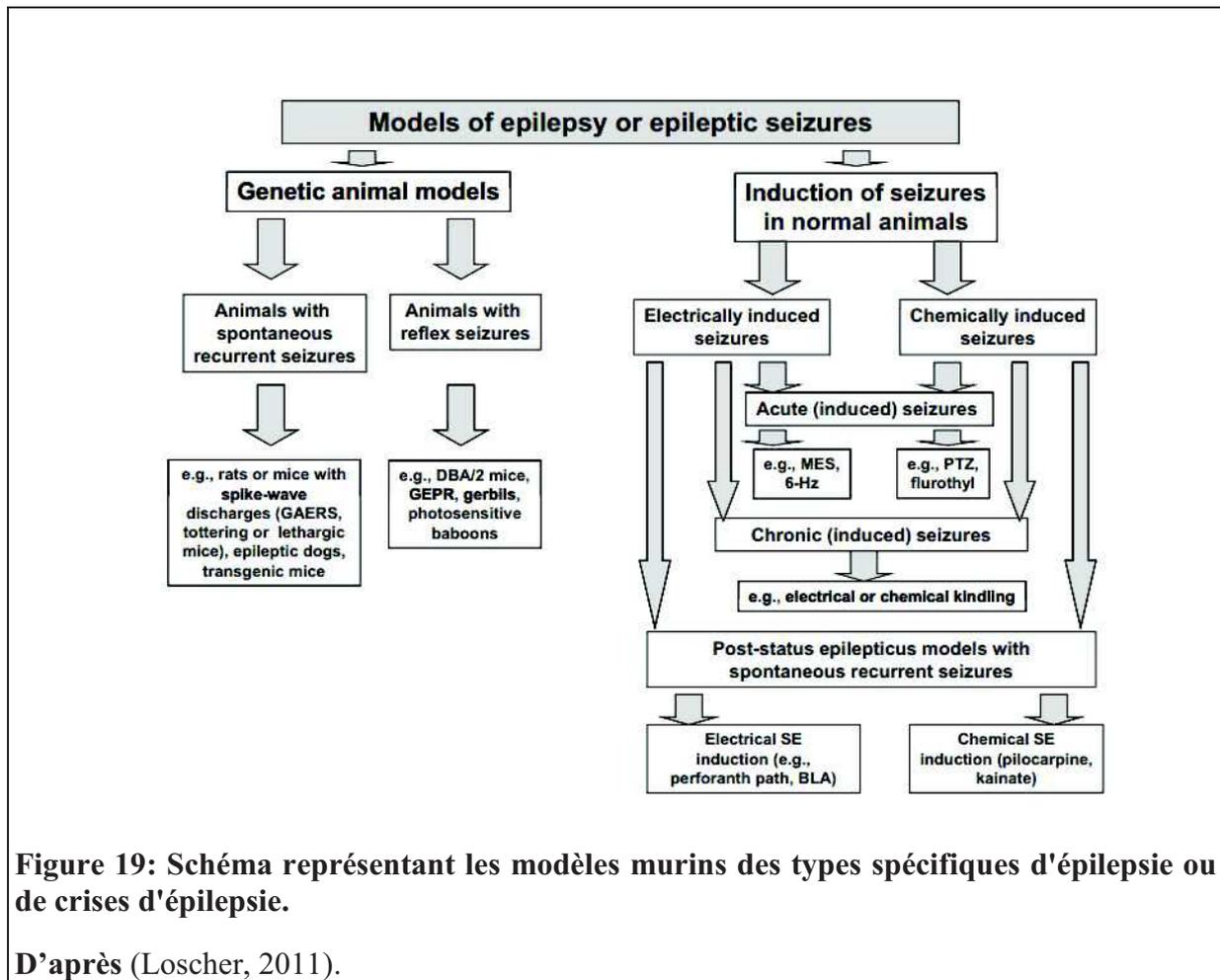
## **i. Modèle murin**

L'épilepsie est une maladie chronique caractérisée par des crises récurrentes non provoquées. La plupart des modèles animaux existants présentent des crises aiguës et sont donc des modèles d'état de mal épileptique. De ce fait, beaucoup d'entre ces modèles sont considérés comme des modèles de crises d'épilepsie et non pas des modèles d'épilepsie. Les modèles génétiques ont des phénotypes plus complexes et sont considérés comme des modèles d'épilepsie (Cole *et al.*, 2002; Loscher, 2011). Les deux modèles les plus utilisés sont le modèle d'électrochoc maximal (MES) et le modèle Pentylénétrazole (PTZ) chez les rongeurs (Loscher *et al.*, 2013). Des résultats positifs dans les deux modèles suggèrent que les composés testés pénètrent la barrière hémato-encéphalique et exercent leurs effets au niveau du SNC. Dans le modèle MES, un stimulus électrique supraliminaire (0,2 s) de 50 mA pour les souris et 150 mA pour les rats est utilisé pour provoquer des crises chez les animaux normaux. Le critère d'évaluation de l'essai est l'extension tonique des membres postérieurs. Ce test est considéré comme un modèle prédictif pour les crises généralisées (Loscher, 2011). En ce qui concerne le modèle PTZ, une dose proconvulsivante du PTZ (CD97) est administrée par voie sous-cutanée aux animaux normaux. La dose proconvulsivante du PTZ (CD97) correspond à la dose induisant une crise clonique d'au moins 5 secondes dans 97% des animaux. Le test est considéré comme un modèle prédictif pour les crises non convulsives (absence) (Loscher, 2011). Les critères d'évaluation sont donc bien définis pour ces deux modèles d'étude (par exemple, le temps d'apparition et la durée des crises) et semblent être utiles dans le criblage de composés dans la découverte de médicaments antiépileptiques (Yuen *et al.*, 2015). Au cours de la dernière décennie, l'idée sur ces deux modèles animaux utilisés dans la découverte de médicaments a considérablement changé (Loscher *et al.*, 2013), le modèle MES est maintenant considéré comme particulièrement sensible à des médicaments bloquant les canaux sodiques, tandis que le modèle PTZ est suggéré comme étant particulièrement sensible aux médicaments qui miment l'activité du GABA. De plus, le modèle MES a été blâmé pour produire des faux positifs (Loscher, 2002).

Un autre modèle génétique des épilepsies absences est le modèle GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg). Des individus de la souche Wistar présentant des crises d'absence spontanées ont été sélectionnés et croisés entre eux pour donner la souche GAERS. Tous les animaux de la souche GAERS développent des crises non convulsives et récurrentes caractérisées par des DPO bilatérales et synchronisées accompagnées d'un arrêt comportemental. Ces crises apparaissent entre 30 et 40 jours post-natal et leur nombre augmente avec l'âge. Elles apparaissent essentiellement dans un état de veille calme (Marescaux *et al.*,

1992; Marescaux *et al.*, 1995). Les études ont montré que les médicaments antiépileptiques contre les crises d'absence chez l'homme étaient capables de supprimer les DPO chez les GAERS, tandis que les autres médicaments antiépileptiques contre les crises convulsives n'ont aucun effet chez les GAERS (Bialer *et al.*, 2013; Kwan *et al.*, 2014). De plus, deux nouveaux bloqueurs spécifiques des CCTT ; Z941 et Z944, ont montré une activité anticonvulsivante significative chez les GAERS (Tringham *et al.*, 2012).

Malgré le développement de nouveaux médicaments antiépileptiques, 30 à 40% des patients souffrent de crises pharmacorésistantes, d'où la nécessité de développer des modèles d'épilepsie réfractaire. Un exemple d'un tel modèle est le modèle de saisie psychomoteur 6 Hz chez la souris (Bialer *et al.*, 2015). Une stimulation électrique, avec des impulsions rectangulaires de 6 Hz et d'une durée de 0,2 ms, est assurée par des électrodes cornéennes pendant 3 s. Cela induit des crises qui sont semblables à des crises psychomotrices dans l'épilepsie limbique humaine. Le modèle 6 Hz est suggéré par le projet de criblage des produits anticonvulsivants à l'Université de l'Utah pour être utilisé comme un outil de criblage secondaire pour examiner des composés inactifs chez les modèles MES et PTZ (Barton *et al.*, 2001; Loscher, 2011). Le modèle est résistant à certains médicaments antiépileptiques existants, mais permet de la même façon que les modèles MES et PTZ, le criblage d'un grand nombre de composés (Fig. 19) (Loscher *et al.*, 2013). Dans l'ensemble, il apparaît que plusieurs modèles de crises aiguës ne parviennent pas à identifier des composés ayant une efficacité contre les crises résistantes aux médicaments/pharmacorésistantes (Loscher *et al.*, 2013). Ainsi, un certain nombre de modèles alternatifs ont été introduits dans la recherche sur l'épilepsie y compris *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, et *Danio rerio* (poisson zèbre) (Cunliffe *et al.*, 2015).



**Figure 19: Schéma représentant les modèles murins des types spécifiques d'épilepsie ou de crises d'épilepsie.**

**D'après (Loscher, 2011).**

## *ii. Drosophila melanogaster*

La drosophile, appelée également la mouche des fruits, a joué un rôle central dans la découverte de mutations des canaux ioniques responsables des phénotypes épileptiques. Il existe également des modèles de crises pharmacologiquement induite chez la drosophile où l'exposition aux antagonistes des récepteurs GABA, tels que la picrotoxine ou le PTZ, induit des crises généralisées. L'analyse électrophysiologique de la terminaison des neurones moteurs du SNC révèle le développement de crises généralisées chez des larves de drosophile exposées à la picrotoxine (Baraban, 2007; Cunliffe *et al.*, 2015). Les mutations responsables des phénotypes épileptiques chez la drosophile affectent des gènes codant les CSVD, les kinases éthanolamines, l'alanine aminopeptidase et le domaine de transcription LIM. Ces phénotypes chez les mutants dits bang-sensibles (BS) sont déclenchés mécaniquement en tapant ou en vortexant brièvement les flacons de cultures (Song *et al.*, 2008; Parker *et al.*, 2011). Certains médicaments antiépileptiques comme l'acide valproïque, la gabapentine et le bromure de sodium, arrivent à supprimer l'activité épileptique chez les mutants BS contrairement à la carbamazépine et l'éthosuximide (Reynolds *et al.*, 2004; Cunliffe *et al.*, 2015).

### **iii. *Caenorhabditis elegans***

Les nématodes *Caenorhabditis elegans* sont devenus l'un des principaux organismes modèles utilisés en biologie. En effet, le génome de *C. elegans* a été le premier génome des métazoaires à être pleinement séquencé. Ils présentent un corps transparent ainsi qu'un système nerveux bien caractérisé et constitué de 302 neurones. Des homologues pour de nombreuses protéines nécessaires au fonctionnement neurologique chez les mammifères, tels que les canaux ioniques, les récepteurs et les neurotransmetteurs sont conservés entre les deux classes. En plus, ces organismes offrent la possibilité d'effectuer des enregistrements électrophysiologiques à partir de neurones individuels ce qui permet d'étudier les décharges électriques anormales (Baraban, 2007). *C. elegans* a ouvert de nouvelle voie pour l'étude de la lissencéphalie (Williams *et al.*, 2004). Il s'agit d'une malformation congénitale rare conduisant à la disparition de l'aspect habituel du cortex cérébral et donnant un cerveau lisse. Les enfants atteints présentent un retard mental et une épilepsie réfractaire. Une mutation au niveau de l'allèle LIS1 chez *C. elegans* en combinaison avec le PTZ peuvent provoquer des convulsions. Des convulsions identiques ont été obtenues en utilisant des *C. elegans* mutantes présentant une transmission nerveuse GABAérgique altérée (Williams *et al.*, 2004; Cunliffe *et al.*, 2015). La disponibilité des systèmes d'imagerie/vidéo automatisés capables d'enregistrer les mouvements convulsives chez *C. elegans* ont permis d'effectuer des criblages à grande échelle des produits anticonvulsivants (Buckingham *et al.*, 2009). Ainsi, malgré ses limites, *C. elegans* présente un potentiel inexploité significatif dans la recherche sur l'épilepsie (Cunliffe *et al.*, 2015).

### **iv. *Danio rerio***

Malgré une longue tradition d'utilisation des rats et des souris comme modèle biologique, plusieurs aspects de la biologie des rongeurs limitent leur utilisation à grande échelle pour le criblage des molécules pharmacologiques et thérapeutiques. Les scientifiques intéressés par l'étude du développement des vertébrés, des maladies génétiques et neurologiques se sont récemment tournés vers *Danio rerio* (*Brachydanio rerio*, zebrafish) pour surmonter ces limitations.

### **f. Principales caractéristiques du poisson zèbre (*Danio rerio*)**

Le poisson zèbre est un membre du genre *Danio* de la famille des cyprinidés (Meyer *et al.*, 1993). Il est originaire de l'Inde et de la Malaisie. Il fut importé pour la première fois par P. Matte-Lankwitz en 1905. Les habitats naturels du poisson zèbre sont les rizières, les eaux

stagnantes et les petits cours d'eau de lent débit. Il s'agit d'une espèce benthopélagique, c'est-à-dire qu'elle évolue préférentiellement dans la partie basse de la colonne d'eau dont les températures varient entre 10 à 40 °C. Le poisson zèbre est capable de supporter de larges gammes de pH (6,5 à 8) et de dureté (0 à 25 °GH).

Le poisson zèbre est grégaire. Pour son élevage, il est essentiel de le maintenir par groupe de 10 à 20 individus au minimum au risque de perturber fortement son comportement. Il s'agit d'une espèce omnivore qui se nourrit principalement du zooplancton, phytoplancton, des insectes et des larves d'insectes, mais peut se nourrir d'une variété d'autres aliments, tels que les vers et les petits crustacés.

Le poisson zèbre est nommé ainsi à cause des cinq rayures bleues uniformes, pigmentées et horizontales sur le côté du corps, qui rappellent les rayures d'un zèbre, et qui s'étendent jusqu'à l'extrémité de la nageoire caudale. Son corps fusiforme et très flexible facilite une progression rapide ainsi que des changements de direction fréquents. Il existe un léger dimorphisme sexuel ; le mâle est en forme de torpille et présente des rayures dorées entre les rayures bleues. La femelle a un ventre plus gros, avec des bandes blanchâtres et argentées au lieu des bandes dorées et présente un oviducte au niveau de la papille ano-uro-génitale juste avant la nageoire anale.

Le poisson zèbre peut atteindre jusqu'à 6,4 cm de longueur, bien qu'il se caractérise généralement par une taille comprise entre 3 et 5 cm au stade adulte atteint vers l'âge de 100 jours (Fig 20). Sa durée de vie en captivité est d'environ deux à trois ans, bien que dans des conditions idéales, elle peut être étendue à cinq ans (Spence *et al.*, 2008)

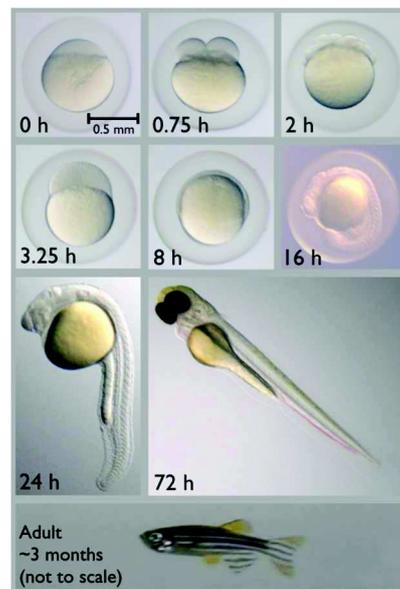


**Figure 20: Caractéristiques physiologiques et dimorphisme sexuel chez le poisson zèbre.**

#### **v. Cycle de vie du poisson zèbre**

Le poisson zèbre se caractérise par un cycle de vie court. Son développement embryo-larvaire est très rapide. Les précurseurs des principaux organes apparaissent dans les premières 36

heures suivant la fertilisation et donnent les caractéristiques des poissons adultes observées à 7 jours post-fertilisation (JPF). Le développement embryon-larvaire du poisson zèbre a fait l'objet de nombreuses études qui ont abouties à une description détaillée. Ainsi, les principaux stades de développement sont : le stade unicellulaire ; le zygote, où le poisson zèbre apparaît comme un vitellus avec une seule cellule énorme en dessus (0 hpf), qui se divise en deux (0,75 hpf) puis atteint le stade blastula (2.25 hpf) et continue à se diviser jusqu'à atteindre des milliers de petites cellules (3,25 hpf) ; on parle du stade gastrula auquel fait suite le stade de segmentation où les cellules migrent vers le bas des côtés du vitellus (8 h) et commencent à former la tête et la queue (16 h). Le stade de la pharyngula est caractérisé par la poussée de la queue et sa séparation du corps (24 h). Le vitellus se rétrécit au fil du temps car l'embryon l'utilise comme source de nutriments au cours des premiers jours (72 h). Le stade larvaire commence autour 72 heures après la fertilisation (quand les poissons peuvent nager librement) et dure environ 27 jours. Après quelques mois, les poissons adultes atteignent la maturité sexuelle (Fig. 21)



**Figure 21: Principales étapes du développement embryon-larvaire du poisson zèbre.**

Photos approximativement à l'échelle à l'exception des adultes qui sont d'environ 2,5 cm de long. D'après Ed hendel.

#### **vi. Poisson zèbre : Modèle biologique intéressant dans l'étude de l'épilepsie**

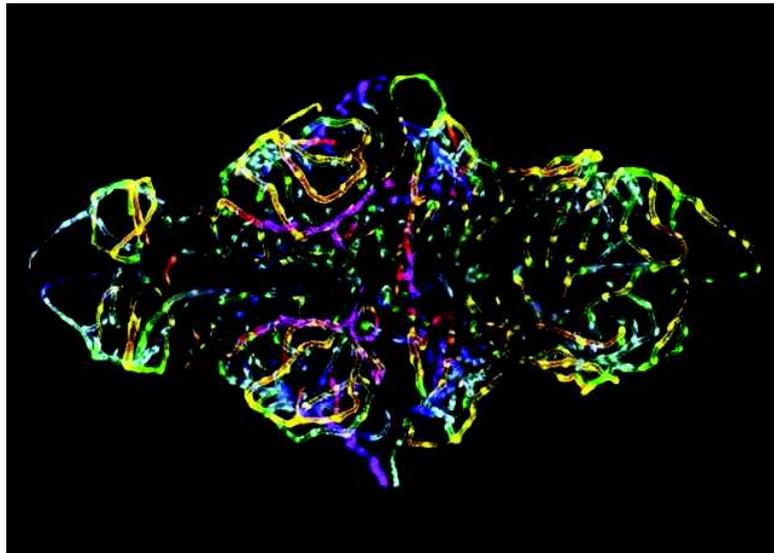
D'origine génétique ou lésionnelle, l'épilepsie est un trouble neurologique qui regroupe des dysfonctionnements cellulaires et moléculaires très variés. Afin de développer des approches

thérapeutiques efficaces, il est nécessaire d'avoir un bon modèle animal. Aujourd'hui, il est bien admis que la souris ne permet pas de reproduire la physiopathologie complexe de l'épilepsie. En revanche, le poisson zèbre semble être un candidat convaincant. Les poissons zèbres sont actuellement reconnus comme un modèle extrêmement précieux dans l'étude du développement et fonctionnement du cerveau (Fetcho, 2007; Holder *et al.*, 2008; Veldman *et al.*, 2008). En raison d'une multitude d'avantages, les poissons ont récemment émergé comme un modèle *in vivo* pour le criblage de nouvelles molécules anticonvulsivantes et antiépileptiques (Baraban *et al.*, 2005; Berghmans *et al.*, 2007; Baxendale *et al.*, 2012). Les poissons zèbres présentent un développement embryo-larvaire très rapide qui donne les caractéristiques des poissons adultes à 7 JPF (voir partie cycle de vie du poisson zèbre) et ont la capacité de générer une progéniture de 50-200 embryons chaque semaine à partir d'un mâle et une femelle adultes. Etant des vertébrés simples, les poissons zèbres partagent de nombreuses similitudes avec les espèces couramment utilisées aux laboratoires tels que les rats ou les souris, et sont plus proches à l'homme que les nématodes (*Caenorhabditis elegans*) ou la drosophile (*Drosophila melanogaster*) (Peterson *et al.*, 2012). Au niveau du cerveau larvaire du poisson zèbre, toutes les grandes subdivisions adultes sont présentes. A cinq JPF, le colliculus, la plus grande structure du mésencéphale chez le poisson zèbre, commence à prendre une organisation corticale bien structurée en forme de couches. De plus, les systèmes nécessaires dans les processus neurologiques (les décharges épileptiques anormales) comme les systèmes dopaminergiques, sérotoninergiques et GABAérgiques se développent pendant l'embryogenèse précoce et sont fonctionnels chez les larves ce qui valide l'utilisation du poisson zèbre comme un modèle *in vivo* pour découvrir de nouveaux composés neuroactifs (Doldan *et al.*, 1999; Kawai *et al.*, 2001; Baraban *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2008). En raison de leur petite taille, les larves de poissons zèbres peuvent vivre dans des petits volumes et ne nécessitent donc que des quantités micromolaires de composés, des boîtes de 96 puits (Fig. 22) pour les tests pharmacologiques. Ces tests se font grâce à un système de suivi automatisé qui permet de mesurer et d'analyser en détail l'activité locomotrice larvaire (voir matériels et méthodes).



**Figure 22: Larves de poisson zèbre de 7 jours post-fertilisation dans une plaque de 96 puits.**

De plus, les systèmes aquatiques permettent un coût relativement faible pour l'entretien des grandes colonies des poissons zèbres adultes par rapport aux rongeurs. Les larves du poisson zèbre tolèrent le diméthylsulfoxyde (DMSO) à des concentrations allant jusqu'à 1% et absorbent facilement les composés ajoutés directement au milieu environnant soit par voie orale, soit à travers la peau et les branchies. En raison de ces avantages, plusieurs maladies humaines en plus de l'épilepsie, y compris, le cancer (White *et al.*, 2013) et les maladies cardiovasculaires (Bakkers, 2011) ont été modélisées avec succès chez le poisson zèbre. Enfin, les études ont montré que le poisson zèbre possède une barrière hémato-encéphalique dont la maturation se produit entre 3 et 10 JPF et que cette barrière partage des similitudes structurelles et fonctionnelles avec celles des mammifères et des vertébrés supérieurs (Fig. 23) (Jeong *et al.*, 2008; Fleming *et al.*, 2013).



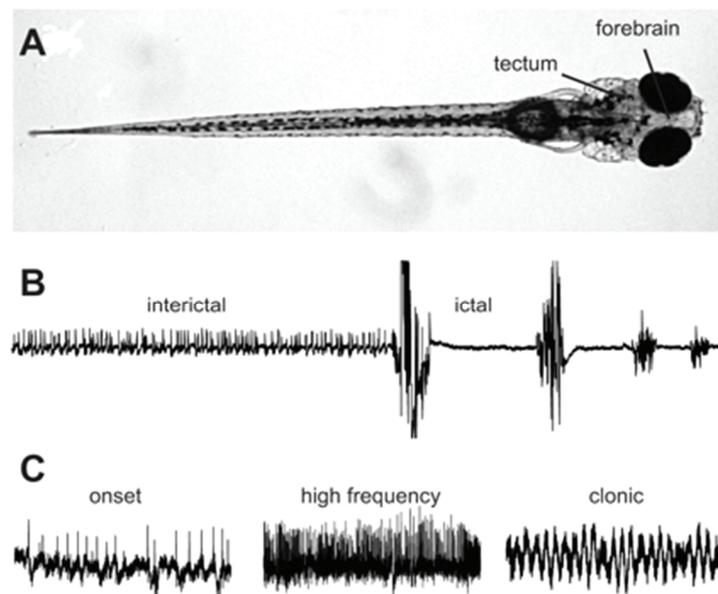
**Figure 23: Image prise avec un microscope confocale représente la barrière hémato-encéphalique chez un embryon de poisson zèbre.**

Des protéines fluorescentes sont utilisées pour observer les cellules endothéliales du cerveau et visualiser le développement de la barrière hémato-encéphalique en temps réel. D'après Dr. Jennifer L. Peters et Dr. Michael R. Taylor (St Jude Children's Hospital).

L'exposition à un agent proconvulsivant entraîne d'une manière dépendante à la concentration une augmentation importante de l'activité locomotrice ainsi qu'un comportement de type épileptique (Baraban *et al.*, 2005; Afrikanova *et al.*, 2013). Pour provoquer des crises épileptiques, Le pentylènetétrazole (PTZ), un agent stimulant du système nerveux central connu pour ses effets proconvulsivants et qui agit comme antagoniste non-compétitif des récepteurs GABA, est ajouté directement au milieu environnant des larves de 7 JPF. Le PTZ suscite des comportements convulsivants d'une manière dépendante de la concentration. Au début, les larves augmentent considérablement leur activité, suivie par un comportement de nage rapide en forme de cercle qui se termine par une série de brèves convulsions cloniques conduisant à une perte de la posture (Baraban *et al.*, 2005)

Les crises épileptiques sont définies par des décharges électriques anormales. Pour suivre les changements dans l'activité cérébrale d'une petite entité comme le cerveau des larves de poisson zèbre, les chercheurs ont choisi l'électrophysiologie en enregistrant le potentiel du champ local (Baraban *et al.*, 2005). Une électrode extracellulaire est placée dans le tectum optique pour enregistrer l'activité cérébrale. L'activité épileptique enregistrée à partir du cerveau du poisson zèbre comprend des décharges interictales et ictales similaires à l'activité enregistrée au niveau des tranches de l'hippocampe des rongeurs (Baraban *et al.*, 2005; Hortopan *et al.*, 2010). Les

décharges interictales enregistrées à partir des cerveaux de larves de poisson zèbre ont été décrites comme faibles et fréquentes, tandis que les décharges ictales possèdent une grande amplitude et se produisent moins fréquemment (Fig. 24) (D'Antuono *et al.*, 2010; Hortopan *et al.*, 2010)

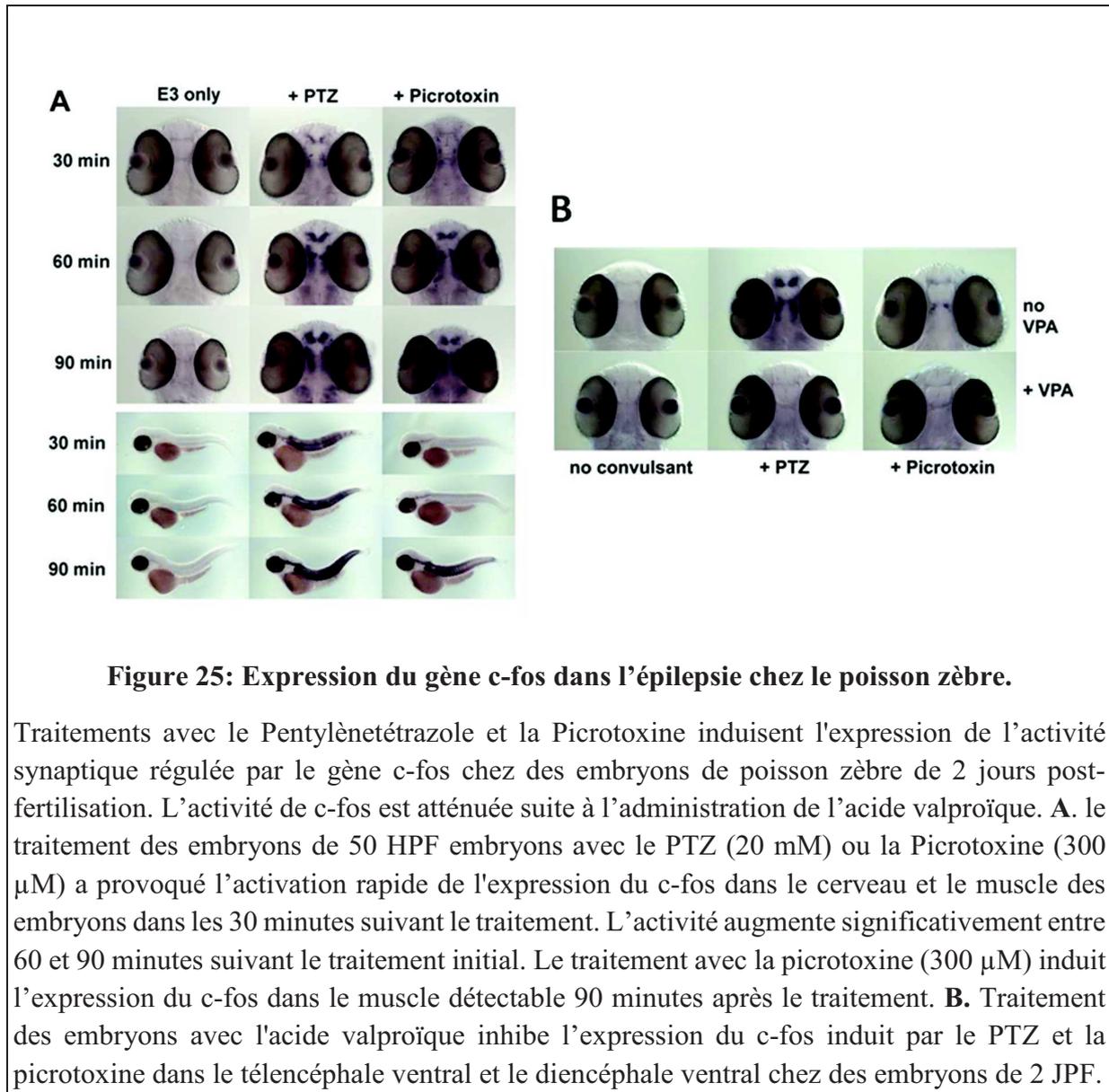


**Figure 24: Crise aigüe chez le poisson zèbre**

(A) Larves de poisson zèbre à 7 JPF. (B) Enregistrement extracellulaire du potentiel de champ obtenu à partir du tectum optique d'une larve de poisson zèbre de 7 JPF exposée à 15 mM de PTZ. On observe la présence d'une activité interictale rapide de faible amplitude et une séquence marquée par l'apparition de multi-pics à grandes amplitudes caractérisant l'activité ictale (C) Enregistrement à motif unique obtenu à partir d'une cellule individuelle au niveau du tectum optique des larves de poisson zèbre de 7 JPF exposées à 15 mM de PTZ. On observe la présence de l'activité initiale du déclenchement (début), suivie par un déclenchement à haute fréquence et une période d'activité clonique. D'après (Hortopan *et al.*, 2010)

Les changements dans l'expression des gènes lors des convulsions peuvent être surveillés chez les larves des poissons zèbres. Les études ont montré grâce à la RT-PCR (la réaction en chaîne par polymérase en temps réel) et la technique d'hybridation *in situ* que les convulsions provoquées par le PTZ induisent une augmentation de l'expression du gène *c-fos* qui est un facteur de transcription synthétisé suite à une activité cérébrale importante (Baraban *et al.*, 2005). Baxendale *et al.* montrent que l'expression de *c-fos* était détectable dans le cerveau des larves du poisson zèbre âgées de 2 JPF dans les 30 minutes suivant l'administration soit du PTZ

ou de la Picrotoxine, et a augmenté significativement entre 60 et 90 minutes après l'administration initiale (Fig. 25) (Baxendale *et al.*, 2012).



**Figure 25: Expression du gène c-fos dans l'épilepsie chez le poisson zèbre.**

Traitements avec le Pentylènetétrazole et la Picrotoxine induisent l'expression de l'activité synaptique régulée par le gène c-fos chez des embryons de poisson zèbre de 2 jours post-fertilisation. L'activité de c-fos est atténuée suite à l'administration de l'acide valproïque. **A.** le traitement des embryons de 50 HPF embryons avec le PTZ (20 mM) ou la Picrotoxine (300  $\mu$ M) a provoqué l'activation rapide de l'expression du c-fos dans le cerveau et le muscle des embryons dans les 30 minutes suivant le traitement. L'activité augmente significativement entre 60 et 90 minutes suivant le traitement initial. Le traitement avec la picrotoxine (300  $\mu$ M) induit l'expression du c-fos dans le muscle détectable 90 minutes après le traitement. **B.** Traitement des embryons avec l'acide valproïque inhibe l'expression du c-fos induit par le PTZ et la picrotoxine dans le télencéphale ventral et le diencéphale ventral chez des embryons de 2 JPF.

Le criblage de nouvelles molécules anticonvulsivantes et antiépileptiques est rendu possible grâce à l'utilisation d'un système de suivi automatisé qui permet de mesurer l'activité locomotrice des poissons zèbres suite à l'exposition au PTZ ou autres produits convulsivants (Voir matériels et méthodes). Berghmans et al. ont testé 13 médicaments antiépileptiques présents dans le marché en utilisant ce système et ont montré que 12 d'entre eux sont capables de diminuer l'activité convulsivante induite par le PTZ (Berghmans *et al.*, 2007). Une étude plus récente testant les 13 médicaments antiépileptiques utilisant le système de suivi de l'activité locomotrice et l'EEG confirme dans l'ensemble les données chez les modèles PTZ des poissons zèbres et rongeurs (Afrikanova *et al.*, 2013).

Le poisson zèbre comme tout modèle *in vivo* présente aussi quelques limitations en parallèle à ses multiples avantages. Tout d'abord, les différences physiologiques entre les embryons/les larves du poisson zèbre et les adultes des mammifères doivent être prises en considération. Deuxièmement, toutes les petites molécules sont facilement absorbées par les embryons et les larves ce qui peut conduire à des faux négatifs. Troisièmement, en raison de la petite taille du poisson zèbre, ils ne peuvent pas être utilisés pour évaluer certaines interventions d'épilepsie, tels que la stimulation cérébrale profonde (Stewart *et al.*, 2012).

### **g. L'épilepsie et les plantes médicinales**

Bien que les crises chez la plupart des patients souffrant d'épilepsie soient contrôlées avec succès par les MAE disponibles sur le marché, plus de 30% des patients sont « pharmaco-résistants » ou présentent une épilepsie réfractaire (Kwan *et al.*, 2000). En outre, de 30 à 40% des patients épileptiques sont touchés par les effets secondaires que comportent les MAE (Sorensen *et al.*, 2013). De plus, la disponibilité et le coût des MAE présents dans le marché sont, cependant, deux obstacles entravant le traitement de l'épilepsie. Environ 90% des personnes épileptiques vivent dans les pays en développement, et la plupart d'entre eux ne reçoivent pas de traitement médicamenteux contre l'épilepsie (Ngugi *et al.*, 2010). En Afrique subsaharienne, par exemple, la grande majorité de la population rurale n'a pratiquement pas accès aux établissements modernes de santé et les patients doivent souvent parcourir de longues distances pour obtenir des soins médicaux. En outre, l'épilepsie est souvent associée à d'énorme stigmatisation. Par conséquent, les patients ne peuvent pas profiter d'un appui psychologique, logistique et financier nécessaire pour obtenir des traitements contre l'épilepsie (Baskind *et al.*, 2005). Dans ce contexte, les guérisseurs traditionnels fournissent souvent la première et la seule source de la thérapie.

Tous ces problèmes ; la pharmaco-résistance et les effets secondaires liés aux produits épileptiques, la non disponibilité des médicaments pour les personnes épileptiques dans les pays en développement, ont rendu indispensable les investigations pour déterminer l'effet des plantes médicinales utilisées par les guérisseurs traditionnels et d'en découvrir de nouvelles molécules à effets antiépileptiques et anticonvulsivants. De nombreuses études montrent l'intérêt des plantes médicinales comme une source riche de nouveaux médicaments antiépileptiques (Nsour *et al.*, 2000; Sucher *et al.*, 2015).

L'histoire montre que les plantes médicinales ont été utilisées comme remèdes traditionnels pour traiter l'épilepsie et les convulsions depuis 6000 ans avant JC. 221. Des plantes appartenant

à 53 familles ont été décrites dans neuf herbiers européens les plus importants des 16<sup>ème</sup> et 17<sup>ème</sup> siècles pour leur utilisation contre l'épilepsie (Adams *et al.*, 2012). En évaluant les remèdes prophylactiques et thérapeutiques utilisés en Italie entre la fin du 19<sup>ème</sup> et le milieu du 20<sup>ème</sup> siècle pour soigner l'épilepsie, 12 plantes ont été identifiées pour leurs effets anticonvulsivants (Tagarelli *et al.*, 2013). En effet, la médecine à base des plantes médicinales constitue l'ancêtre direct de la pharmacothérapie moderne, et certains des médicaments les plus importants et réussis sont dérivés de produits naturels (Koehn *et al.*, 2005; Newman *et al.*, 2007). L'Afrique a une longue tradition d'utilisation des plantes médicinales pour le traitement de l'épilepsie. Parmi les 60 plantes qui sont couramment utilisées par les guérisseurs traditionnels tanzaniens, *Abrus precatorius* L., *Clausena anisata* (Willd.) Oliv. et *Hoslundia opposita* Vahl. ont montré une activité anticonvulsivante très importante (Moshi *et al.*, 2005). De même, *Curcuma longa*, une plante herbacée de la famille des Zingiberaceae est utilisée dans la médecine traditionnelle contre les crises épileptiques. Paucar *et al.* montrent que les principaux sesquiterpénoïdes de bisabolène de *Curcuma* atténuent les crises induites chez le poisson zèbre suite à l'administration du PTZ, ce qui pourraient indiquer l'intérêt de ces molécules naturelles dans le développement de médicaments antiépileptiques (Orellana-Paucar *et al.*, 2012). Plusieurs exemples de molécules isolées de plantes médicinales sont en cours de développement en tant que MAE; La losigamone dérivée de la plante kava-kava (*Piper methysticum*) est utilisée à l'origine par des guérisseurs traditionnels dans le Sud de l'océan pacifique comme un anxiolytique et qui est en développement clinique comme un médicament antiépileptique (Malawska, 2005). Trois d'autres composés d'origine végétale; le cannabidiol, la cannabidivarine (*Cannabis sativa*) et l'huperzine (*Huperzia serrata*) sont actuellement en cours de développement comme MAE (Bialer *et al.*, 2015).

Les effets antiépileptiques de ces plantes médicinales peuvent être expliqués par leur capacité à interagir de façon directe ou indirecte avec les récepteurs du SNC comme les récepteurs GABA de type A (GABA<sub>A</sub>), les récepteurs NMDA ou encore les canaux ioniques voltage-dépendants, en particulier les CCTT.

## **E. Objectifs du travail**

Les CCTT sont une voie d'entrée du calcium dans les cellules excitables. Ils sont activés par de faibles dépolarisations de la membrane plasmique et produisent un courant calcique qui s'inactive rapidement. Ces canaux jouent un rôle important dans l'excitabilité cellulaire, des neurones en particulier, et sont impliqués dans de nombreuses maladies, telles que l'épilepsie,

la douleur neuropathique, mais aussi l'hypertrophie cardiaque et le cancer. C'est l'augmentation de l'activité des canaux de type T qui est souvent retrouvée dans ces situations pathologiques et l'identification d'inhibiteurs sélectifs des canaux de type T est un enjeu actuel. Dans ce projet, Nous sommes intéressés par l'étude des effets des plantes médicinales méditerranéennes sur la modulation des CCTT ainsi que l'étude de leurs effets anticonvulsivants et antiépileptiques chez les poissons zèbres. Pour cela, nous avons visé :

- L'étude de l'effet de la lavande et du romarin sur la modulation des canaux calciques de type T,
- L'étude de l'effet du *Peganum harmala* et de l'harmaline sur la modulation des canaux calciques de type T,
- La validation des modèles Pentylénetétrazole (PTZ) et 4-Aminopyridine (4-AP) comme des modèles pour le criblage des molécules et substances anticonvulsivantes et/ou antiépileptiques,
- Et l'étude des effets anticonvulsivants et/ou antiépileptiques des bloqueurs sélectifs des CCTT (TTA-A2) et des extraits des plantes médicinales chez le poisson zèbre.

# **Matériels et méthodes**

## II. Matériels et méthodes

### A. Matériel biologique

#### a. La collecte

La collecte des plantes médicinales est faite dans la région Souss-Massa qui se trouve au centre géographique du Maroc entre l'océan atlantique et les montagnes du haut Atlas et de l'Anti-Atlas (Tableau 4).

**Tableau 4: Liste des plantes médicinales et des parties utilisées**

Espèce	Principe actif	Partie utilisée
<i>Lavandula stoechas</i>	Linalol, alpha-fenchone, 1.8 cinéole (Kirmizibekmez <i>et al.</i> , 2009)	Fleurs, feuilles
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Acide rosmarinique, 1.8 cinéole, camphor (Santoyo <i>et al.</i> , 2005)	Feuilles
<i>Peganum harmala</i>	Harmaline, armine, harmane (Spletstoesser <i>et al.</i> , 2005; Herraiz <i>et al.</i> , 2010)	Graines
<i>Ricinus cummunis</i>	1,8-cineole, camphor, alpha-pinene (Darmanin <i>et al.</i> , 2009)	Feuilles
<i>Citrullus colocynthis</i>	Acide linoléique, citronellal	Ecorces

#### b. Préparation du matériel végétal

Le séchage des plantes collectées est effectué dans une étuve dont la température ne dépasse pas 40°C pour éviter la dégradation des composés thermolabiles. La durée de cette étape varie selon le type de la plante et la partie séchée et dure généralement entre 48 à 96 heures. La matière végétale est ensuite broyée à l'aide de deux types de mixeurs jusqu'à obtention d'une poudre. Le tamisage permet d'affiner la granulométrie de la poudre obtenue après broyage. La poudre est pesée puis remise dans l'étuve pour 12 heures et ainsi de suite jusqu'à stabilisation du poids de la poudre

#### c. Macération, filtration et extraction

Par la suite, on passe à la macération qui consiste à tremper 20 g de poudre à poids stabilisé dans 200 ml de solvant pur (Méthanol) pendant 24 heures. Ensuite, le solvant est décanté à travers un filtre et un nouveau solvant pur est ajouté dans le flacon. Le mélange est laissé macérer pendant 24h. Le mélange obtenu est filtré à nouveau à l'aide du papier Wathman et l'opération est répétée pour une troisième fois (72 heures au total). Ensuite, l'extraction est

effectuée en utilisant un évaporateur rotatif (Rotavapor<sup>®</sup>) qui permet de séparer le solvant de l'extrait tout en gardant la température du bain d'eau à 40°C pour éviter toute décomposition des substances thermolabiles (Fig. 26).



Figure 26: Extraction des plantes médicinales au Rotavapor

#### d. Stockage et estimation de quantité du résidu sec

Une fois l'extrait est sec, il est récupéré par le minimum du solvant dans des tubes sombres et stocké par la suite au frigo à 4°C pour éviter la photo-dégradation des composants du matériel végétal.

Les rendements des extractions ont été déterminés par la formule suivante :

$$R (\%) = \left( \frac{\text{Masse du résidu sec extrait}}{\text{Masse de la poudre végétale}} \right) \times 100$$

#### ■ Huiles essentielles et principes actifs purifiés

Les huiles essentielles de *Lavandula steachas*, *Lavandula angustifolia* Miller et *Rosmarinus officinalis* proviennent de Nature et découvertes<sup>®</sup> et Vitalba<sup>®</sup> (Sartène, France). L'acide rosmarinique (AR), le linalol et l'harmaline proviennent de Sigma-Aldrich, France.

#### ■ Electrophysiologie en patch-clamp

##### a. Transformation des cellules XL10 Gold avec des Plasmides Cav3

La transformation bactérienne consiste à insérer un plasmide recombinant à l'intérieur d'une bactérie pour que celui-ci soit multiplié et produit en grande quantité. Nous avons utilisé les

souches bactériennes XL10 Gold (Agilent Technologies) car elles possèdent une très grande efficacité de transformation et une capacité accrue pour la transformation de vecteurs de grande taille. Pour cela, des plaques de gélose sélectives ont été chauffées dans un incubateur à 37 ° pendant 30 minutes. Les flacons des cellules XL10 Gold chimiquement compétentes ont été décongelés et 10 g d'ADN ont ensuite été ajoutés dans un flacon de cellules XL10 Gold et mélangés doucement. Les flacons ont été placés dans de la glace pendant 45 minutes puis un choc thermique est fait pendant 90 secondes à 42 ° C et ensuite replacés dans de la glace pendant 2 minutes. 500 µl de milieu LB préchauffé ont été ajoutés à chaque flacon. Les flacons ont été hermétiquement fermés et incubés à 37 ° C pendant 1 heure dans un incubateur à agitation à 225 rpm. Le mélange a été ensuite étalé sur une gélose de LB-agar contenant de l'ampicilline ou la kanamycine selon la construction du plasmide. Les plaques ont été incubées pendant une nuit à 37 ° C. Des colonies individuelles ont été prélevées et ajoutées à 3 ml de milieu LB supplémenté avec le facteur de sélection (ampicilline, kanamycine) et placées dans un incubateur à 37 ° C avec agitation (225 rpm) pendant une nuit. La culture de la cellule bactérienne a été utilisée pour l'extraction du plasmide à l'aide du système de plasmide Midiprep (kit Qiagen), selon le protocole du fabricant. L'ADN a été qualifié par mesure de l'absorbance de chaque échantillon à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop, thermoscientific).

### **b. Digestion enzymatique et électrophorèse**

Les différentes préparations d'ADN ont été digérées par les enzymes de restriction PstI et NheI/MLuI. Le mélange de réaction était constitué de 2 µg d'ADN, 2 µl de tampon, 2 µl de BSA 10X, 1 µl d'enzymes et 13 µl d'eau stérile pour atteindre un volume finale de 20 µl. La réaction a eu lieu durant 1 heure à 37°C. Par la suite, les digestions ont été migrées sur gel d'agarose 1% et les bandes ont été comparées à des marqueurs de poids moléculaire. Les préparations d'ADN ont été qualifiées positives lorsqu'il y a eu détection d'un fragment d'une longueur attendue pour la longueur du promoteur inséré.

### **c. Culture cellulaire et transfection**

Les cellules HEK-293 sont cultivées dans du milieu DMEM additionné du GlutaMax et de 10% du sérum de fœtus bovin (FBS) de Invitrogen. La transfection des cellules HEK-293 est effectuée en utilisant du jet-PEI (QBiogen) avec un mélange d'ADN contenant 0.5 % de plasmides codant pour la GFP et 99.5 % de constructions plasmidiques codant pour l'un des trois isoformes; Cav3.1 (Cribbs *et al.*, 1998; Perez-Reyes *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999a; Perez-Reyes *et al.*, 1999; Monteil *et al.*, 2000a; Monteil *et al.*, 2000b), Cav3.2 (Cribbs *et al.*, 1998;

Perez-Reyes *et al.*, 1999), et  $Ca_v3.3$  (Gomora *et al.*, 2002). Deux jours après la transfection, les cellules HEK-293 sont décollées avec de la Versene (Invitrogen) et cultivées à une densité de  $\sim 35 \times 10^3$  cellules par boîte de Pétri de 35 mm pour des enregistrements électrophysiologiques effectués le lendemain.

#### d. Enregistrement de l'activité électrophysiologique

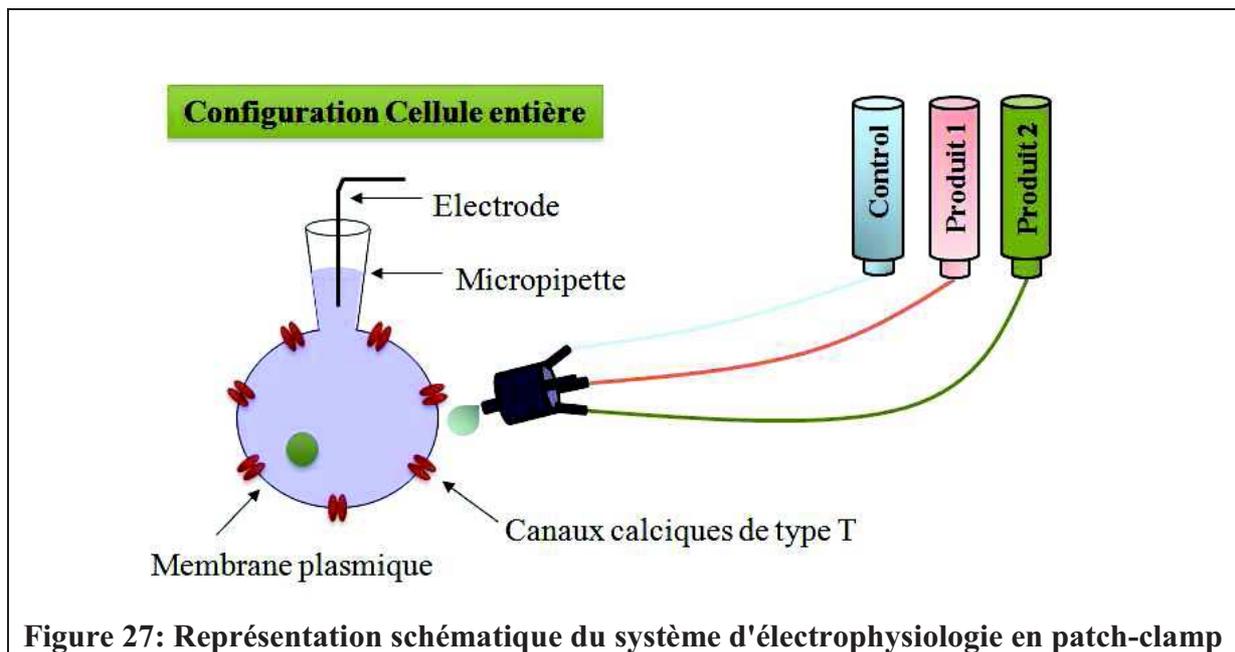
Le patch-clamp est une technique électrophysiologique d'enregistrement des courants ioniques transitant à travers les membranes des cellules vivantes. Elle fut très nettement améliorée par Erwin Neher et Bert Sakmann à Göttingen en 1976, ce qui leur valut le prix Nobel de physiologie et médecine en 1991. Ils furent les premiers à mesurer l'activité d'une seule molécule canalaire, en l'occurrence le canal récepteur à l'acétylcholine. Il peut être utilisé sous deux modes principaux :

- Voltage-Clamp ou mesure de courant en potentiel imposé ;
- Current-Clamp ou mesure de potentiel en courant imposé.

Le principe de la mesure repose sur l'utilisation de la loi d'Ohm  $U=R.I$ , où  $U$  est la tension,  $R$  la résistance et  $I$  le courant. Cette loi est plus souvent écrite  $I=G.E$  où  $E=U$  et  $G=1/R$  est la conductance. En mode voltage clamp, la tension est maintenue constante et le courant  $I$  est mesuré. Les modifications de  $I$  dépendent directement de  $G$ , la grandeur d'intérêt, puisqu'elle dépend directement des propriétés du canal. En mode current clamp, les variations du potentiel de membrane sont mesurées.

Les courants calciques ont été enregistrés en configuration cellule entière à température ambiante en utilisant un amplificateur Axopatch 200B (Molecular Devices). La solution extracellulaire utilisée pour l'enregistrement des courants macroscopiques des CCTT contient (en mM): 135 NaCl, 20 TEACl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, et 10 HEPES (pH ajusté à 7,25 avec du KOH,  $\sim 330$  mOsm). Les pipettes en Borosilicate présentent une résistance typique de 1.5 à 2.5 MOhm lorsqu'elles sont remplies avec la solution interne contenant les éléments suivants (en mM): 140 CsCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 3 Mg-ATP, 0,6 GTPNa, et 3 CaCl<sub>2</sub> (pH ajusté à 7,25 avec KOH  $\sim 315$  mOsm). Les enregistrements sont filtrés à 2 kHz. Chaque solution mère d'extraits de plantes médicinales est diluée à la concentration désirée (<1% solvant) dans la solution extracellulaire. Les produits naturels ont été appliqués en utilisant un dispositif de perfusion par gravité (Fig. 27). Le solvant seul a été utilisé comme contrôle pour les expériences témoins. Les courbes dose-réponse ont été obtenues à partir de l'ajustement des données à

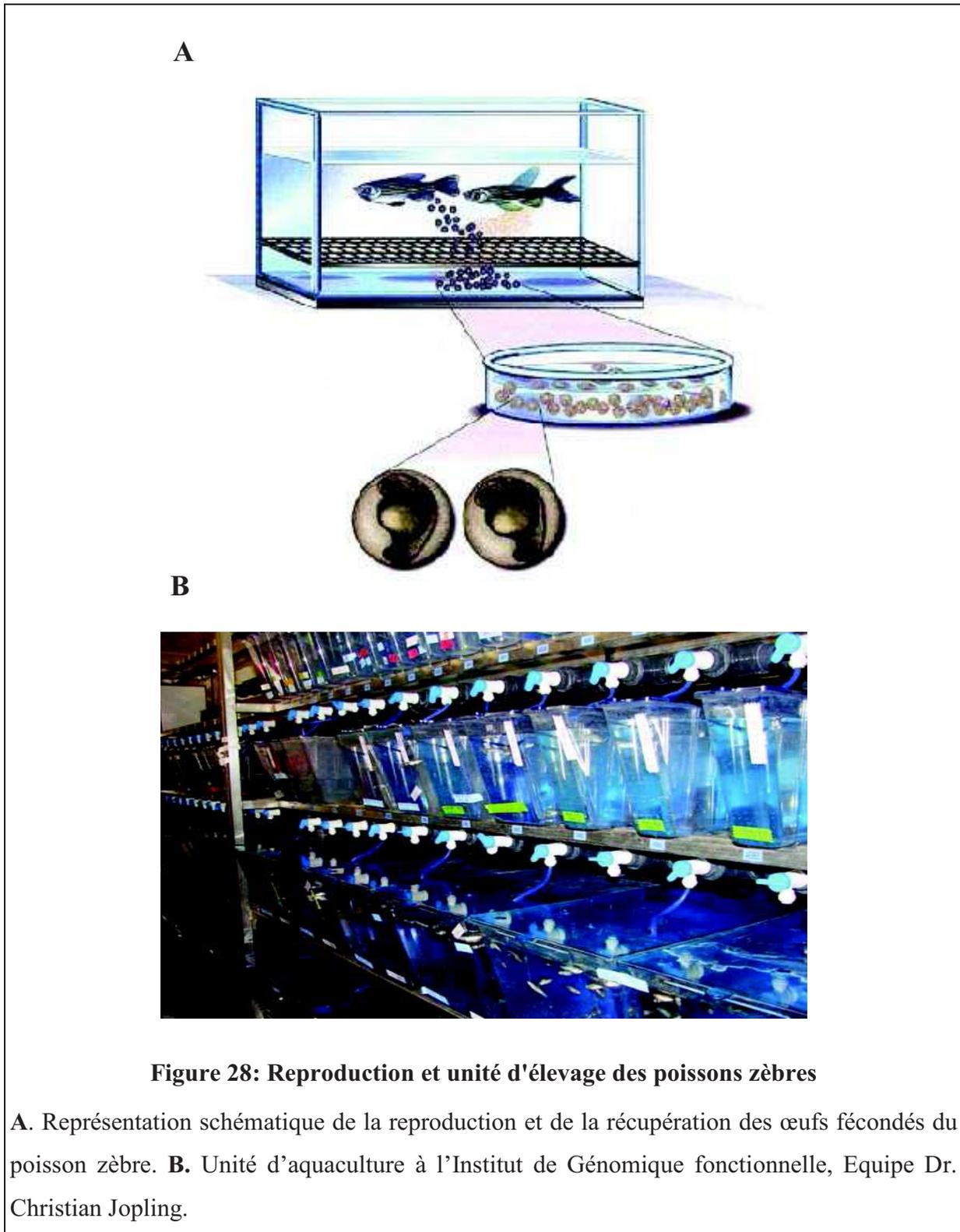
l'équation suivante :  $I/IMAX=100/(1+10^{((LogIC50-Log[compound])*HillSlope)})$ . Les courbes courant-voltage ( $I-V$ ) ont été ajustées en utilisant une combinaison des deux relations Boltzmann et Ohmique, où  $I = Gmax \times (Vm-Vrev) / (1 + exp((Vm-Vm0.5) / Slope factor))$ . De même, les courbes d'inactivation à l'état stable ont été ajustées en utilisant l'équation de Boltzmann où  $I/Imax= 1 / (1 + exp((Vm-Vm0.5) / Slope factor))$ . Les données ont été analysées par Clampfit (Molecular devices) et GraphPad Prism (GraphPad). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM avec « n » indiquant le nombre de cellules utilisées. La signification statistique des résultats a été évaluée par le test de Student t non apparié (\* P <0,05, \*\* P <0,01 et \*\*\* P <0,001).



## D. Poisson zèbre et épilepsie

### a. Modèle animal

Les stocks de la lignée AB (souche sauvage) des poissons zèbres (*Danio rerio*) sont maintenus à une température de 28,5°C sous les conditions standards de l'aquaculture (collaboration avec Christian Jopling, IGF). Les œufs sont prélevés après une reproduction naturelle (Fig. 28) et sont maintenus en milieu « embryon » (NaCl 17 mM, 2 mM de KCl, 1,8 mM Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,12 mM MgSO<sub>4</sub>, tampon HEPES 1,5 mM pH 7,1-7,3 et supplémenté avec 0,6 µM bleu de méthylène). Les larves de 7 JPF sont sacrifiées par administration d'une surdose de la tricaine en fin des expériences.



### **b. Substances pharmacologiques et naturelles**

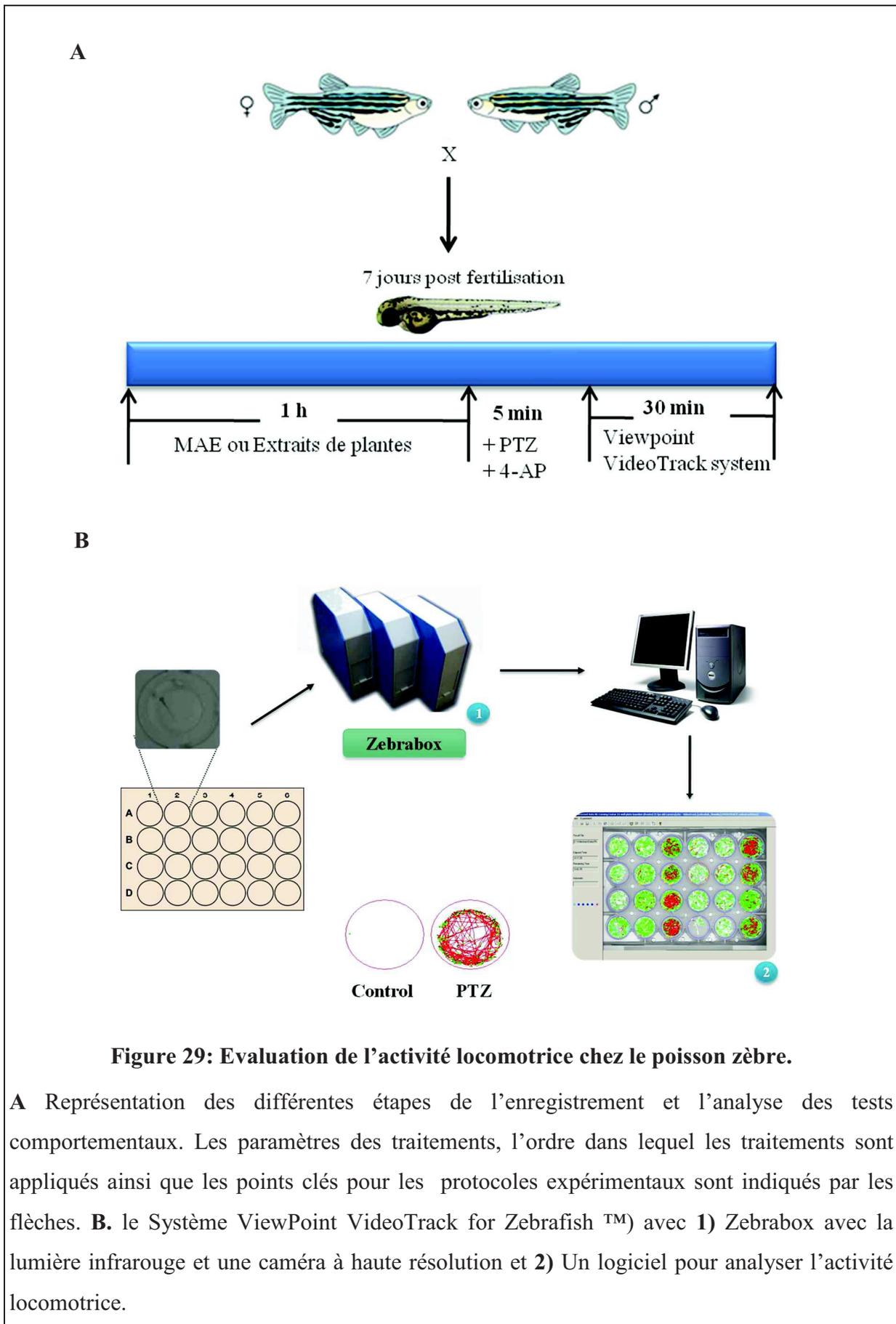
Chaque échantillon (extraits naturels ou molécules purifiées repris dans 100% DMSO) est dilué dans le milieu embryon pour obtenir une concentration finale de DMSO inférieure à 1% (Orellana-Paucar *et al.*, 2012).

### **c. Evaluation toxicologique**

L'objectif de ce test est de déterminer la gamme des concentrations appropriées à tester chez le poisson zèbre pour l'évaluation de l'activité anticonvulsivante. Après incubation avec différentes concentrations de l'échantillon dilué dans un 1 ml de milieu embryon, les larves sont examinées pendant 24 heures pour détecter les éventuels signes de toxicité suivants: absence de réaction après avoir tapoté la plaque, changement dans la fréquence cardiaque, changement au niveau de la circulation sanguine, présence d'œdèmes, la perte de la posture, la paralysie et la mort. Ainsi, la concentration maximale tolérée (CMT) est définie comme la concentration plus forte à laquelle aucun signe de toxicité n'a été observé chez les 6/6 des larves pendant 24 heures d'exposition à l'échantillon (Orellana-Paucar *et al.*, 2012)

### **d. Evaluation de l'activité anticonvulsivante et antiépileptique**

Les larves de poisson zèbre de 7 JPF sont prétraitées pendant 1 heure avec les MAE (VPA), Les inhibiteurs sélectifs des CCTT (TTA-A2) ou avec les extraits des plantes médicinales (*Peganum harmala*, *Lavandula stoechas*, *Citrullus colocynthis* ou *Ricinus cummunis*). Ensuite les larves sont exposées aux substances proconvulsivantes à citer le PTZ ou la 4-AP suivi 5 minutes après par l'enregistrement de l'activité locomotrice (Fig. 29, A). Les larves sont suivies en utilisant le Système ViewPoint VideoTrack for Zebrafish™ (Version 2.3.1.0, Viewpoint, France). Le système est constitué d'une source de lumière infrarouge, une caméra de haute résolution, une vidéo numérique pour capturer des mouvements des larves durant une période de temps définie (30 min dans notre montage expérimental) et un logiciel pour analyser l'activité locomotrice des larves (Fig. 29, B).



### E. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été faites par GraphPad Prism (GraphPad). Les résultats sont présents sous forme de moyenne  $\pm$  SEM avec le « n » indiquant le nombre de cellules utilisées. Les différences significatives entre les moyennes ont été effectuées par le test de Student *t* pour comparer les moyennes de deux échantillons indépendants et/ou appariés et les tests one et two-way Anova pour l'analyse des moyennes sur plusieurs échantillons (\* P <0,05, \*\* P <0,01 et \*\*\* P <0,001).

# Résultats

### III. Résultats

#### A. Extraction des plantes médicinales par solvant

Les rendements des extractions ont été déterminés par la formule suivante :

$$R (\%) = (\text{Masse du résidu sec extrait} / \text{Masse de la poudre végétale}) \times 100$$

Le rendement obtenu varie selon les plantes. *Peganum harmala* a le meilleur rendement qui est de 24.15% contrairement à *Citrullus colocynthis* qui présente le rendement le plus faible avec 8%. Cette variation peut être expliquée par la différence des propriétés génétiques des plantes et de leurs parties intrinsèques (Tableau 5).

**Tableau 5: Rendement obtenu en (%) suite aux extractions des plantes médicinales**

Espèces	Rendement %
<i>Lavandula stoechas</i>	20.25
<i>Rosmarinus officinalis</i>	19.65
<i>Peganum harmala</i>	24.15
<i>Ricinus cummunis</i>	15.21
<i>Citrullus colocynthis</i>	14.54

#### ■ Détermination des ligands actifs sur les canaux calciques de type T par électrophysiologie en Patch-clamp

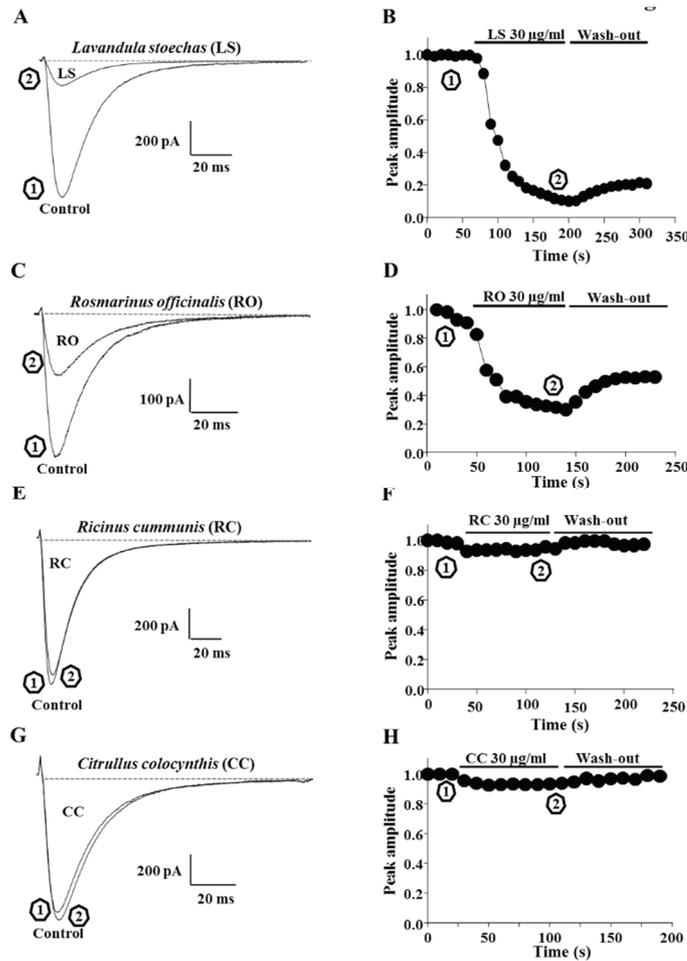
##### a. Etude des effets de la lavande et du Romarin sur les canaux calciques de type T

Les plantes médicinales constituent un réservoir important de substances naturelles pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques. Notre objectif était d'explorer le potentiel thérapeutique de deux extraits de plantes méditerranéennes en étudiant leur capacité à cibler les canaux ioniques et l'excitabilité neuronale. Dans cette étude, nous avons étudié la modulation des CCTT par la lavande (*Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia* Miller) et le romarin (*Rosmarinus officinalis*). Ces deux plantes ont été utilisées depuis des milliers d'années pour leurs effets bénéfiques sur l'anxiété et le sommeil. Les CCTT jouent un rôle important dans l'excitabilité neuronale, les processus sensoriels et le sommeil. Ces canaux sont également impliqués dans des troubles neurophysiologiques à citer l'épilepsie. Dans cette étude, nous avons caractérisé comment les extraits de lavande et de romarin et leurs composés actifs

modulent les propriétés électrophysiologiques des CCTT. Les expériences ont été effectuées sur des canaux de type T recombinants ( $\text{Ca}_v3.2$ ) exprimés dans des cellules HEK-293T et en utilisant la technique de patch-clamp en configuration cellule entière (Annexe 1 « Modulation of T-type calcium channels by Lavender and Rosemary extracts » : Article à Plos One).

#### **i. Modulation des canaux calciques Cav3.2 par les extraits méthanoliques de plantes médicinales**

Dans la première série d'expériences, nous avons testé la capacité de plusieurs plantes médicinales méditerranéennes à moduler les CCTT. Ces expériences ont été effectuées en utilisant des canaux Cav3.2 recombinants. La modulation du canal Cav3.2 était déterminée en mesurant les courants en configuration cellule entière en stimulant les cellules depuis -80 mV à +30 mV. Les cellules sont traitées avec 30  $\mu\text{g/ml}$  des extraits des plantes médicinales. La figure 30 illustre l'efficacité des quatre extraits méthanoliques en montrant Cav3.2 des enregistrements de traces typiques des CCTT. La perfusion des cellules HEK 293 avec *Lavandula stoechas* (LS) a inhibé de manière significative des canaux Cav3.2 (Fig. 29, A et B). L'inhibition moyenne des courants Cav3.2 induite par 30  $\mu\text{g/ml}$  de LS était de 85% ( $I/I_{\text{CTRL}} = 15 \pm 5,2\%$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 6$ ). LS a produit un effet inhibiteur rapide. De même, une inhibition de 42% ( $I/I_{\text{CTRL}} = 68 \pm 2,0\%$ ,  $p < 0,01$ ,  $n = 6$ ) des courant Cav3.2 a été obtenue après traitement des cellules avec l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* (RO) sur les courants de Cav3.2 (Fig 29, C et D). Contrairement à ces résultats, aucune inhibition significative n'a été obtenue après l'application des extraits de *Ricinus communis* (RC) (Fig. 29, E et F,  $I/I_{\text{CTRL}} = 95,7 \pm 1,5\%$ ,  $n = 7$ ) et *Citrullus colocynthis* (CC) (Fig.29, G et H,  $I/I_{\text{CTRL}} = 95,4 \pm 2,1\%$ ,  $n = 6$ ). Ces données nous ont conduits à examiner d'avantage l'efficacité des espèces *Lavandula* et *Rosmarinus* à moduler les canaux Cav3.2.

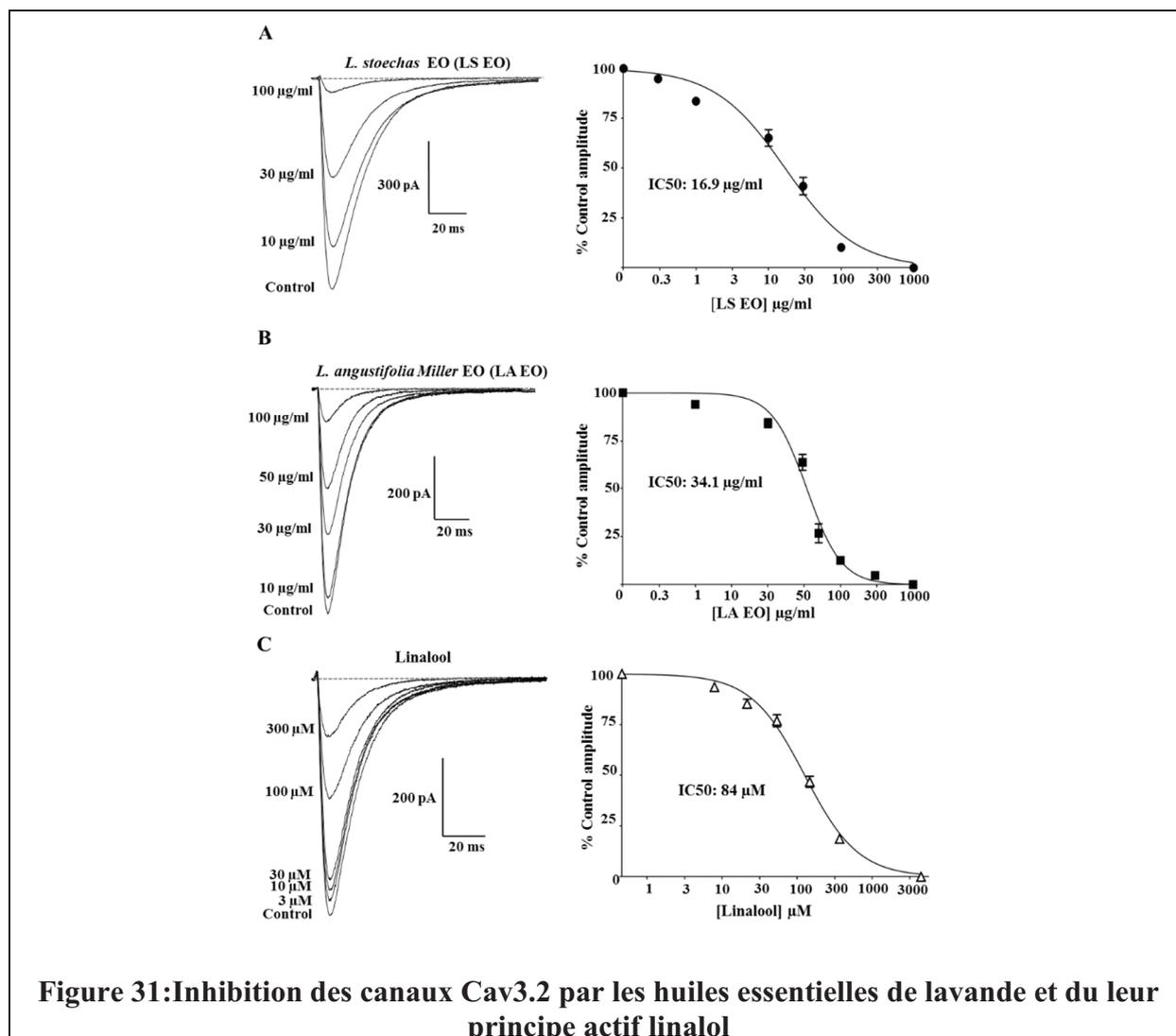


**Figure 30: Modulation des canaux Cav3.2 par les extraits méthanoliques des plantes médicinales**

**ii. L'inhibition du canal Cav3.2 par la Lavande et le linalol est dose-dépendante**

Ensuite, nous avons caractérisé l'effet des huiles essentielles de deux espèces de lavande; *Lavandula stoechas* (LS) et *Lavandula angustifolia* Miller (LA) ainsi que leur principe actif le linalol. Les enregistrements des courants Cav3.2 ont été effectués pendant la perfusion des cellules HEK 239 exprimant les isoformes Cav3.2 avec des concentrations croissantes de LS, LA et le Linalol (Fig. 31). L'inhibition des canaux T par ces trois composés était dépendante de la concentration. L'analyse de la courbe dose-réponse après traitement avec l'huile essentielle de LS nous a permis de déterminer les valeurs de  $IC_{50}$  de  $16,9 \pm 2,9 \mu\text{g/ml}$  ( $n = 7$ ) avec une valeur de pente de  $0,9 \pm 0,1$  (Fig. 31 A). L'isoforme Cav3.2 était également inhibé par des concentrations en série d'huiles essentielles de LA Miller (Fig. 31B). La valeur de  $IC_{50}$  pour l'inhibition des courants Cav3.2 par LA Miller était de  $34,1 \pm 2,9 \mu\text{g/ml}$  (Fig 31 B,  $n = 8$ ) avec une valeur de pente estimée à  $1,9 \pm 0,4$ . Pour

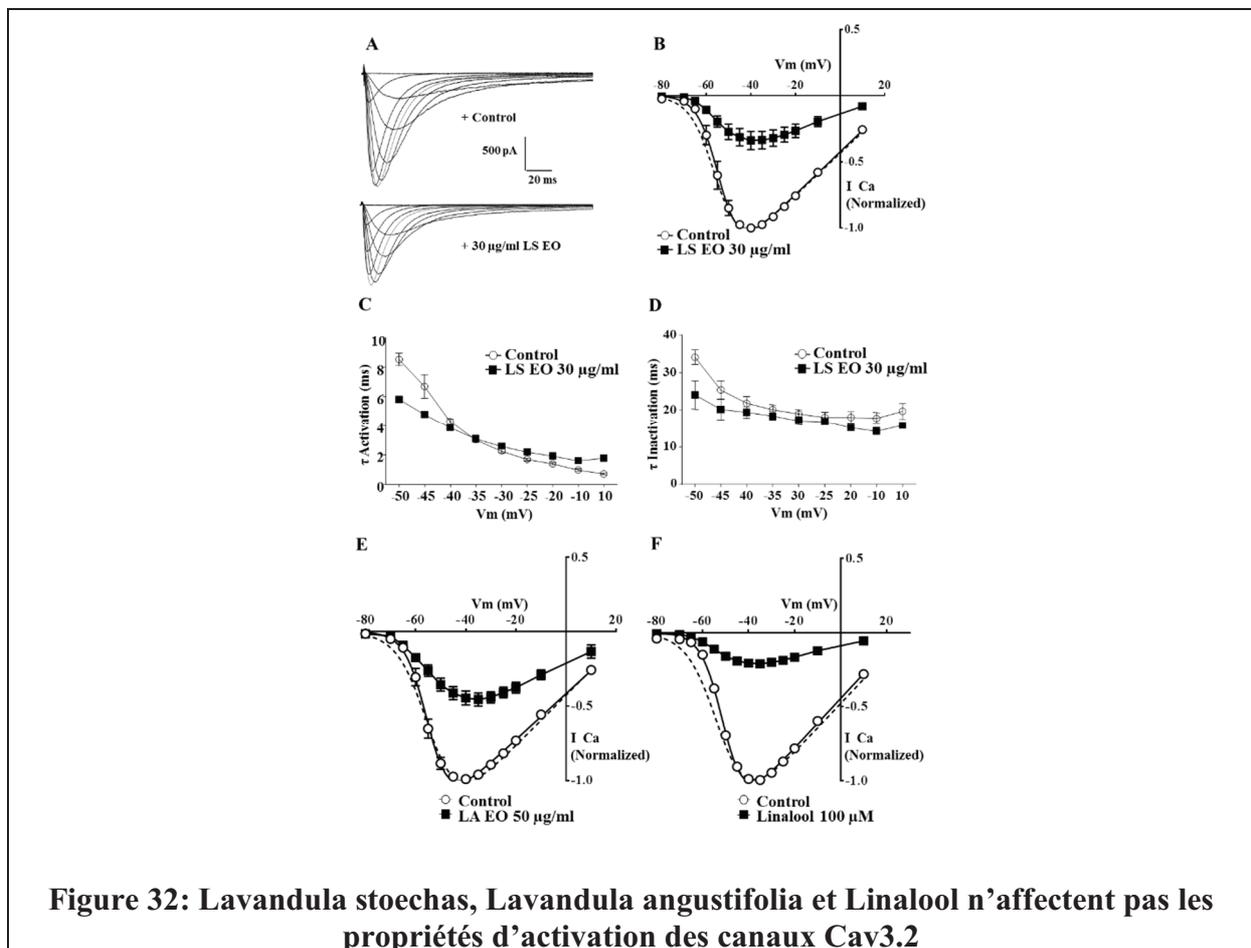
l'inhibition des courants Cav3.2 par le linalol, l'IC<sub>50</sub> était de 84 ± 8,8 μM avec une valeur de pente estimée à 1,01 ± 0,08 (Fig 31 C, n = 7).



### iii. Effets de la lavande et du linalol sur les propriétés d'activation du canal Cav3.2

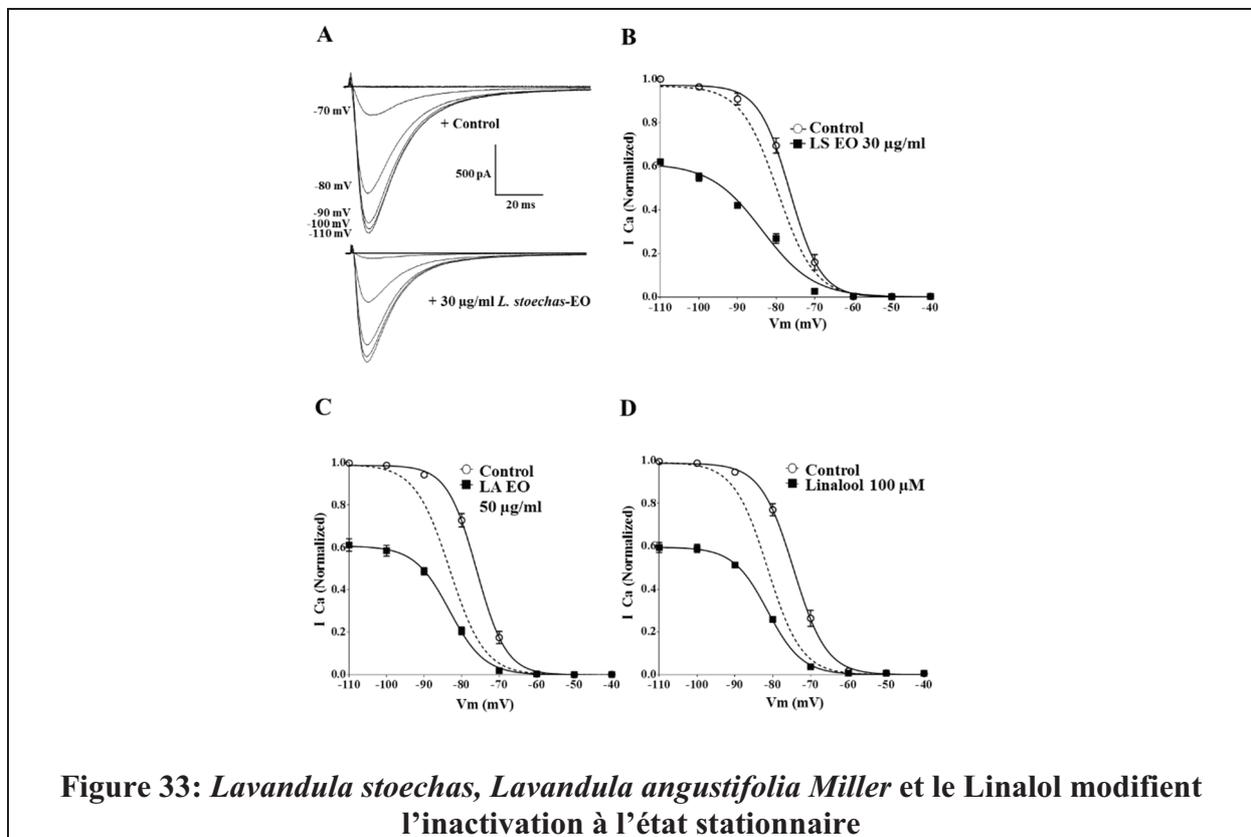
L'inhibition des canaux Cav3.2 par la lavande et son principe actif naturel ; le linalol, peut être liée à des modifications spécifiques dans les propriétés de déclenchement du canal Cav3.2. Par conséquent, nous avons examiné si l'inhibition des CCTT par la lavande pourrait être liée à une modification de la disponibilité du canal ou ses propriétés d'activation. Dans ce but, l'effet inhibiteur de ces composés naturels sur les courants Cav3.2 a été étudié sur une large gamme de potentiels de -80 à +50 mV. Les traces représentant les courants Cav3.2 avant et après traitement avec 30 μg/ml de LS sont représentées dans la figure 32 A (Traces supérieures et inférieures, respectivement), ainsi que la courbe courant-potentiel (*I-V*) correspondante (Fig 32 B). Les courbes *I-V* montrent que 30 μg/ml de LS inhibent l'amplitude des courants Cav3.2 à

tous les potentiels de membrane (figure 32 B, n = 6). En outre, l'application de l'huile essentielle de LS n'a pas changé de façon significative la courbe d'activation des canaux Cav3.2. La valeur  $V_{0.5}$  pour l'activation dans les conditions contrôles était de  $-53,8 \pm 0,4$  mV et de  $-54,9 \pm 0,4$  mV durant l'application de LS, n'indiquant aucun changement significatif dans les propriétés d'activation à l'état stable en présence de LS (n = 6, p = valeur de 0,11, Fig 32 B). En outre, les traces des courants Cav3.2 fittées, tel que présenté sur la figure 32A, ont montré que ni les cinétiques d'activation ni d'inactivation des canaux Cav3.2 ont été modifiées après un traitement avec la lavande (Fig 32, C et D). Des résultats similaires ont été obtenus suite la perfusion de 50  $\mu$ g/ml d'huile essentielle de LA Miller (Fig. 32 E, n = 5) et de 100  $\mu$ M de Linalol (Fig. 32 F, n = 6). L'inhibition des courants Cav3.2 après traitement avec LA Miller et le Linalol a été conservée à tous les potentiels de membrane imposés. Le potentiel de seuil pour l'activation et le potentiel de membrane du courant maximal du pic sont les mêmes avant et pendant l'application de LA Miller, sans avoir un changement significatif sur la courbe d'activation des courants Cav3.2 ( $V_{0.5Ctrl} = -54,8 \pm 0,4$  mV et  $V_{0.5LAMiller} = -54,1 \pm 0,3$  mV, n=5, p=0.19). Les mêmes résultats on était obtenus pour le linalol ( $V_{0.5Ctrl} = -50.5 \pm 0.7$  mV and  $V_{0.5Linalool} = -52.3 \pm 0.8$  mV, n=6, p=0.14).



**iv. Effets de La Lavande sur l'inactivation à l'état stable des canaux Cav3.2**

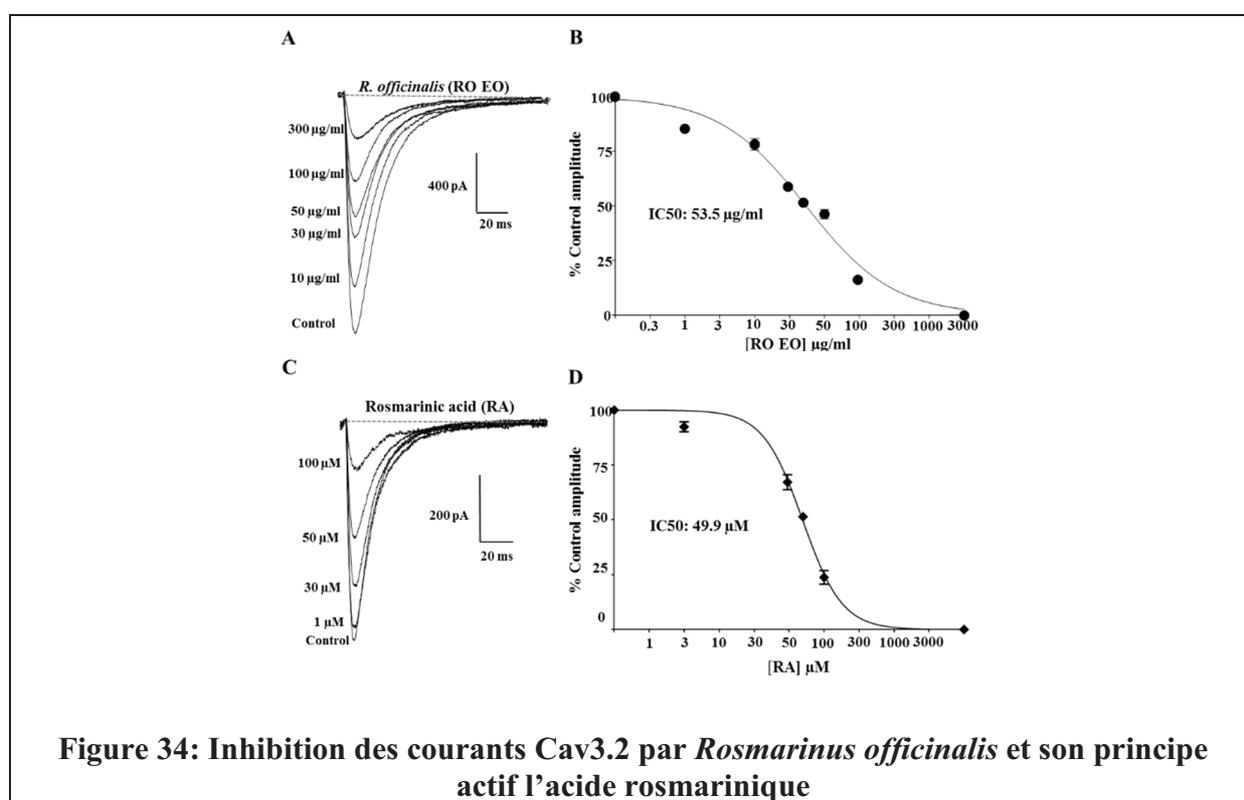
Nous avons ensuite examiné si la lavande et ses composants peuvent modifier les propriétés d'inactivation à l'état stationnaire des canaux Cav3.2. Une famille des courants Cav3.2 évoquée par le protocole conçu pour mesurer l'inactivation à l'état d'équilibre est représentée dans la figure 33, A, avant (traces supérieures) et pendant l'application de 30 µg/ml de LS (traces inférieures). LS (30 µg/ml) produit un effet inhibiteur sur la conductance maximale des canaux Cav3.2 ainsi qu'un changement hyperpolarisant significatif des propriétés d'inactivation à l'état d'équilibre de  $-75,8 \pm 1,1$  mV en conditions contrôles vers  $-81,3 \pm 1,0$  mV après perfusion de LS (n = 6, p <0,05, Fig. 33, B). Des résultats similaires ont été obtenus après application de LA Miller (50 µg/ml, Fig. 33, C) et du linalol (100 µM, Fig. 33, D) avec un déplacement significatif de la courbe d'inactivation à l'état stable de  $-75,9 \pm 0,7$  mV à  $-83,1 \pm 0,8$  mV pour LA Miller (n = 5, p <0,001) et de  $-74,6 \pm 0,7$  mV à  $-81,3 \pm 0,6$  mV pour le Linalol (n = 6, p <0,001). Ces données démontrent que les composants de la lavande inhibent les courants Cav3.2 en diminuant leur conductance maximale et en induisant un changement négatif de la courbe d'inactivation, ce qui suggère que les composés de la lavande pourraient interagir avec les CCTT à l'état inactivé.



**Figure 33: *Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia* Miller et le Linalol modifient l'inactivation à l'état stationnaire**

v. Inhibition des canaux Cav3.2 par *Rosmarinus officinalis* et l'acide rosmarinique

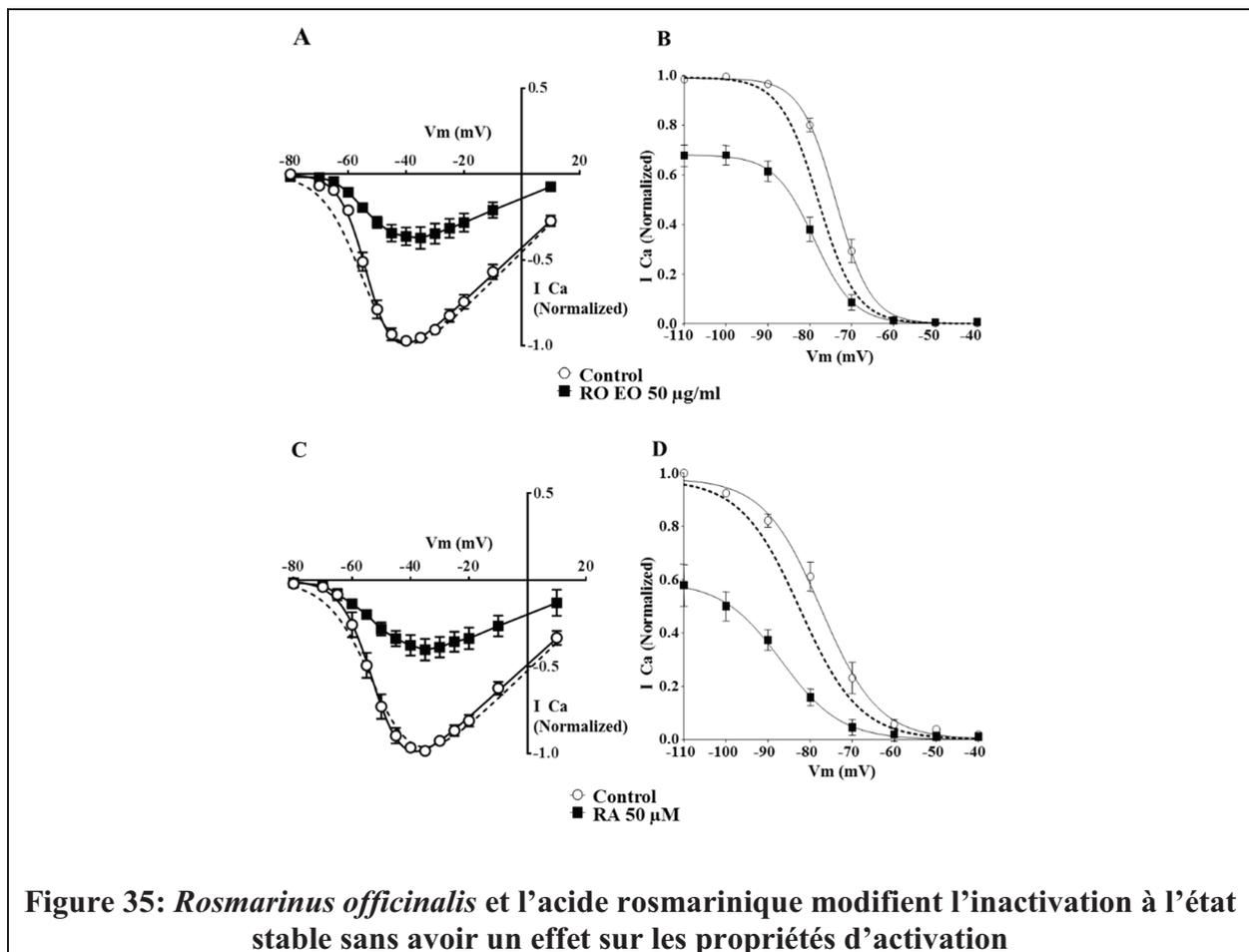
Ensuite, nous avons étudié les effets de *Rosmarinus officinalis* (RO) et son principe actif l'acide rosmarinique (RA), un ester d'acide caféïque, sur la modulation des canaux Cav3.2. Le courant Cav3.2 a été inhibé RO d'une manière dépendante de la concentration (Fig. 34, A, n = 6). L'inhibition des Cav3.2 par RO a généré une IC<sub>50</sub> estimée à 53,5 ± 3,7 µg/ml avec une valeur de pente de 0,7 ± 0,05 (Fig 34, B, n = 6). De manière similaire, RA inhibe les courants Cav3.2 de manière dépendante de la concentration. La valeur IC<sub>50</sub> était de 48,2 ± 1,4 µM avec une valeur de pente de 1,5 ± 0,2 (Fig 35, C et D, n = 6).



vi. Effet de *Rosmarinus officinalis* et de l'acide rosmarinique sur l'activation et l'inactivation des canaux Cav3.2

Par la suite, nous avons étudié l'effet de RO et du RA sur les propriétés d'activation et d'inactivation des canaux Cav3.2. L'analyse des traces des courants et des courbes *I-V* a montré que RO (50 µg/ml) a inhibé les courants Cav3.2 à tous les potentiels de membrane imposés sans modifier les propriétés d'activation à l'état stable ( $V_{0.5Control} = -52,8 \pm 0,4$  mV,  $V_{0.5RO} = -53.5 \pm 0,5$  mV, n = 7, p = 0,3, Fig. 35, A). Des résultats similaires ont été obtenus après traitement avec 50 µM d'acide rosmarinique ( $V_{0.5Control} = -51,8 \pm 0,6$  mV,  $V_{0.5RA} = -50,6 \pm 1,3$  mV, n = 6, p = 0,4, Fig 35, C). Pour élucider d'avantage les mécanismes de blocage du RO et du RA,

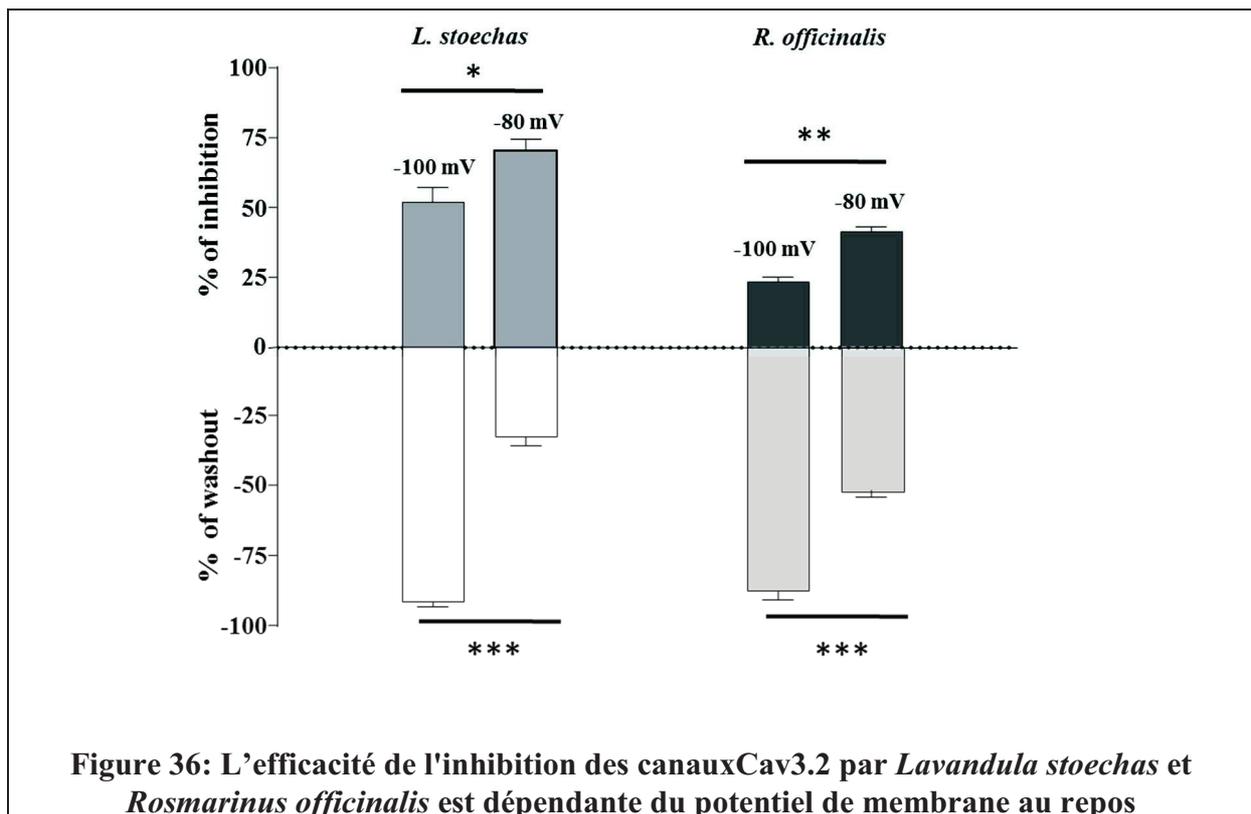
l'inactivation l'état d'équilibre a été déterminée en l'absence et présence de ces substances naturelles. Ces expériences ont montré qu'un traitement avec 50 µg/ml de RO réduit la conductance maximale de canaux Cav3.2 et déplace négativement leur courbe d'inactivation vers des potentiels plus négatifs ( $V_{0.5Control} = -73,7 \pm 0,9$  mV,  $V_{0.5RO} = -77,8 \pm 1,1$  mV,  $n = 7$ ,  $p < 0,05$ , Fig. 35, B). L'application de 50 µM de RA induit un transfert de la courbe d'inactivation vers des potentiels de membrane plus négatifs ( $V_{0.5Control} = -77,4 \pm 0,8$  mV,  $V_{0.5RA} = -82,4 \pm 1,2$  mV,  $n = 6$ ,  $p < 0,01$ , Fig 35, D). De plus, ni les cinétiques d'activation ni d'inactivation ont été modifiées après traitement des canaux Cav3.2 avec RO et RA (données non présentées).



**vii. *Lavandula stoechas* et *Rosmarinus officinalis* se lient préférentiellement à l'état inactivé des canaux calciques de type T**

Un nombre croissant d'études ont montré que les inhibiteurs des CCTT se lient à / stabilisent les ces canaux à leur état inactivé. En effet, le déplacement négatif induit par la lavande et le romarin suggère que ces composés naturels se lient préférentiellement à l'état inactivé des Canaux Cav3.2, en déplaçant ainsi l'état d'équilibre vers des potentiels loin des potentiels

membranaires d'ouverture des Canaux. Pour mieux évaluer si la lavande et le romarin se lient à l'état inactivé des CCTT, nous avons mesuré l'inhibition des courants Cav3.2 par les extraits de LS et RO à des potentiels de maintien de -100 et -80 mV (Fig.36, Graphe supérieur). Nos résultats montrent que l'inhibition par LS (20 µg/ml) a été significativement plus importante lorsque les cellules étaient maintenues à des potentiels de -80 de mV ( $70 \pm 4,4\%$ ,  $n = 6$ ) par rapport à -100 mV ( $51 \pm 5,3\%$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ). Les mêmes résultats ont été obtenus après l'application de RO (20 µg/ml) avec  $41,3 \pm 1,7\%$  d'inhibition à -80 mV et  $23,4 \pm 1,7\%$  d'inhibition à -100 mV ( $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ). L'efficacité du rinçage a été examinée pour les deux extraits à -100 et -80 mV (Fig. 36, graphe inférieur) et, inversement, le rinçage est plus efficace à des potentiels de -100 mV ( $LS_{\text{rinçage}} = 91,6 \pm 1,8\%$ ,  $RO_{\text{rinçage}} = 87,7 \pm 3,0\%$ ) par rapport à -80 mV ( $LS_{\text{rinçage}} = 32,6 \pm 3,1\%$ ),  $RO_{\text{rinçage}} = 51,7 \pm 2,5\%$ ,  $p < 0,001$ ). Pris ensemble, nos résultats suggèrent que ces composés naturels se lient préférentiellement, et stabilisent, les canaux Cav3.2 à l'état inactivé afin d'exercer leurs effets thérapeutiques.



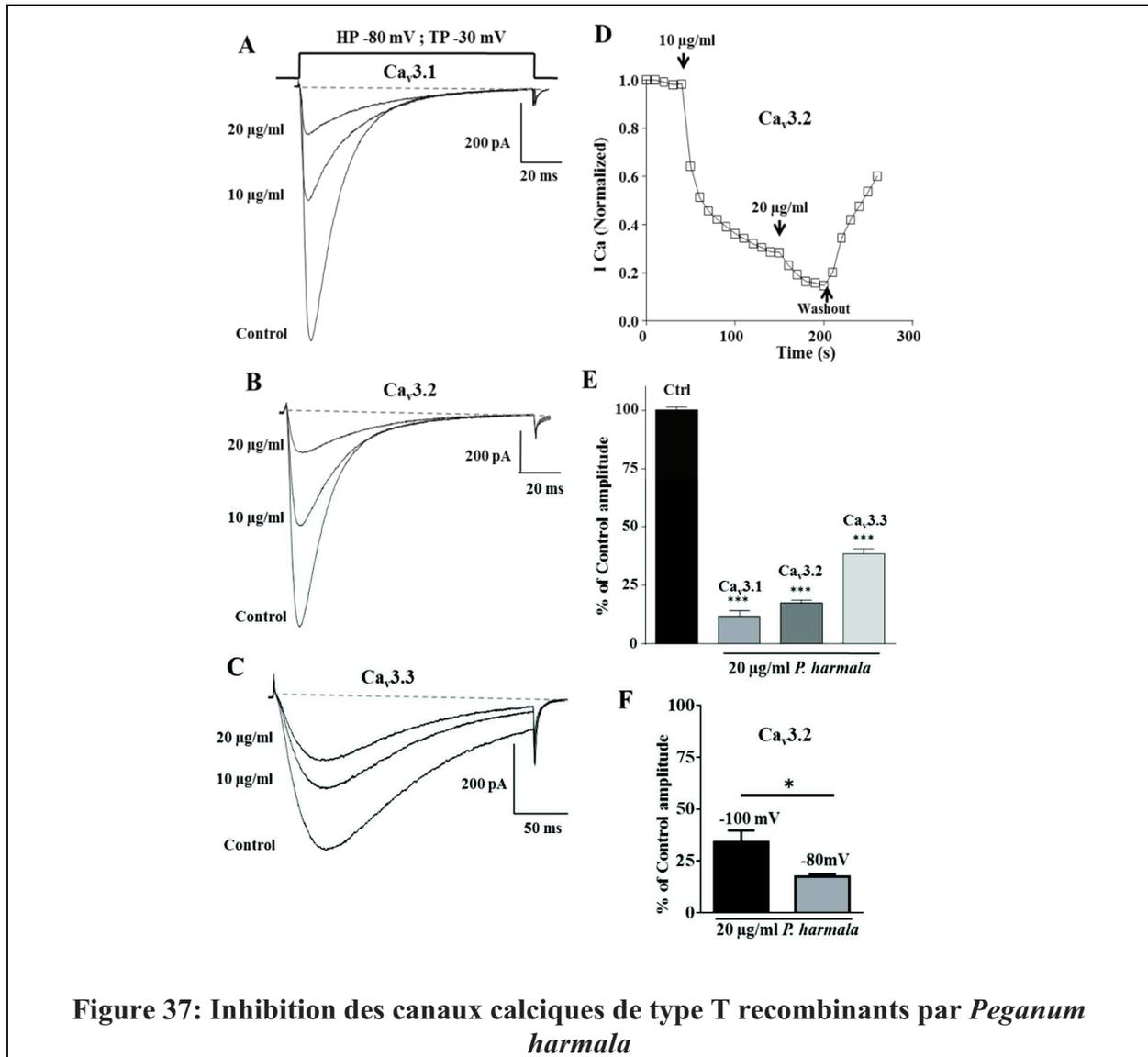
**b. Etude de la modulation des canaux calciques de type T par *Peganum harmala* et son principe actif l'harmaline**

*Peganum harmala*, aussi appelé Harmal, est une plante méditerranéenne qui a été utilisée pendant des siècles à des fins thérapeutiques. Un nombre croissant d'études a montré les effets pharmacologiques divers de cette plante médicinale qui sont comprises entre effets

cytotoxiques et neuroprotecteurs. Le but de cette étude était d'examiner les effets de *Peganum harmala* et son principe actif purifié l'harmaline, sur la modulation des CCTT, Cav3.1 ( $\alpha 1G$ ), Cav3.2 ( $\alpha 1H$ ) et Cav3.3 ( $\alpha 1I$ ), qui sont une sous-famille des CCDV et qui apportent d'importantes contributions aux processus sensoriels, à l'activité pacemaker et à l'excitabilité neuronale. (Annexe 2 : T-type calcium channels are inhibited by *Peganum harmala* and its  $\beta$ -carboline alkaloid harmaline)

***i. Inhibition des canaux calciques de type T recombinants par *Peganum harmala****

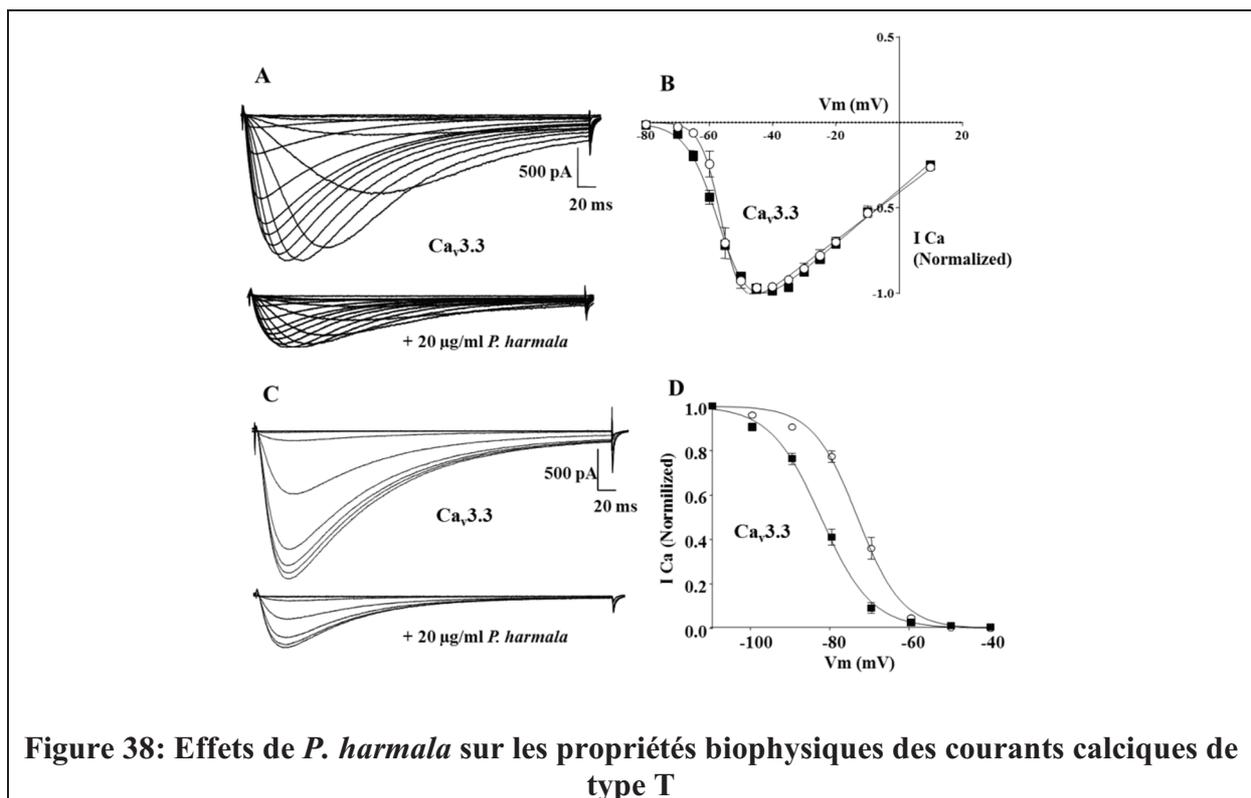
Au début, nous avons vérifié si l'extrait brut de *P. harmala* peut moduler les CCTT. Pour cela, nous avons traité les cellules HEK293 exprimant les trois isoformes Cav3; Cav3.1 (Fig. 37, A), Cav3.2 (Fig. 37, B) et Cav3.3 (Fig. 37, C) en utilisant deux concentrations de l'extrait méthanolique de *P. harmala* (10 et 20  $\mu\text{g/ml}$ ). L'enregistrement des traces typiques des trois isoformes des CCTT a été provoqué en imposant des potentiels test de -80 à -30 mV à partir d'un potentiel de maintien de -80 mV. Nous avons constaté que 20  $\mu\text{g/ml}$  de *P. harmala* inhibe significativement les trois isoformes Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3 avec des valeurs d'inhibition qui ont été estimées à  $88,15 \pm 2,39$ ,  $82,48 \pm 1,09$  et  $61,70 \pm 2,22\%$  respectivement (Fig. 37, A-C, n = 6). Une courbe représentant les courants Cav3.2 (Fig. 37, D) illustre l'évolution temporelle de l'effet inhibiteur pendant l'application de *P. harmala*. Le rinçage n'a pas inversé complètement l'extrait méthanolique (données non présentées pour Cav3.1 et Cav3.3). En outre, la comparaison de l'effet inhibiteur de *P. harmala* sur les trois isoformes des canaux T a révélé que les isoformes Cav3.1 et Cav3.2 sont plus sensibles à l'extrait naturel par rapport au Cav3.3 (Fig37, E, n = 6). Ensuite, l'inhibition des courants T de *P. harmala* a été examinée pour des potentiels de -100 et -80 mV (Fig. 37, F). Les résultats montrent que l'inhibition de l'isoforme Cav3.2 par 20  $\mu\text{g/ml}$  de *P. harmala* est plus importante lorsque les cellules ont été maintenues à -80 mV ( $82,48 \pm 1,09$ , n = 6) par rapport à -100 mV ( $65,86 \pm 7,56\%$ , n = 6), ce qui suggère que les alcaloïdes de *P. harmala* se lient préférentiellement à l'état inactivé des CCTT



**ii. Effets de *P. harmala* sur les propriétés biophysiques des courants calciques de type T**

Ensuite, nous avons examiné si l'inhibition des canaux T par *P. harmala* implique des modifications de leurs propriétés biophysiques (Fig. 38). L'exposition à 20 µg/ml d'extrait de *P. harmala* modifie légèrement la courbe d'activation des CCTT (Fig. 38, A-B). Les valeurs de la demi-activation ( $V_{0.5}$ ) des courants Cav3.3 ont été estimées à  $-55,85 \pm 0,38$  mV en l'absence de l'extrait et à  $-56,11 \pm 0,35$  mV en présence de 20 µg/ml de *P. harmala* (Fig. 38, B). De même, aucun effet significatif n'a été obtenu après l'application de *P. harmala* sur les isoformes Cav3.1 et Cav3.2. Les valeurs de  $v_{0.5}$  des deux isoformes sont de  $-48,40 \pm 0,65$  mV en condition contrôle et de  $-49,8 \pm 0,95$  mV en présence de *P. harmala* pour Cav3.1 et de  $-51,92 \pm 0,47$  mV en condition contrôle et  $-52,11 \pm 0,46$  en présence de l'extrait pour Cav3.2. Nous avons étudié également l'effet de *P. harmala* sur les propriétés d'inactivation à l'état stable des canaux T

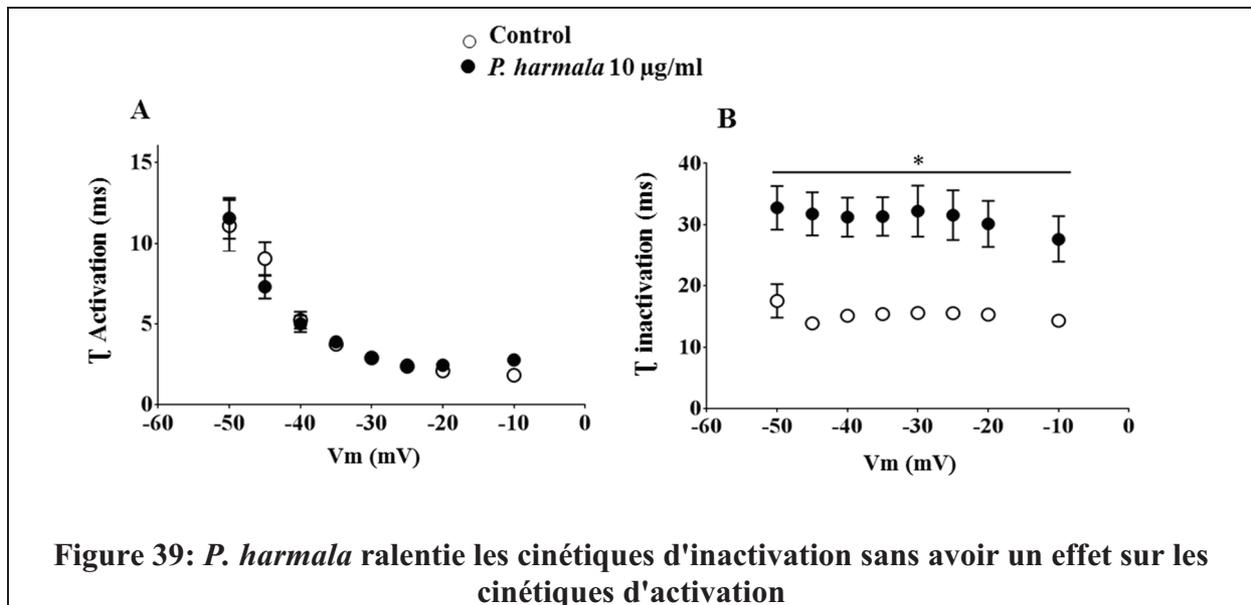
(Fig.38, C-D, n = 6). Nous avons remarqué que l'amplitude du courant Cav3.3 dépend fortement du potentiel de membrane au repos (Fig 38, C). L'analyse des propriétés d'inactivation à l'état stable de l'isoforme Cav3.3 montre un changement important de  $\sim 10$  mV vers des potentiels plus négatifs après traitement avec 20  $\mu\text{g/ml}$  *P. harmala*. ( $V_{0.5\text{contrôle}} = -73,50 \pm 0,36$  mV,  $V_{0.5P.harmala} = -82,71 \pm 0,35$  mV, Fig.38, D, n = 6). En revanche, 20  $\mu\text{g/ml}$  de *P. harmala* n'a pas affecté la pente de l'inactivation à l'état d'équilibre des Cav3.3 qui sont estimés à  $5,59 \pm 0,31$  et  $6,31 \pm 0,32$  mV en l'absence et la présence de l'extrait, respectivement (n = 6). Des résultats similaires ont été obtenus pour Cav3.1 et Cav3.2 avec un déplacement négatif de  $\sim 7$  mV et des valeurs  $V_{0.5}$  pour les deux isoformes estimées à  $-73,89 \pm 0,33$  par rapport à  $-79,90 \pm 0,51$  mV pour Cav3.1 et  $-72,49 \pm 0,29$  par rapport à  $-79,37 \pm 0,45$  mV pour Cav3.2 (n = 5). En accord avec les résultats obtenus pour Cav3.3, l'extrait d'harmal n'a pas affecté le facteur de pente de l'inactivation à l'état stable des isoformes Cav3.1 et Cav3.2. Pour Cav3.1, les valeurs de pente sont  $4,83 \pm 0,28$  vs  $4,90 \pm 0,47$  mV (n = 5), et  $4,28 \pm 0,25$  vs  $4,24 \pm 0,45$  pour Cav3.2 (n = 5), en l'absence et la présence de l'extrait de *P. harmala*, respectivement (données non présentées).



### iii. Effet de *Peganum harmala* sur les cinétiques des canaux calciques de type T

Ensuite, nous avons examiné si *Peganum harmala* peut affecter les cinétiques des canaux T. Les courants sont provoqués par des impulsions de pas de série allant de -80 à 50 mV à partir

d'un potentiel de maintien de -80 mV et mesuré avant et après traitement avec 10 µg/ml de *P. harmala*. Nous avons analysé les courants T en fittant les traces à des équations double exponentielles correspondant aux cinétiques d'activation et d'inactivation. Nos résultats montrent que 10 µg/ml de *P. harmala* induit un ralentissement des cinétiques d'inactivation, sans avoir un effet la cinétique d'activation ne sont pas affectés (Fig.39 n = 5).



#### iv. Inhibition des canaux calciques de type T par l'harmaline

Nous avons ensuite examiné la capacité de l'harmaline à moduler les CCTT exprimés de manière stable par des cellules HEK239. Les courants sont enregistrés en configuration cellule-entière suite à la superfusion de 50 µM d'harmaline. Tous les courants de type T calciques ont été inhibés par l'harmaline (Fig. 40, A-F). 50 µM d'harmaline inhibe de manière significative les trois isoformes Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3 avec des valeurs d'inhibition estimées à  $59,27 \pm 3,75$ ,  $62,24 \pm 2,09$  et  $36,23 \pm 1,57\%$ , respectivement (Fig. 40. A-E, n=5-8). Une courbe représentative de l'isoforme Cav3 illustre l'évolution temporelle de l'effet inhibiteur avant et après traitement avec l'Harmaline et après rinçage avec une solution de contrôle qui n'inverse pas complètement l'effet inhibiteur. En outre, la comparaison de l'effet inhibiteur de l'harmaline sur les canaux de type T a révélé que les deux Cav3.1 et Cav3.2 sont plus sensibles à la molécule naturelle que l'isofome Cav3.3.

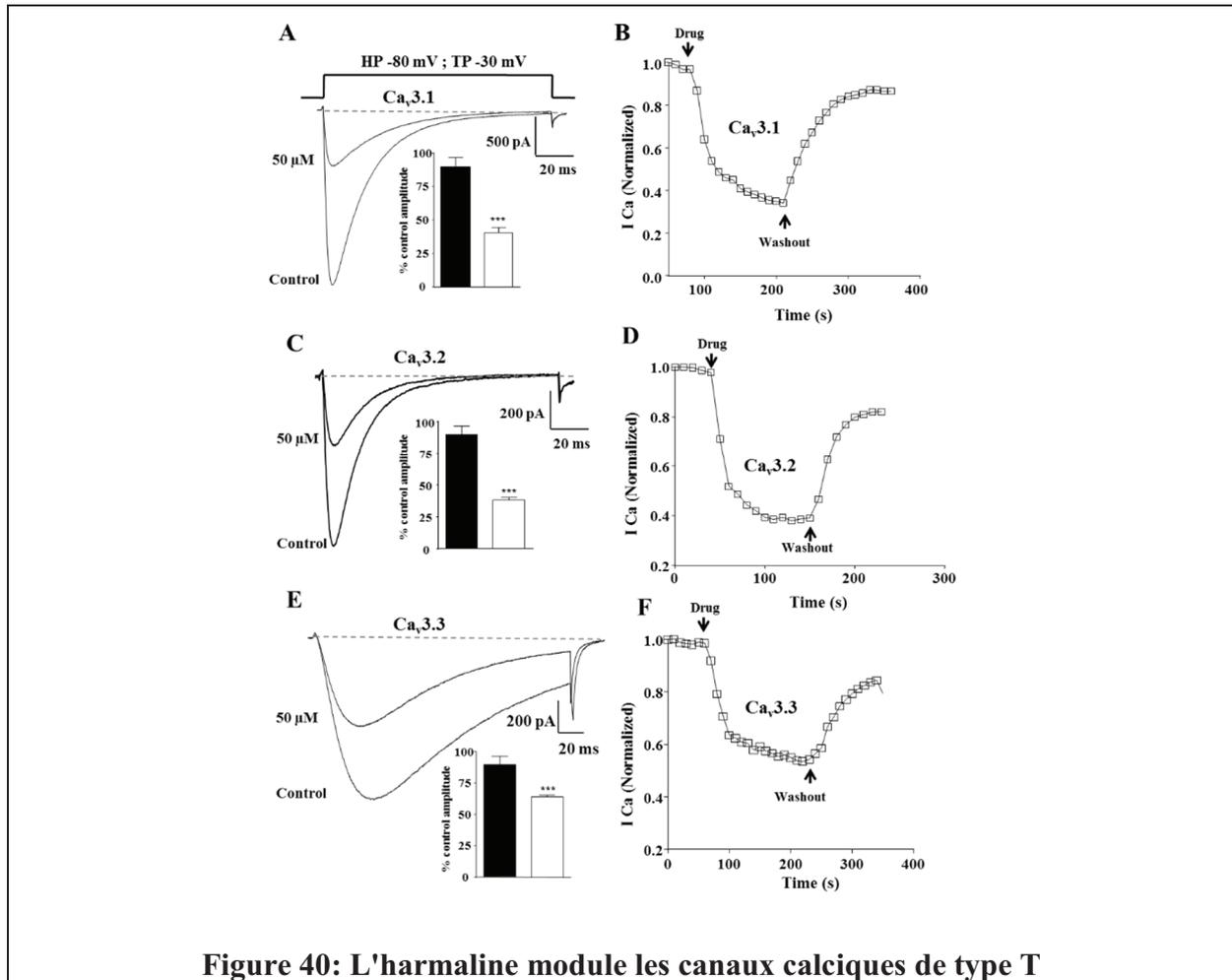
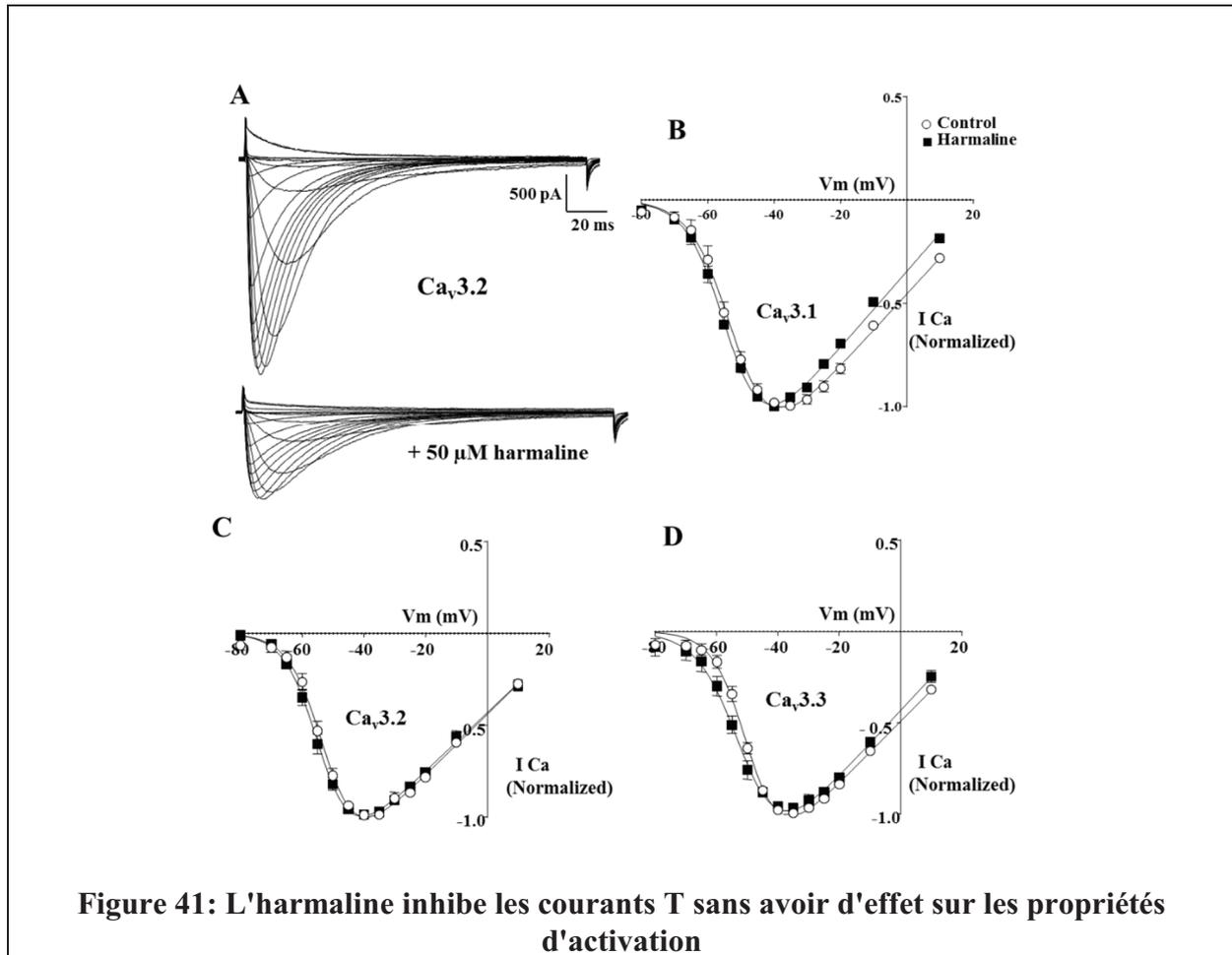


Figure 40: L'harmaline module les canaux calciques de type T

**v. L'effet de l'harmaline sur la courbe *courant-voltage* des canaux calciques de type T**

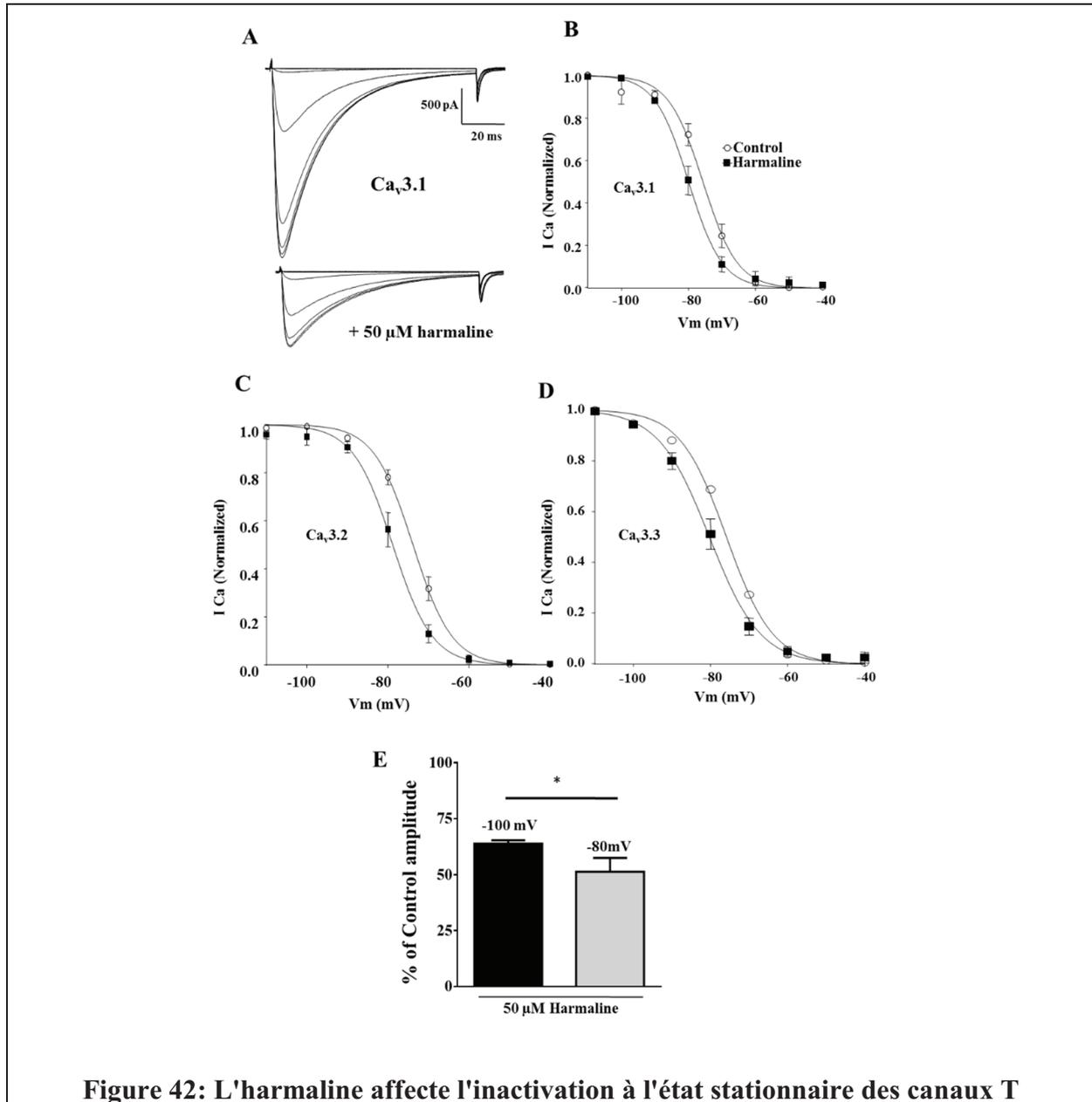
Les canaux de type T sont inhibés par *P. harmala* et son alcaloïde l'harmaline sur la gamme de potentiel testée. Nous avons examiné si cet effet inhibiteur implique une modification des propriétés biophysiques des canaux Cav3 (Fig.41, A-D). Les traces représentant les courants Cav3.2 avant et après traitement avec 50 μM d'harmaline sont présentées à titre de comparaison (Fig. 41, A). L'analyse des courbes *courant-voltage* montrent un changement non significatif de ~ 3 mV en demi-activation ( $V_{0.5}$ ). Les valeurs de  $V_{0.5}$  sont de  $V_{0.5\text{control}} = -51,65 \pm 0,56$  mV et  $V_{0.5\text{harmaline}} = -54,10 \pm 0,41$  mV pour Cav3.1 (Fig. 41, B, n = 6),  $V_{0.5\text{control}} = -52,38 \pm 0,31$  et  $V_{0.5\text{harmaline}} = -53,95 \pm 0,41$  mV pour Cav3.2 (Fig. 41, C, n = 6) et  $V_{0.5\text{control}} = -49,20 \pm 0,40$  et  $V_{0.5\text{harmaline}} = -51,13 \pm 0,76$  mV pour Cav3.3 (Fig. 41, D, n = 8).



**vi. Effet d'harmaline sur les propriétés d'inactivation des canaux calciques de type T**

Nous avons examiné si l'harmaline affecte l'inactivation à l'état stationnaire des CCTT. Les traces des courants représentant les canaux Cav3.1 avant et après l'application de 50 μM d'harmaline sont présentées à titre de comparaison (Fig. 42, A). Le traitement avec 50 μM d'harmaline déplace négativement la courbe d'inactivation des trois isoformes de ~ 7 mV (Fig. 42, B-D). Les valeurs de  $V_{0.5inact}$  sont de  $74,63 \pm 0,42$  et  $80,31 \pm 0,56$  mV pour Cav3.1 (Fig.42, B, n = 5),  $75,23 \pm 0,31$  vs  $82,23 \pm 0,23$  mV pour Cav3.2 (Fig.42, C, n = 6), et  $74,63 \pm 0,25$  vs  $79,92 \pm 0,41$  mV pour Cav3.3 (Fig.42, D, n = 8), en l'absence et la présence d'harmaline, respectivement. L'effet négatif induit par l'harmaline suggère que cette molécule se lie préférentiellement à l'état inactivé des CCTT, déplaçant ainsi l'état d'équilibre vers des potentiels membranaires loin des potentiels d'ouverture du canal. Pour examiner d'avantage cette hypothèse, nous avons utilisé une méthode directe en mesurant l'inhibition du courant à différents potentiels de maintien (HPs). L'inhibition des courants Cav3.2 par l'harmaline a été examinée en appliquant des protocoles, dans lesquels le potentiel de maintien était maintenu à

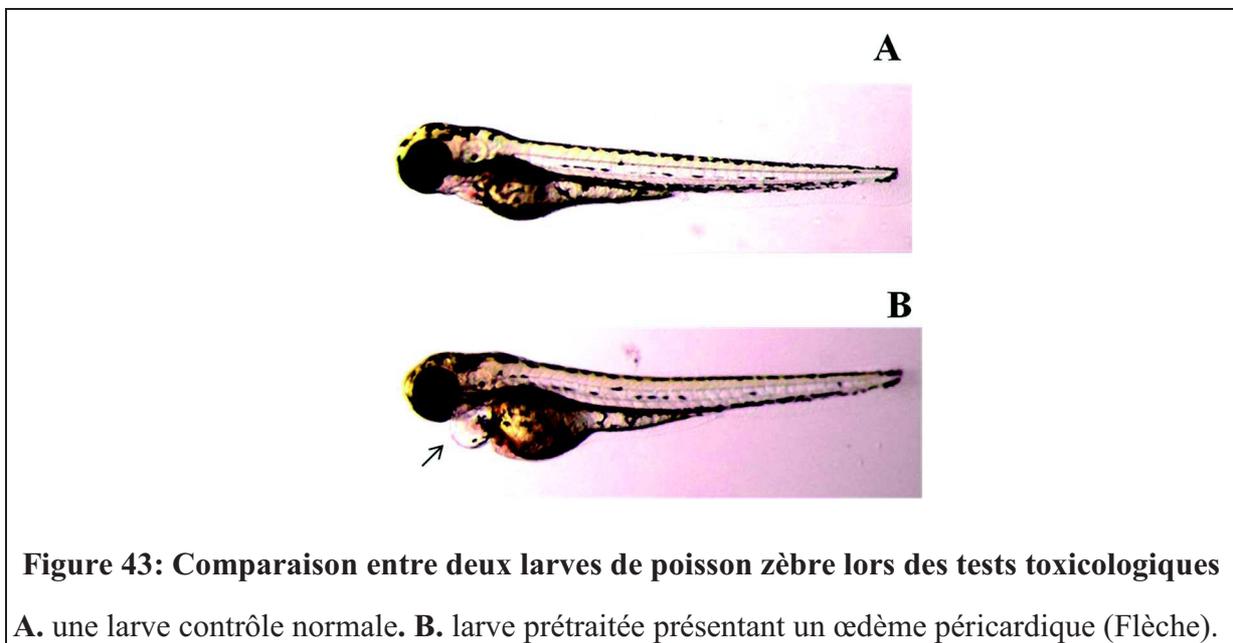
-100 et -80 mV (Fig. 42, E). Nos résultats montrent que l'inhibition suite au traitement avec 50  $\mu$ M d'harmaline était significativement plus importante lorsque les cellules ont été maintenues à -80 mV ( $36,23 \pm 1,57\%$ ) par rapport à -100 mV ( $27,63 \pm 1,63\%$ ). Pris ensemble, les résultats suggèrent que l'harmaline se lie préférentiellement à l'état inactivé des CCTT pour exercer ses effets.



### ■ Evaluation de l'effet anticonvulsivant et/ou antiépileptique chez le poisson zèbre

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) représente un modèle prometteur pour le criblage et l'identification de nouvelles molécules antiépileptiques. Pour évaluer l'effet anticonvulsivant

de nos extraits, nous avons déterminé la CMT en incubant des larves de 6 JPF pendant 24 heures dans une large gamme de concentrations de chaque substance, puis nous avons examiné les larves pour détecter d'éventuels signes de toxicité (Fig. 43). Ensuite, nous avons effectué une série d'expériences en utilisant des substances convulsivantes et épileptiques à citer le pentylénotétrazole (PTZ) et le 4-aminopyridine (4-AP) dans le but de valider notre modèle d'étude comme étant un modèle épileptique. Une fois les modèles sont validés, nous avons testé plusieurs substances pharmacologiques y compris des médicaments antiépileptiques (VPA), les antagonistes sélectifs des CCTT (TTA-A2) ainsi que nos extraits de plantes médicinales dilués dans 1% DMSO. L'activité locomotrice des larves est évaluée par ViewPoint VideoTrack for Zebrafish™ System (Version 2.3.1.0, Viewpoint, France) (Article en préparation).



**Figure 43: Comparaison entre deux larves de poisson zèbre lors des tests toxicologiques**  
**A.** une larve contrôle normale. **B.** larve prétraitée présentant un œdème péricardique (Flèche).

#### **a. La concentration maximale tolérée : Evaluation toxicologique**

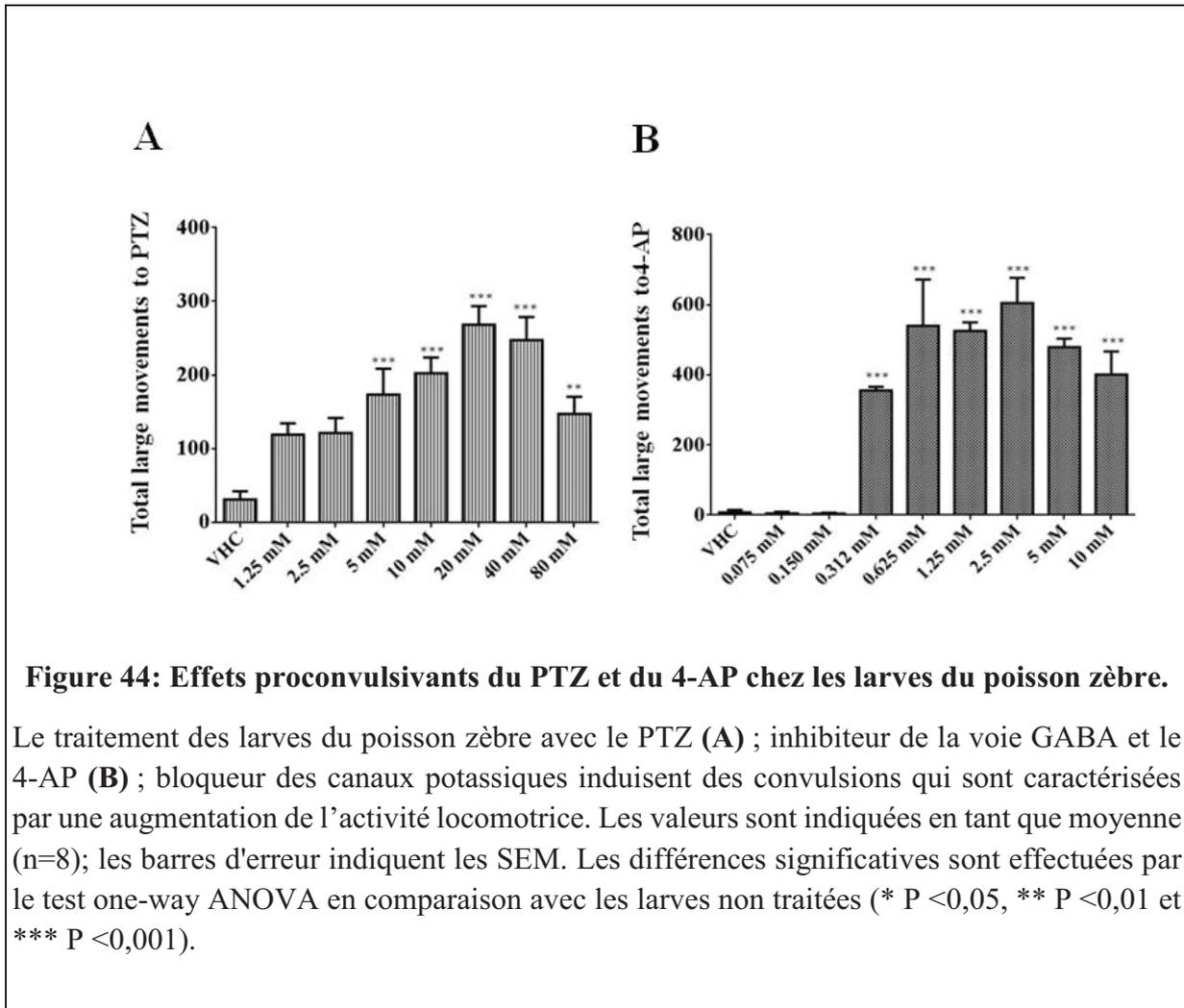
Les CMT déterminées pour chaque substance, naturelle ou chimique, utilisées pour nos expériences sont présentées dans Tableau 6. Les concentrations choisies sont les concentrations auxquelles aucun signe de toxicité n'a été observé pour la totalité des larves (6/6) durant 24 h d'exposition à l'échantillon (Orellana-Paucar *et al.*, 2012).

**Tableau 6: Détermination des concentrations maximales tolérées chez les larves de poisson zèbre**

Extraits de plantes médicinales ou MAE	Concentration maximale tolérée (CMT)
Acide valproïque	2 mM
TTA-A2	150 $\mu$ M
<i>Peganum harmala</i>	20 $\mu$ g/ml
<i>Lavandula steochas</i>	40 $\mu$ g/ml
<i>Rosmarinus officinalis</i>	50 $\mu$ g/ml
<i>Citrillus colocynthis</i>	50 $\mu$ g/ml
<i>Ricinus cummunis</i>	50 $\mu$ g/ml

#### **b. Détermination de la concentration expérimentale des produits convulsivants**

Dans le but de déterminer les concentrations des substances proconvulsivantes à utiliser pour nos prochaines expériences, nous avons testé une large gamme de concentrations de ces produits proconvulsivants sur des larves de poissons zèbres de 7 JPF à citer le PTZ, antagoniste non compétitive des récepteurs GABA<sub>A</sub>, le 4-AP ; bloqueur des canaux potassiques et la pilocarpine (Pilo) qui est un agoniste non sélectif des récepteurs muscariniques (résultats non montrés). Pour déterminer la concentration de PTZ pour nos expériences, huit larves de 7 JPF ont été exposées à 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40 ou 80 mM de PTZ pendant 10 minutes, puis les mouvements ont été enregistrés et analysés grâce au système Viewpoint (Fig. 32, A). De même, huit larves de 7 JPF ont été exposées à 0.075, 0.15, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 mM de 4-AP puis l'activité locomotrice des larves a été enregistrée et évaluée grâce au système Viewpoint (Fig. 44, B). En se basant sur nos résultats, nous avons choisi 20 mM comme concentration d'étude pour le PTZ et 0.6 mM pour le 4-AP. Les concentrations choisies pour notre étude ont été définies comme étant les concentrations qui induisent une augmentation significative de l'activité locomotrice chez la majorité des larves testées pendant 30 min. Pour les tests de comportement, nous avons choisi les concentrations suivantes ; 20 mM, 0.6 mM et 30 mM pour le PTZ, le 4-AP et la pilocarpine, respectivement. Pour la concentration choisie pour le PTZ, elle est en accord avec les concentrations utilisées dans des études précédentes de comportement (Baraban *et al.*, 2005; Berghmans *et al.*, 2007; Orellana-Paucar *et al.*, 2012).



### c. Analyse du profil comportemental chez le modèle poisson zèbre

Afin de valider notre modèle d'étude comme étant un modèle épileptique, nous avons examiné le profil comportemental des larves de poisson zèbre après exposition aux deux substances convulsivantes ; le PTZ et la 4-AP. Les larves de 7 JPF présentent des signes d'agitation quelques secondes après contact avec les substances proconvulsivantes. Les larves commencent à nager le long de la périphérie du puits, un processus appelé thigmotactisme ou tactisme de contact, affichant ainsi la Phase I du comportement pseudo-épileptique (Baraban *et al.*, 2005; Afrikanova *et al.*, 2013). Ensuite, on assiste à des mouvements rapides en forme de tourbillon, suivis d'une courte pause puis les poissons nagent de manière rapide avec des mouvements saccadés, brusques et irréguliers avec un occasionnel raidissement du corps et perte de la posture (La larve se retourne sur son côté ou sur dos). Ces événements peuvent être assimilés à des crises toniques et cloniques chez les mammifères (stades II-III) (Berghmans *et al.*, 2007). Les mouvements augmentent jusqu'à atteindre le sommet à 15 min après l'ajout du PTZ et de la 4-AP (Fig. 45). Dans le cas de la pilocarpine (30 mM); un antagoniste sélectif des récepteurs

---

muscariniques, les mouvements restent similaires aux larves contrôles depuis l'exposition à la pilocarpine puis continuent au moins une heure. On constate une baisse de l'activité totale des larves exposées au PTZ et au 4-AP entre 20 et 60 min qui est probablement due au fait que la majorité des larves passent plus de temps à la phase III, ce qui entraîne une perte de posture et une diminution conséquente de l'activité locomotrice. En outre, l'activité larvaire est très erratique au niveau des premières 15 minutes suivant l'addition du PTZ par rapport au 4-AP, mais devient plus uniforme par la suite (Fig. 45). Par conséquent, pour toutes les expériences ultérieures, nous avons permis aux larves de s'habituer dans l'obscurité pendant 5 minutes avant le début d'une session de suivi de l'activité locomotrice (sauf pour la lumière infrarouge requise par la caméra pour capturer des larves en mouvements). Bien que l'activité des larves soit beaucoup plus uniforme 15 min après l'addition du PTZ, nous avons choisi de commencer l'enregistrement immédiatement après la période d'habituation de 5 min, puisque des études ont montré que certaines MAE sont capables de réduire de manière significative l'activité locomotrice des larves juste après exposition au PTZ (Afrikanova *et al.*, 2013). Enfin, nous avons choisi 30 min comme durée de suivi car l'exposition au PTZ et au 4-AP au-delà de 30 minutes n'a pas augmenté le niveau de l'activité locomotrice des larves par rapport au control.

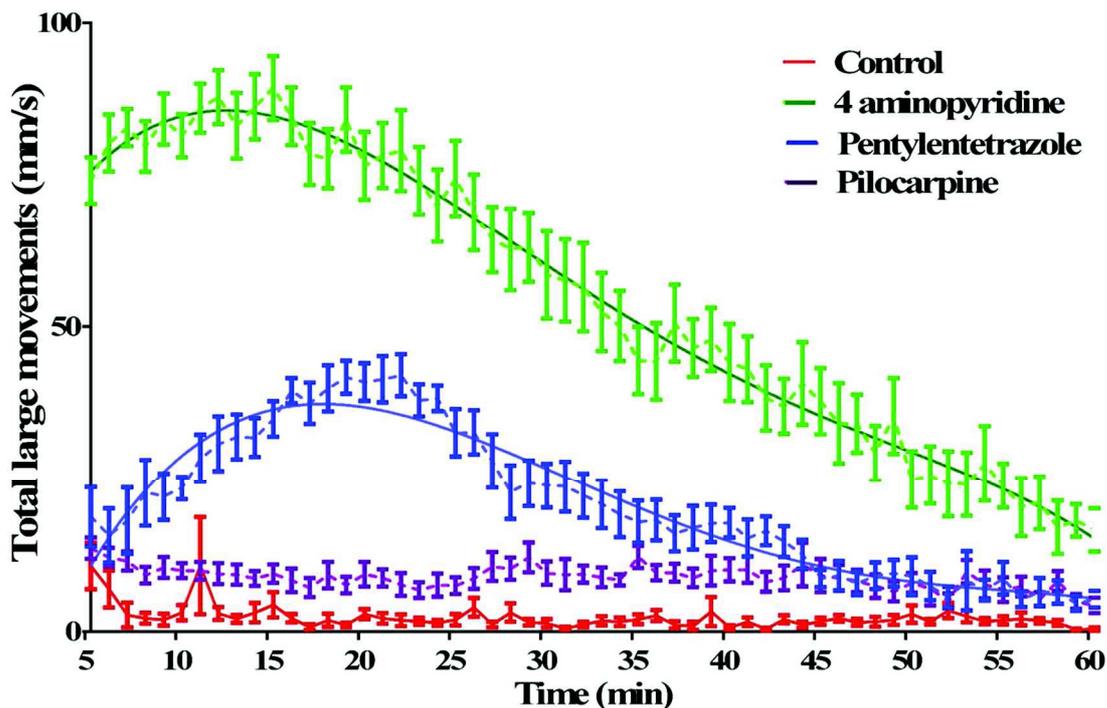
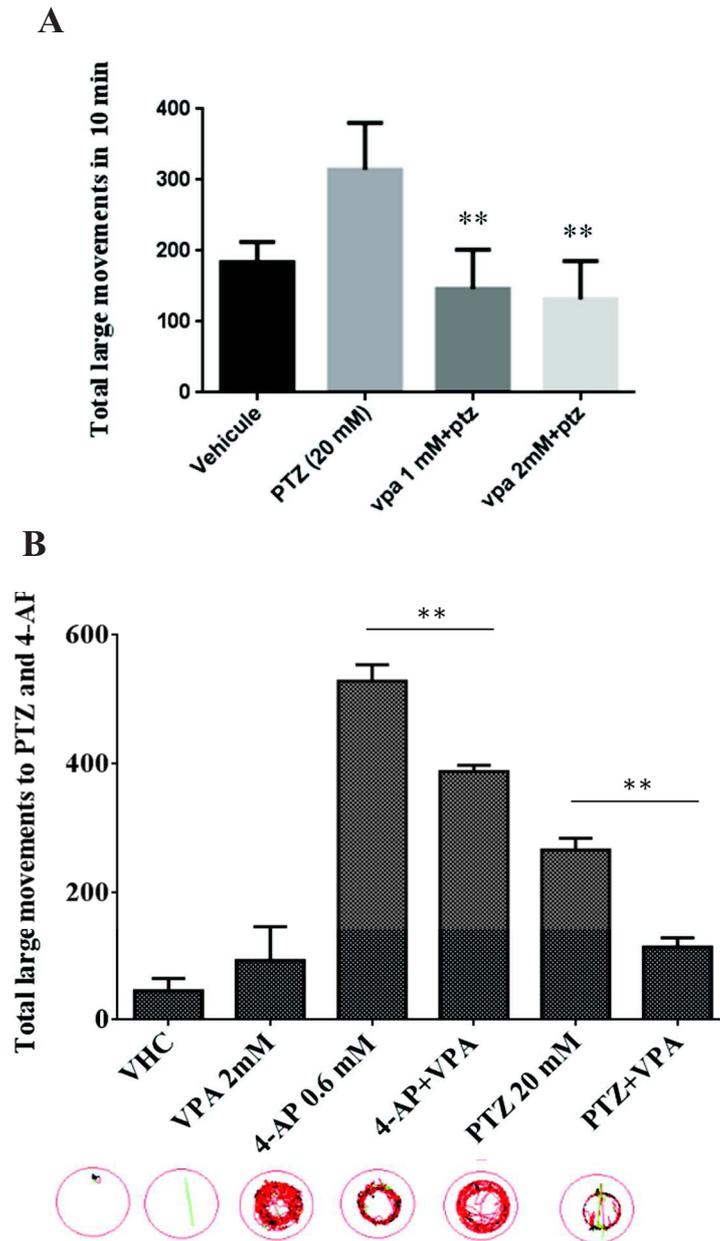


Figure 45: Profil comportemental des larves de poisson zèbre exposées aux substances proconvulsivantes pendant une heure de suivi

La moyenne des mouvements larges totaux (Axe Y) des larves non traitées et des larves exposées à 20 mM de PTZ, 0.6 mM de 4-AP et 30 mM de pilocarpine sont représentés par minute (Axe X). n=12 pour chaque condition.

#### d. Validation des modèles PTZ et 4-AP comme modèles d'étude de l'épilepsie

Afin de valider nos deux modèles PTZ et 4-AP comme étant des modèles intéressants pour le criblage de nouvelles molécules anticonvulsivantes et antiépileptiques, nous avons testé l'effet du VPA, connu pour ses effets anticonvulsivants, sur des larves exposées à 20 mM de PTZ ou 0.6 mM de 4-AP (Fig. 46). Les mouvements pseudo-épileptiques en forme de tourbillon induits par le PTZ ont disparu chez les poissons zèbres prétraités avec 1 et 2 mM de VPA pendant 1 h avant le traitement PTZ. Les mêmes résultats sont obtenus chez les larves exposées à 0.6 mM de 4-AP prétraitées avec 2 mM de VPA.



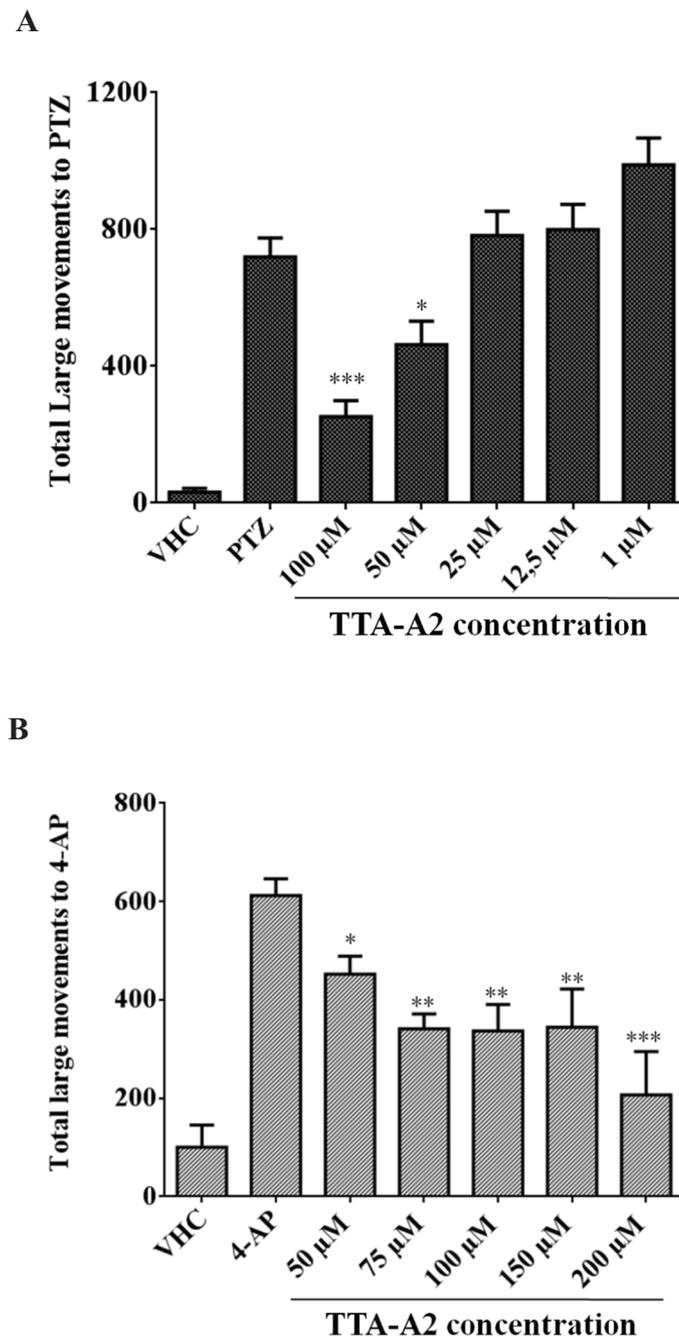
**Figure 46: Analyse de l'effet anticonvulsivant de l'acide valproïque chez les larves du poisson zèbre**

**A.** Comparaison de l'effet de deux concentrations du VPA ; 1 et 2 mM chez les larves exposées à 20 mM de PTZ pendant 10 min. **B.** Les mouvements larges effectués par les poissons ont été calculés et comparés entre les larves exposées au PTZ ou les larves exposées au 4-AP et les larves prétraitées avec le VPA + PTZ/4-AP. L'activité locomotrice des larves est représentée en dessous du graphe. Une activité très modérée a été observée dans le puits de la boîte de Pétri chez les larves contrôles et les larves traitées avec du VPA. L'activité pseudo-épileptique est caractérisée par une circulation rapide et saccadée chez les larves traitées avec du PTZ et 4-AP, qui a été réduite chez les larves de poisson zèbre prétraitées avec 2 mM de VPA. Les données ont été exprimées en tant que moyennes  $\pm$  S.E.M. (n = 12).

### e. Evaluation des effets anticonvulsivants et antiépileptiques du TTA-A2

Le traitement de l'épilepsie repose essentiellement sur l'utilisation des MAE qui sont des médicaments à effet anticonvulsivant. Les antagonistes sélectifs des CCTT sont présumés avoir des effets anticonvulsivants et/ou antiépileptiques, mais cela nécessite encore une démonstration expérimentale. Ici, nous avons étudié l'effet anticonvulsivant du TTA-A2, inhibiteur sélectif des CCTT (Kraus *et al.*, 2010), en utilisant deux modèles de crises épileptiques chez les larves de poisson zèbre: le modèle PTZ et le modèle 4-AP. Ces composés pénètrent le SNC à travers la barrière hémato-encéphalique, inhibent les CCTT neuronales et réduisent l'apparition de crises absence dans le modèle de rat WAG/Rij (Shipe *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Uebele *et al.*, 2009), ce qui donne une preuve supplémentaire témoignant le pouvoir des antagonistes sélectifs des CCTT à moduler l'activité du réseau thalamocortical.

L'efficacité des TTA-A2, dans le traitement d'autres types de crises est encore inconnue. Les études précliniques sont importantes à réaliser parce qu'il y a un besoin crucial de développer des stratégies thérapeutiques alternatives pour le traitement des syndromes épileptiques, notamment ceux comportant les crises généralisées tonico-cloniques et les convulsions partielles. Pour le test chez le modèle PTZ, les larves sont prétraitées pendant 1 h avec différentes concentrations de TTA-A2 qui n'induisent pas d'effet sur l'activité locomotrice des larves par rapport aux larves contrôles. 1, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ M ont été ajoutée au milieu environnant pendant une 1 h avant exposition au PTZ. Les résultats montrent que 50  $\mu$ M de TTA-A2 supprime significativement les mouvements épileptiques chez les larves du poisson zèbre (Fig. 47, A) De même, le TTA-A2 réduit significativement les mouvements épileptiques induits suite à l'exposition à 0.6 mM de 4-AP chez les larves prétraitées pendant une heure par des concentrations croissantes de 50, 75, 100, 150, 200  $\mu$ M de TTA-A2 (Fig. 47, B).



**Figure 47: Evaluation de l'activité anticonvulsivante du TTA-A2 chez le modèle poisson zèbre épileptique.**

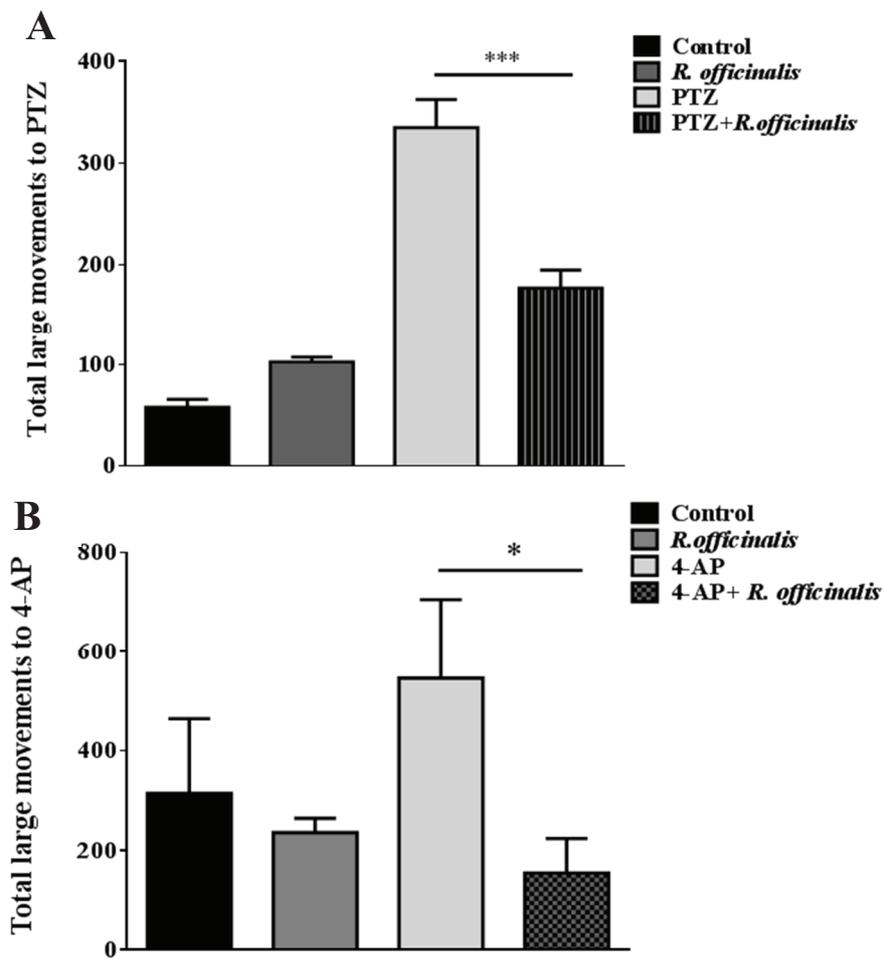
L'effet anticonvulsivant du TTA-A2 est évalué chez le modèle PTZ (A) et le modèle 4-AP (B). Les concentrations sont indiquées le long de l'axe des x et l'activité locomotrice totale est présentée sous forme de mouvements larges (mouvements supérieur à 6mm/s) des larves de poisson zèbre dans les 30 min d'enregistrement. Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (n=12). Les différences statistiquement significatives entre les larves prétraitées pendant 1 h avec du TTA-A2 et les larves contrôles sont évaluées par One-way ANOVA avec comparaisons multiples par rapport aux larves non prétraitées (\* P <0,05, \*\* P <0,01 et \*\*\* P <0,001).

### f. Evaluation de l'activité anticonvulsivante des plantes médicinales

Les plantes médicinales représentent une source intéressante de molécules à propriétés anticonvulsivantes. Nous avons testé l'effet des extraits de plantes médicinales sur l'activité pseudo-épileptique des larves exposées aux substances proconvulsivantes. Le tableau 7 résume l'effet de ces extraits sur les deux modèles. Huit larves de poisson zèbre âgées de 7 JPF ont été prétraitées pendant une heure avec des extraits de plantes médicinales à citer *Peganum harmala*, *Lavandula stoechas*, *Rosmarinus officinalis*, *Citrullus colocynthis* et *Ricinus cummunis*. Les larves sont exposées à 20 mM de PTZ ou 0.6 mM de 4-AP. 5 min après, l'activité locomotrice des larves est suivie par le système Zebralab Viewpoint®. Les résultats montrent que la lavande (20 µg/ml) et le romarin (30 µg/ml) arrivent à diminuer significativement les crises pseudo-épileptiques chez les deux modèles PTZ et 4-AP (Fig. 48). Nous avons montré dans nos études électrophysiologiques que ces deux plantes inhibent l'activité des CCTT ce qui peut être un mécanisme impliqué dans l'effet anticonvulsivant de ces deux plantes. *Citrullus colocynthis* diminue les crises tonico-cloniques uniquement chez le modèle PTZ alors que *Ricinus cummunis* arrive à supprimer l'activité convulsivante uniquement chez le modèle 4-AP. *Peganum harmala* ne parvient pas à diminuer les crises pseudo-épileptiques chez les deux modèles PTZ et 4-AP (Tableau 7).

**Tableau 7: Effet des extraits des plantes médicinales sur l'activité pseudo-épileptique chez les larves de poisson zèbre.**

	<b>Inhibition des CCTT</b>	<b>Modèle PTZ</b>	<b>Modèle 4-AP</b>
<i>Peganum harmala</i>	+++	Non	Non
<i>Lavandula stoechas</i>	++	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>
<i>Rosmarinus officinalis</i>	++	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>
<i>Citrullus colocynthis</i>	-	<b>Oui</b>	Non
<i>Ricinus cummunis</i>	-	Non	<b>Oui</b>



**Figure 48: Evaluation de l'activité anticonvulsivante du *Rosmarinus officinalis* chez le modèle poisson zèbre épileptique.**

L'effet anticonvulsivant du Romarin est évalué chez les modèles PTZ (A) et 4-AP (B). Les larves de 7JP sont prétraités pendant 1h avec 30 µg/ml de *Rosmarinus officinalis*. L'activité locomotrice totale est présentée sous forme de mouvements larges (mouvements supérieurs à 6mm/s) des larves de poisson zèbre dans les 30 min d'enregistrement. Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM (n=6). Les différences statistiquement significatives entre les larves prétraitées pendant 1h avec du *Rosmarinus officinalis* et avec les larves exposées aux substances proconvulsivantes sont évaluées par One-way ANOVA avec comparaisons multiples (\* P <0,05, \*\* P <0,01 et \*\*\* P <0,001).

# **Discussion Générale, conclusions et perspectives**

## IV. Discussion générale

### A. Les canaux calciques de type T: une cible moléculaire intéressante des extraits de lavande

Dans cette étude, nous décrivons plusieurs résultats importants. Tout d'abord, parmi une sélection de plantes médicinales méditerranéennes, dont *Lavandula stoechas*, *Rosmarinus officinalis*, *Cumunis Ricinus* et *Citrullus colocynthis*, nous avons montré que les extraits de lavande et de romarin, qui sont des plantes médicinales largement utilisées pour leurs multiples effets thérapeutiques, inhibent significativement les courants calciques de l'isoforme Cav3.2 de manière dépendante à la concentration. Deuxièmement, nos résultats fournissent la preuve que leurs principes actifs, le linalol et l'acide rosmarinique respectivement, inhibent également les canaux Cav3.2. Troisièmement, nous rapportons que ces composés induisent un déplacement des propriétés d'inactivation à l'état stable vers des potentiels de membrane plus négatifs et nous montrons que leur effet inhibiteur sur les canaux Cav3.2 est considérablement renforcé dans la gamme du potentiel membranaire (HP de -80 mV), par rapport au potentiel plus négatif (HP -100 mV). Dans l'ensemble, nos résultats confirment une modulation pharmacologique des CCTT par la lavande et le romarin et nous suggérons que l'inhibition des CCTT par ces composants naturels peut contribuer à leurs activités neuroprotectrices et anticonvulsivantes.

La lavande (*Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia* Miller) et le Romarin (*Rosmarinus officinalis*) inhibent l'amplitude des canaux Cav3.2 d'une manière dose-dépendante. Les valeurs de la concentration inhibitrice médiane « IC<sub>50</sub> » de *L. stoechas*, *L. angustifolia* Miller et *R. officinalis* ont été estimées à 16,9, 34,1 et 53,5 µg/ml, respectivement, ce qui suggère que les canaux Cav3.2 sont plus sensibles aux espèces de Lavande, en particulier *Lavandula stoechas*. En outre, la lavande et le romarin inhibent également les autres isoformes des CCTT ; Cav3.1 et Cav3.3. Les valeurs de l'IC<sub>50</sub> pour l'inhibition de LA Miller étaient de 26,1 ± 4,8 µg/ml (n = 7) pour Cav3.1 et de 86,2 ± 18,1 µg/ml pour Cav3.3 (n = 7) (données non représentées). Fait intéressant, les pourcentages d'inhibition obtenus après traitement des différents CCTT avec 10 µg/ml de LA Miller (31% pour Cav3.1, 16% pour Cav3.2 et 10 % Cav3.3 10%) sont similaires au pourcentage d'inhibition (25%) obtenus après traitement des canaux calciques de type P/Q (HVA) avec Silexan ; une substance active brevetée extraite à partir des fleurs de *L. angustifolia* par distillation à la vapeur et comprenant les principaux constituants actifs ; le linalol et l'acétate de linalyle (Schuwald *et al.*, 2013). Dans l'ensemble, nos données renforcent et étendent les

études électrophysiologiques précédentes décrivant l'effet de la lavande et de son principe actif ; le linalol, sur d'autres CCDV (Narusuye *et al.*, 2005; Schuwald *et al.*, 2013). Plus important encore, nous rapportons pour la première fois à notre connaissance, l'inhibition des CCDV, en particulier les CCTT, par *Rosmarinus officinalis* et son principe actif l'acide rosmarinique.

Le Linalol est un composé monoterpénique qui constitue le composant principal de l'huile essentielle de lavande. Il diminue l'activation du glutamate (Elisabetsky *et al.*, 1999) et réduit la libération d'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire chez la souris en modifiant les cinétiques des récepteurs nicotiques (Re *et al.*, 2000), suggérant des voies possibles contribuant aux effets sédatifs et anticonvulsivants chez la souris (Linck *et al.*, 2009; Linck *et al.*, 2010). D'autres études ont été menées pour élucider les mécanismes moléculaires associés aux vertus thérapeutiques du linalol ont révélé que ce constituant naturel pourrait interagir avec des canaux voltage-dépendants, en particulier les CCDV (Narusuye *et al.*, 2005; Schuwald *et al.*, 2013). Narusuye *et al.* ont constaté que le linalol supprime non sélectivement les courants  $I_{Ca,L}$ ,  $I_K$ ,  $I_A$ , et  $I_{KA}$  dépendants du voltage dans les cellules horizontales de la rétine ainsi que les courants  $I_{NA}$ ,  $I_{Ca,L}$ ,  $I_K$ ,  $I_A$ , et  $I_{K(Ca)}$  dans les cellules ganglionnaires de la rétine. La technique d'imagerie à base de Fura-2 calcium a été utilisée pour tester l'effet de linalol sur les ORC exprimant à la fois les courants  $I_{Ca,L}$  et  $I_{Ca,T}$  (Kawai *et al.*, 1996) et a montré que 3 mM de linalol inhibe de façon réversible les courants calciques dans les ORC avec un pourcentage d'inhibition de  $44,9 \pm 2,6\%$  (Narusuye *et al.*, 2005). De même, Schuwald *et al.* ont fait état d'une diminution de l'influx du calcium induit par le KCl dans les synaptosomes de souris après traitement avec 1  $\mu$ M de linalol et d'acétate de linalyle, ce qui suggère des propriétés anxiolytiques puissantes du linalol en réponse à la modulation des canaux calciques voltage-dépendants (Schuwald *et al.*, 2013). Notre étude électrophysiologique confirme l'inhibition des CCDV, en particulier, les CCTT par le linalol. Le linalol atténue les courants des canaux Cav3.2 d'une manière dépendante à la concentration. L' $IC_{50}$  du linalol est estimée à 84  $\mu$ M. Un  $IC_{50}$  jugée inférieure à l' $IC_{50}$  obtenue suite à l'inhibition des canaux ioniques dans d'autres préparations. A titre d'exemple, la valeur d' $IC_{50}$  du linalol des CSDV est estimée à 560  $\mu$ M ce qui suggère que le Linalol est plus puissant dans l'inhibition des canaux de Cav3.2 (Narusuye *et al.*, 2005).

L'acide rosmarinique exerce un effet neuroprotecteur contre le stress oxydant et l'excitotoxicité et possède des effets anxiolytiques/antidépresseurs (Fallarini *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2013). Les mécanismes par lesquels l'AR exerce ses effets anti-inflammatoires ne sont pas encore bien élucidés. Les études ont montré que l'AR inhibe la lipoxigénase (Kimura *et al.*, 1987) et l'activité de la cyclooxygénase (Kelm *et al.*, 2000), bloque l'activation du complément (Sahu *et*

*al.*, 1999) et la signalisation intracellulaire induite par le récepteur de surface des lymphocytes T (TCR) (Won *et al.*, 2003). L'effet de l'AR sur les canaux ioniques, en particulier des canaux voltage-dépendants, est actuellement inconnu. Notre étude révèle donc que les CCTT, sont inhibés par *Rosmarinus officinalis* et son principe actif l'AR de manière dépendante au potentiel et à la concentration. Par conséquent, les CCTT représentent une nouvelle cible moléculaire pour l'AR.

L'inhibition des CCTT dépend fortement de leur état d'inactivation. L'analyse des propriétés biophysiques des canaux Cav3.2 avant et après traitement par la lavande (*Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia* Miller et le linalol), le romarin (*Rosmarinus officinalis*) et l'AR a montré que ces composés naturels, non seulement réduisent la conductance maximale des canaux Cav3.2 mais aussi déplacent les propriétés d'inactivation à l'état stationnaire vers des potentiels membranaires plus négatifs sans avoir pour autant un effet sur les propriétés d'activation. Notre étude montre également que l'inhibition des canaux Cav3.2 par la lavande et le romarin a été considérablement améliorée lorsque les cellules étaient maintenues à un potentiel membranaire de -80 mV par rapport à -100 mV. En effet, l'effet inhibiteur était plus important à un potentiel imitant le potentiel de repos membranaire auquel une fraction importante des CCTT sont inactivés (Ertel *et al.*, 1994; Huguenard, 1996). Ceci suggère un mécanisme intéressant par lequel la lavande et le romarin peuvent atténuer l'excitabilité cellulaire en diminuant la concentration du calcium intracellulaire et induisant ainsi des effets sédatifs, anticonvulsivants et neuroprotecteurs. Nos résultats montrent que ces composés déplacent l'état d'inactivation vers des valeurs de potentiel plus négatifs suggérant que ces composés naturels interagissent avec les CCTT inactivés et les stabilisent dans l'état inactivé. Le même mécanisme a été décrit dans le cas des PAA et des DHP qui se lient de manière préférentielle à l'état inactivé des CCTT ce qui confère une sélectivité au niveau du tissu cardiaque pour ces médicaments qui sont utiles comme traitements antihypertenseurs et antiarythmiques (Hondeghe *et al.*, 1984; Hering *et al.*, 1997).

### ■ Inhibition des canaux calciques de type T par *Peganum harmala* et l'harmaline

*Peganum harmala* L. (Harmal) est une plante médicinale originaire de la région méditerranéenne et qui a été utilisée depuis l'antiquité contre plusieurs problèmes de santé (el Bahri *et al.*, 1991; Farouk *et al.*, 2008). Nos résultats montrent que l'extrait brute de *Peganum harmala* et son principe actif l'harmaline inhibent les courants des CCTT sur une large gamme

de potentiels et d'une manière dépendante à la concentration. L'extrait méthanolique de *P. harmala* réduit les courants Cav3.1, Cav3.2 Cav3.3 de  $88,15 \pm 2,39$  par,  $82,48 \pm 1,09$  et  $61,70 \pm 2,22\%$ , respectivement, en réponse à la perfusion de  $20 \mu\text{g/ml}$  de l'extrait. De même,  $50 \mu\text{M}$  d'harmaline inhibent les courants des trois isoformes des CCTT avec des valeurs d'inhibition estimées à  $59,27 \pm 3,75$  pour Cav3.1,  $62,24 \pm 2,09$  pour Cav3.2 et  $36,23 \pm 1,57\%$  pour Cav3.3 pour un potentiel test de  $-80$  à  $-30$  mV. Cette première partie de nos résultats montre que les deux isoformes Cav3.1 et Cav3.2 sont plus sensibles aux extraits d'harmal que l'isoforme Cav3.3. Les courbes retraçant l'activité des deux composés montrent un effet partiellement réversible sur les CCTT. Nos résultats montrent pour la première fois l'effet de l'extrait entier sur les courants LVA et confirment ainsi, grâce à une étude détaillée, certains aspects de l'inhibition des trois isoformes des canaux T par l'harmaline. Nous avons utilisé un système recombinant afin de mieux évaluer l'effet pharmacologique de l'harmaline sur les CCTT en évitant les effets indirects qui pourraient être liés à la fixation nos spécifiques de l'harmaline sur d'autres canaux ioniques (Spletstoesser *et al.*, 2005).

Les concentrations d'harmaline utilisées dans cette étude ( $10$ - $50 \mu\text{M}$ ) pour les enregistrements électrophysiologiques sont similaires à ceux utilisés par Park *et al.* mais légèrement inférieures aux concentrations utilisées pour les enregistrements effectués par Spletstoesser *et al.* et Zhang *et al.* ce qui signifie que nos résultats sont comparables. Nos résultats sont également en accord avec ceux obtenus par d'autres études *in vitro* et *in vivo* démontrant une inhibition des CCTT recombinants (Park *et al.*, 2010b) et natifs exprimés dans les neurones du ganglion de la racine dorsale du rat (Spletstoesser *et al.*, 2005) ou dans les neurones olivaires (Zhan *et al.*, 2012).

L'inhibition des CCTT dépend fortement de leur état d'inactivation. L'analyse des propriétés biophysiques des trois isoformes des Cav3 montre que l'Harmal et son principe actif déplacent les courbes d'inactivation à l'état stable des canaux T vers des potentiels de membrane plus négatifs sans avoir un effet statistiquement significatif sur les courbes d'activation, ce qui suggère que le bloc est plus efficace à des potentiels auxquels les canaux T sont inactivés (Ertel *et al.*, 1994; Huguenard, 1996). En outre, nous avons montré tout au long de notre étude que l'inhibition des CCTT par *P. harmala* et l'harmaline a été considérablement plus importante à un potentiel de maintien de  $-80$  mV par rapport à  $-80$  mV suggérant que l'harmal stabilise les canaux Cav3 à l'état inactivé afin de produire son effet neuroprotecteur.

*P. harmala* et l'harmaline ont été étudiés pour leurs rôles cytotoxiques et neuroprotecteurs. Les mécanismes sous-jacents de l'effet neuroprotecteur des alcaloïdes d'harmal restent encore à être élucidés. Plusieurs études ont signalé l'implication du  $\beta$ -carboline harmaline dans multiples effets pharmacologiques, y compris l'inhibition des enzymes MAO. Les inhibiteurs de ces

enzymes mitochondriaux sont d'intérêt thérapeutique comme antidépresseurs (inhibiteurs de la MAO-A) et neuroprotecteurs (inhibiteurs de la MAO-B) (Ben-Shlomo et al., 2004; Herraiz et al., 2005). En outre, l'atténuation de la formation de radicaux hydroxyles et l'oxydation du thiol conduit à des effets inhibiteurs sur l'apoptose cellulaire (Lee et al., 2000). D'autres études ont suggéré que l'inhibition des courants  $I_{Na}$  et  $I_{Ca}$  par l'harmaline cause une atténuation directe de l'excitabilité des neurones conduisant à des processus neuroprotecteurs contre l'apoptose neuronale (Spletstoesser et al., 2005).

Pour conclure, *P. harmala* et l'harmaline sont capables de réduire les courants Cav3 en se fixant préférentiellement aux canaux T dans leur état inactivé. Par conséquent, nous suggérons que tous les isoformes des CCTT, exprimés dans différents tissus, sont des cibles moléculaires des extraits d'harmal et sont susceptibles de contribuer à des changements pharmacologiques et des effets thérapeutiques due à ces constituants actifs.

### **C. Les inhibiteurs des canaux calciques de type T peuvent être utile dans le traitement de la douleur et de l'épilepsie**

Les CCTT représentent de nouvelles cibles moléculaires intéressantes pour la douleur et l'épilepsie (Tsakiridou *et al.*, 1995; Bourinet *et al.*, 2005b; Todorovic *et al.*, 2011; Cain *et al.*, 2013; Powell *et al.*, 2014). Lory et al. ont rapporté que l'inhibition des CCTT joue un rôle important dans l'action thérapeutique de nombreux médicaments (Lory *et al.*, 2007). Par exemple, Gomora et al. montrent que la suppression de la conductance calcique des CCTT peut expliquer les propriétés anticonvulsivantes des antiépileptiques des succinimides (Gomora *et al.*, 2001) Dans le même contexte, Tringham et ses collègues ont identifié deux bloqueurs sélectifs des CCTT qui ont pu atténuer les décharges au niveau du noyau réticulaire thalamique chez les rats d'épilepsie absence (GAERS) (Tringham *et al.*, 2012). L'inhibition des CCTT est également reportée comme étant utile dans une grande variété de troubles neurologiques tels que la douleur neuropathique (Llinas *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 2014). En effet, Jagodic et ses collaborateurs ont démontré que les CCTT sont régulés à la hausse de manière significative au niveau des DRG lors d'une neuropathie induite par une constriction chronique. Par conséquent, l'inhibition des CCTT par le NNC 55-0396, un inhibiteur sélectif des TTCC (Huang *et al.*, 2004) diminue de transmission pré- et postsynaptique ainsi que l'activité neuronale dans le cortex cingulaire antérieur après une construction chronique, ce qui permet l'atténuation de la douleur neuropathique (Shen *et al.*, 2015). L'ABT-639 est un inhibiteur périphérique des CCTT qui inhibe les canaux T de manière sélective et dépendante à la concentration. Des études précliniques ont montré que l'administration orale de l'ABT-639 atténue la douleur

neuropathique chez les rats (Jarvis *et al.*, 2014). Cependant, des études cliniques de phase II ont révélé que l'administration de l'ABT-639 100 mg deux fois par jour n'a pas réduit la douleur neuropathique chez les patients diabétiques (Serra *et al.*, 2015; Ziegler *et al.*, 2015). Le Z944, un bloqueur sélectif puissant des CCTT (50-160 nM) réduit en revanche la douleur neuropathique dans les modèles précliniques et cliniques (Lee, 2014a).

D'autres études ont également suggéré que les CCTT sont une cible moléculaire intéressante pour les composés naturels. L'Eugénol, un analgésique local utilisé en dentisterie et qui est naturellement présent dans les clous de girofle (*Syzygium aromaticum*) module les CCTT d'une manière dépendante de la dose avec une  $IC_{50}$  de 500  $\mu$ M. L'effet dépresseur de l'eugénol sur les CCTT conduit à l'inhibition des potentiels d'action et de la conduction nerveuse des signaux sensoriels dans les neurones TG induisant l'action antinociceptive de l'eugénol (Seo *et al.*, 2013). En outre, Ross *et al.* ont démontré que le  $\Delta$ 9-tétrahydrocannabinol et le cannabidiol qui sont les constituants biologiquement actifs de *Cannabis sativa*, inhibent les canaux T recombinants et natifs neuronaux (Ross *et al.*, 2008). Le cannabidiol est actuellement en cours de développement en tant que médicament antiépileptique (Bialer *et al.*, 2015). L'inhibition des CCTT peut provoquer la diminution de la libération des neurotransmetteurs par ces composés ce qui contribue aux effets psychoactifs bien connus des cannabinoïdes, et aux propriétés antinociceptives et anticonvulsivantes (Hosking *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 2008; Hill *et al.*, 2013; Bialer *et al.*, 2015).

En résumé, nos données montrent que les extraits de la lavande, du romarin et de l'harmale inhibent efficacement les CCTT en se liant préférentiellement à leur état inactivé. Dans l'ensemble, nos études démontrent que les CCTT représentent une cible moléculaire intéressante de ces plantes médicinales méditerranéennes et semblent être impliqués dans leurs vertus sédatives et anticonvulsivantes.

### **D. Le TTA-A2, la lavande et le romarin atténuent l'activité pseudo-épileptique chez le poisson zèbre**

Dans cette étude, nous décrivons plusieurs résultats importants. Premièrement, nous avons validé le modèle PTZ utilisé dans la littérature comme un modèle efficace de criblage des composés ayant des activités anticonvulsivantes et/ou antiépileptiques (Orellana-Paucar *et al.*, 2012; Afrikanova *et al.*, 2013; Rahn *et al.*, 2014). Deuxièmement, nous avons développé un nouveau modèle épileptique qui est le modèle 4-AP pour un criblage plus élargi des molécules et substances anticonvulsivantes. Troisièmement, nous montrons que le VPA, un

anticonvulsivant et calmant, essentiellement utilisé pour le traitement de l'épilepsie, diminue l'activité pseudo-épileptique chez les deux modèles PTZ et 4-AP. Quatrièmement, nous avons montré que le TTA-A2, un bloqueur sélectif des CCTT, inhibe significativement l'activité épileptique chez les modèles PTZ et 4-AP. Finalement, nos résultats montrent que le romarin et la lavande, des plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés anti-inflammatoires, sédatives et neuroprotectrices, atténuent les crises pseudo-épileptiques chez les larves de 7 JPF exposées aux produits neuroactifs ; le PTZ et la 4-AP. Dans l'ensemble, nos résultats confirment l'utilité des larves du poisson zèbre comme étant un modèle prometteur dans le criblage des nouvelles molécules à propriétés anticonvulsivantes, soulignent l'intérêt des bloqueurs des CCTT pour contrôler les crises épileptiques et témoignent du rôle des plantes médicinales comme source riche de substances à vertus sédatives et anticonvulsivantes.

L'analyse de l'hyperactivité comportementale peut fournir des indications sur comment des perturbations dans l'activité normale peuvent être liées à la fonction altérée du système nerveux et, éventuellement, aux symptômes de la maladie. En tant que petits vertébrés, les poissons zèbres présentent de nombreux avantages expérimentaux qui les rendent un modèle puissant pour ces types d'études. Tandis que la majorité des études comportementales ont mis l'accent sur le poisson zèbre adulte, il est devenu évident que les larves peuvent également afficher des modèles stéréotypés complexes de comportement. Ici, nous avons utilisé trois composés, l'un est bien caractérisé, et les deux autres sont non ou très peu étudiés chez les larves du poisson zèbre. Il s'agit du PTZ, de la 4-AP et de la pilocarpine, des substances neuroactives qui ont différentes cibles neuronales (les récepteurs GABA, les canaux potassiques et les récepteurs muscariniques) et qui sont connues comme substances proconvulsivantes (Baraban *et al.*, 2005; Ellis *et al.*, 2012).

Nous avons cherché à développer des modèles de poisson zèbre de crises d'épilepsie qui seraient capables de dépister efficacement les composés ayant des activités anticonvulsivantes. Nous avons trouvé que l'exposition des larves de poisson zèbre de 7 JPF au PTZ induit une activité convulsivante caractérisée par l'augmentation de l'activité locomotrice. Cette hyperactivité peut être divisée en trois phases selon le profil comportemental des larves ; Phase I caractérisée par le thigmotactisme et la phase II-III caractérisée par des mouvements saccadés assimilés à une crise tonico-clonique chez les mammifères (Berghmans *et al.*, 2007). L'antagoniste des canaux potassiques 4-AP augmente l'activité locomotrice des larves de poisson zèbre. Les mouvements larges totaux induits suite à l'exposition à 0.6 mM 4-AP sont deux fois plus importants que ceux induits par 20 mM de PTZ. Cette activité épileptiforme importante induite

par la 4-AP peut être expliquée par le fait que la 4-AP augmente l'efficacité des potentiels synaptiques excitateurs et inhibiteurs en activant la libération des transmetteurs présynaptiques (Fueta *et al.*, 1992). Contrairement au PTZ et 4-AP, la pilocarpine ne provoque pas une augmentation de l'activité convulsivante chez les larves de poisson zèbre et les mouvements restent similaires aux larves contrôles depuis l'exposition à la pilocarpine puis continuent au moins une heure. Nos études confirment les études précédentes sur l'effet proconvulsivant du PTZ (Baraban *et al.*, 2005) et du 4-AP (Ellis *et al.*, 2012) chez les larves du poisson zèbre.

Le VPA est un composé organique qui est utilisé cliniquement comme stabilisateur d'humeur, thymorégulateur et principalement dans le traitement de l'épilepsie, les troubles bipolaires et la prévention des migraines (Reynolds *et al.*, 2007). Le VPA module les CSDV et augmente la disponibilité des neurotransmetteurs GABA (en tant qu'inhibiteur de la GABA transaminase). Le VPA est également connu pour affecter différentes voies de transduction de signaux intracellulaires, y compris les voies à médiation par la MAPK, la PKB et la PKC (Yuan *et al.*, 2001; Watterson *et al.*, 2002). En plus d'être un inhibiteur de l'histone désacétylase de type 1 (Gottlicher *et al.*, 2001), le VPA inhibe les CCTT (Kelly *et al.*, 1990) connus pour leur implication dans l'épilepsie. Ce qui explique l'effet anticonvulsivant du VPA (Reynolds *et al.*, 2007). Nous avons testé l'effet de VPA sur nos deux modèles d'études PTZ et 4-AP. le VPA atténue l'activité pseudo-épileptique chez le modèle PTZ ( $P < 0.01$ ). Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Afrikanova *et al.* chez des larves de poisson zèbre (Afrikanova *et al.*, 2013), chez le poisson zèbre adulte (Lee *et al.*, 2010) et chez le rat (Dedeurwaerdere *et al.*, 2011). Grâce à notre étude, nous montrons pour la première fois, à notre connaissance, l'effet anticonvulsivant du VPA sur le modèle 4-AP des larves de poisson zèbre. Ces résultats confirment d'avantage l'intérêt de notre modèle 4-AP en tant que modèle d'étude du profil comportemental dans les crises d'épilepsie ainsi que le criblage des molécules à propriétés anticonvulsivantes. Des études montrent que l'activité épileptiforme induite par le 4-AP (50  $\mu$ M) dans des tranches d'hippocampe de rat (Région CA3) obtenues à partir de rats mâles, (jeunes (8 à 23 jours) et adultes (> 60 jours)) est supprimée suite à l'administration de 0.5 à 2 mM de VPA (Fueta *et al.*, 1992). De même, Martin *et al.* montrent que le VPA réduit l'activité épileptique dans la région CA1 de l'hippocampe chez le rat, confirmant, grâce à l'utilisation de la technique de patch-clamp en configuration cellule entière sur des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe, que le VPA réduit l'amplitude et la fréquence des courants postsynaptiques excitateurs provoqués par le 4-AP, ce qui empêche la formation des potentiels d'actions (Martin *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2004).

Le traitement de l'épilepsie repose essentiellement sur l'utilisation des MAE qui sont des médicaments à effet anticonvulsivant. L'atténuation de la conductance calcique des CCTT joue un rôle important dans l'effet thérapeutique des MAE (Lory et al., 2007) à citer les médicaments antiépileptiques de la famille des succinimides (Gomora et al., 2001; Matthews et al., 2001). Nous décrivons pour la première fois que le TTA-A2, inhibiteur sélectif des CCTT, réduit l'activité épileptique chez les larves de poisson zèbre exposées au PTZ ( $P < 0.001$ ) et à la 4-AP ( $P < 0.01$ ) avec une concentration estimée à 50  $\mu\text{M}$ . Les études ont montré que le TTA-A2 réduit l'apparition des crises absence dans le modèle de rat WAG/Rij en pénétrant le SNC à travers la barrière hémato-encéphalique et en modulant les CCTT neuronales (Shipe et al., 2008; Yang et al., 2008; Uebele et al., 2009). Nos données montrent que le TTA-A2 supprime les crises tonico-cloniques chez les modèles PTZ et 4-AP ; une nouvelle cible intéressante (crises généralisées tonico-cloniques) qui peut s'ajouter aux crises absence réduites par le TTA-A2. Le modèle poisson zèbre reste un modèle simple de crises tonico-cloniques. Cependant il est capable de cribler les effets anticonvulsivants de plusieurs médicaments et substances anticonvulsivantes (Baxendale et al., 2012; Orellana-Paucar et al., 2012; Afrikanova et al., 2013).

Des revues dans la littérature sur les extraits de plantes médicinales à activité anticonvulsivante ont énuméré plus de 30 différents composés actifs, principalement des monoterpènes ou des phénylpropanoïdes (de Almeida *et al.*, 2011). Un nombre considérable d'extraits et de composés naturels exercent leurs effets anticonvulsivants via la modulation des canaux ioniques et plus particulièrement les CCDV. Comme exemple, la berbérine. Il s'agit d'un alcaloïde connu pour ses effets anticonvulsivants (Bhutada *et al.*, 2010) liés à l'inhibition de la libération du glutamate des synaptosomes corticaux via la suppression des courants présynaptiques des CCTPQ (Lin *et al.*, 2013). Nos résultats montrent que les extraits de la lavande et du romarin inhibent l'activité pseudo-épileptique chez les larves de poisson zèbre de 7 JPF exposées au PTZ et 4-AP. Nos résultats montrent pour la première fois l'effet de ces plantes sur l'activité locomotrice dans le modèle poisson zèbre épileptique. La lavande a été utilisée pendant des siècles dans l'aromathérapie, mais aussi comme un traitement ethnométric contre la dépression, l'anxiété et l'épilepsie (Cavanagh et al., 2002; Gorji, 2003). Silexan ; une substance active brevetée extraite des fleurs de lavande présente des effets anxiolytiques via la modulation des CCDV (Schuwald et al., 2013). Nous avons évalué l'activité anticonvulsivante de l'extrait méthanolique de la lavande dans les modèles de poisson zèbre de crises induites par le PTZ (Berghmans *et al.*, 2007) avec des résultats positifs. Ces observations sont en accord avec les propriétés anticonvulsivantes de la lavande décrites dans des études précédentes (Cavanagh *et*

*al.*, 2002; Koulivand *et al.*, 2013). Dans ces études, les effets anxiolytiques et anticonvulsivants de la lavande sont expliqués par la présence du linalol et d'acétate de linalyle ; des composés monoterpéniques qui constituent les éléments principaux des huiles essentielles de la lavande (Cavanagh *et al.*, 2002; Koulivand *et al.*, 2013). Le linalol active le glutamate (Elisabetsky *et al.*, 1999) et réduit la libération d'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire chez la souris en modifiant les cinétiques des récepteurs nicotiniques (Re *et al.*, 2000). Nos études électrophysiologiques montrent que le linalol et les extraits de lavande inhibent les CCTT de façon dépendante à la concentration. Tous ensemble, ces mécanismes suggèrent des voies possibles contribuant aux effets sédatifs et anticonvulsivants de la lavande chez les larves de poisson zèbres exposés au PTZ et à la 4-AP et chez le modèle murin (Linck *et al.*, 2009; Linck *et al.*, 2010).

Le romarin (*Rosmarinus officinalis*) est l'une des plantes médicinales les plus communes connue pour ses vertus médicinales prometteuses. L'extrait du romarin contient des concentrations élevées de composés biologiquement actifs tels que les acides phénoliques (l'acide rosmarinique, et l'acide chlorogénique), les diterpènes phénoliques (l'acide carnosique) et les flavonoïdes (des dérivés de l'apigénine et de la lutéoline) (Xiao *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2010). Le romarin a été utilisé dans la médecine traditionnelle pour traiter les maux de tête, les problèmes de circulation ainsi que l'épilepsie (Yu *et al.*, 2013). De plus l'acide rosmarinique ; un composé polyphénolique qui fait partie des principaux composants du romarin, possède des effets anti-inflammatoires, anti-oxydant et des propriétés anxiolytiques/antidépessantes suite à l'inhibition de la GABA transaminase , ce qui rend ces composés une cible intéressante dans la recherche de traitement pour l'épilepsie (Awad *et al.*, 2009; Gamaro *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2014). Nos résultats montrent que l'extrait du romarin atténue les crises pseudo-épileptiques chez les modèles PTZ et 4-AP. Nous sommes les premiers à fournir ces résultats chez les deux modèles de crises PTZ et 4-AP. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études suggérant que le romarin et ses composants phénoliques possèdent des propriétés anti-oxydantes, neuroprotectrices et anticonvulsivantes (Gonzalez-Trujano *et al.*, 2007; Takaki *et al.*, 2008; Awad *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010a; Ozarowski *et al.*, 2013). Des études ont montré que l'acide rosmarinique pourrait atténuer la crise épileptiforme, diminuer le stress oxydatif, et prévenir la perte des neurones de l'hippocampe le modèle PTZ chez la souris et le modèle kainate durant l'épilepsie temporelle chez le rat (Coelho *et al.*, 2015; Khamse *et al.*, 2015). Dans l'ensemble, nos données montrent que les extraits de la lavande et du romarin atténuent les crises d'épilepsie chez le modèle

poisson zèbre via plusieurs mécanismes moléculaires qui pourraient inclure la modulation des CCTT.

## V. Conclusions et perspectives

Les plantes médicinales restent une source intéressante de principes actifs connus pour leurs propriétés thérapeutiques. Les effets anti-inflammatoires, neuroprotecteurs et anticonvulsivants des extraits des plantes médicinales ont été principalement attribués à la présence de certains composants actifs à citer les flavonoïdes, les monoterpènes et les polyphénols. La modulation des CCVD par ces composés naturels peut expliquer les effets anticonvulsivants et neuroprotecteurs de ces métabolites secondaires. Dans notre étude, nous avons pu démontrer la modulation des CCTT, qui jouent plusieurs rôles dans la physiologie neuronale tels que l'excitabilité, les potentiels d'action calciques, le mode de décharge en bouffée, les oscillations et la plasticité mais aussi dans la physiopathologie de l'épilepsie, par les extraits de lavande, de romarin et de l'harmal. Ces plantes médicinales ainsi que leurs principes actifs, le linalol, l'acide rosmarinique et l'harmaline, respectivement, réduisent la conductance des canaux T et modifient leurs propriétés biophysiques en transférant leurs courbes d'inactivation à des potentiels plus négatifs, suggérant un mécanisme intéressant par lequel ces substances exercent leurs effets thérapeutiques. L'utilisation des larves de poisson zèbre comme un modèle pour le criblage de molécules à propriétés anticonvulsivantes nous a permis de montrer que l'inhibiteur sélectifs des canaux T ; le TTA-A2, supprime partiellement mais de manière significative, les crises pseudo-épileptiques chez larves de poisson zèbre, indiquant l'intérêt des bloqueurs des CCTT dans le traitement de l'épilepsie. De même, nos résultats montrent que les extraits de lavande et de romarin atténuent les crises épileptiformes chez le poisson zèbre. Nos résultats valident le modèle poisson zèbre comme étant un modèle prometteur pour le dépistage de nouvelles molécules antiépileptiques et constituent des données préliminaires prometteurs quant à l'utilisation de tels inhibiteurs synthétiques et naturels dans différentes formes de crises d'épilepsie chez l'Homme.

Comme perspectives, nous projetons

- L'étude de la spécificité de ces composés naturels en évaluant leurs effets sur les canaux HVA, les canaux TRP (TRPV, TRPA...),
- L'étude de leurs effets sur les canaux T natifs tels que les canaux calciques de type T neuronaux.

- Etude des caractéristiques pharmacologiques et biophysiques des canaux calciques de type T du poisson zèbre
- Mise en place de futures expériences afin de rechercher si l'effet anticonvulsivant implique l'inhibition des canaux calciques de type T en utilisant des injections de morpholino et/ou les stratégies d'inactivation génétiques
- L'intérêt des bloqueurs de canaux calciques de type T comme des substances anticonvulsivantes et des médicaments antiépileptiques dans les modèles de crises de poisson zèbre devrait être examiné d'avantages.

# **Annexe I**

# PLOS ONE

## Modulation of T-type Ca<sup>2+</sup> Channels by Lavender and Rosemary extracts

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	Modulation of T-type Ca <sup>2+</sup> Channels by Lavender and Rosemary extracts
<b>Short Title:</b>	Lavender and Rosemary inhibit T-type Ca <sup>2+</sup> Channels by extracts
<b>Corresponding Author:</b>	Philippe Lory Institut de Génomique Fonctionnelle Montpellier, FRANCE
<b>Keywords:</b>	T-type calcium channels; Patch-clamp; lavender extract; Rosemary extract; Linalool; Rosmarinic acid
<b>Abstract:</b>	Medicinal plants represent a significant reservoir of unexplored substances for early-stage drug discovery. Of interest, two flowering Mediterranean plants have been used for thousands of years for their beneficial effects on nervous disorders, including anxiety and mood. However, the therapeutic potential of these plants regarding their ability to target ion channels and neuronal excitability remains largely unknown. Towards this goal, we have investigated the ability of Lavender and Rosemary to modulate T-type calcium channels (TTCCs). TTCCs play important roles in neuronal excitability, neuroprotection, sensory processes and sleep. These channels are also involved in epilepsy and pain. Using the whole-cell patch-clamp technique, we have characterized how Lavender and Rosemary extracts, as well as their major active compounds Linalool and Rosmarinic acid, modulate the electrophysiological properties of recombinant TTCCs (CaV3.2) expressed in HEK-293 cells. Both the methanolic and essential oil extracts as well as the active compounds of these plants inhibit Cav3.2 current in a concentration-dependent manner. In addition, these products also induce a negative shift of the steady-state inactivation of CaV3.2 current with no change in the activation properties. Taken together, our findings reveal that TTCCs are a molecular target of the Lavender and Rosemary compounds, suggesting that inhibition of TTCCs could contribute to the anxiolytic and the neuroprotective effects of these plants.
<b>Order of Authors:</b>	Chaymae El Alaoui Jean Chemin Taoufiq Fechtali Philippe Lory
<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
<b>Financial Disclosure</b>  Please describe all sources of funding that have supported your work. A complete funding statement should do the following:  Include <b>grant numbers and the URLs</b> of any funder's website. Use the full name, not acronyms, of funding institutions, and use initials to identify authors who received the funding. <b>Describe the role</b> of any sponsors or funders in the study design, data	LabEx 'Ion Channel Science and Therapeutics'. Bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, Erasmus Mundus Averroes, L'Oréal-UNESCO for Women in Science

<p>collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. If they had no role in any of the above, include this sentence at the end of your statement: <i>"The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript."</i></p> <p>If the study was <b>unfunded</b>, provide a statement that clearly indicates this, for example: <i>"The author(s) received no specific funding for this work."</i></p> <p>* typeset</p>	
<p><b>Competing Interests</b></p> <p>You are responsible for recognizing and disclosing on behalf of all authors any competing interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other relevant financial or non-financial competing interests.</p> <p>Do any authors of this manuscript have competing interests (as described in the <a href="#">PLOS Policy on Declaration and Evaluation of Competing Interests</a>)?</p> <p><b>If yes</b>, please provide details about any and all competing interests in the box below. Your response should begin with this statement: <i>I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests:</i></p> <p><b>If no</b> authors have any competing interests to declare, please enter this statement in the box: <i>"The authors have declared that no competing interests exist."</i></p> <p>* typeset</p>	<p>The authors have declared that no competing interests exist</p>
<p><b>Ethics Statement</b></p> <p>You must provide an ethics statement if your study involved human participants, specimens or tissue samples, or vertebrate animals, embryos or tissues.</p>	<p>not applicable</p>

All information entered here should **also be included in the Methods section** of your manuscript. Please write "N/A" if your study does not require an ethics statement.

**Human Subject Research (involved human participants and/or tissue)**

All research involving human participants must have been approved by the authors' Institutional Review Board (IRB) or an equivalent committee, and all clinical investigation must have been conducted according to the principles expressed in the [Declaration of Helsinki](#). Informed consent, written or oral, should also have been obtained from the participants. If no consent was given, the reason must be explained (e.g. the data were analyzed anonymously) and reported. The form of consent (written/oral), or reason for lack of consent, should be indicated in the Methods section of your manuscript.

Please enter the name of the IRB or Ethics Committee that approved this study in the space below. Include the approval number and/or a statement indicating approval of this research.

**Animal Research (involved vertebrate animals, embryos or tissues)**

All animal work must have been conducted according to relevant national and international guidelines. If your study involved non-human primates, you must provide details regarding animal welfare and steps taken to ameliorate suffering; this is in accordance with the recommendations of the Weatherall report, "[The use of non-human primates in research](#)." The relevant guidelines followed and the committee that approved the study should be identified in the ethics statement.

If anesthesia, euthanasia or any kind of animal sacrifice is part of the study, please include briefly in your statement which substances and/or methods were applied.

<p>Please enter the name of your Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or other relevant ethics board, and indicate whether they approved this research or granted a formal waiver of ethical approval. Also include an approval number if one was obtained.</p> <p><b>Field Permit</b></p> <p>Please indicate the name of the institution or the relevant body that granted permission.</p>	
<p><b>Data Availability</b></p> <p>PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available, without restriction and from the time of publication, with only rare exceptions to address legal and ethical concerns (see the <a href="#">PLOS Data Policy</a> and <a href="#">FAQ</a> for further details). When submitting a manuscript, authors must provide a Data Availability Statement that describes where the data underlying their manuscript can be found.</p> <p>Your answers to the following constitute your statement about data availability and will be included with the article in the event of publication. <b>Please note that simply stating 'data available on request from the author' is not acceptable. If, however, your data are only available upon request from the author(s), you must answer "No" to the first question below, and explain your exceptional situation in the text box provided.</b></p> <p>Do the authors confirm that all data underlying the findings described in their manuscript are fully available without restriction?</p>	<p>Yes - all data are fully available without restriction</p>
<p>Please describe where your data may be found, writing in full sentences. <b>Your answers should be entered into the box below and will be published in the form you provide them, if your manuscript is accepted.</b> If you are copying our sample text below, please ensure you replace any instances of <b>XXX</b> with the appropriate details.</p> <p>If your data are all contained within the paper and/or Supporting Information files, please state this in your answer below. For example, "All relevant data are within</p>	<p>All relevant data are within the paper</p>

the paper and its Supporting Information files.”

If your data are held or will be held in a public repository, include URLs, accession numbers or DOIs. For example, “All XXX files are available from the XXX database (accession number(s) XXX, XXX).” If this information will only be available after acceptance, please indicate this by ticking the box below. If neither of these applies but you are able to provide details of access elsewhere, with or without limitations, please do so in the box below. For example:

“Data are available from the XXX Institutional Data Access / Ethics Committee for researchers who meet the criteria for access to confidential data.”

“Data are from the XXX study whose authors may be contacted at XXX.”

\* typeset

Additional data availability information:



**Institut de Génomique Fonctionnelle**

CNRS UMR5203 - INSERM U1191 - Université de Montpellier



---

**Philippe Lory, PhD** – CNRS Research Director – IGF Deputy Director

Team " Ion channels in neuronal excitability and diseases "  
Neuroscience Department / Biology of Ion Channels

Montpellier, September 23<sup>rd</sup> 2015

Dear Editor,

Please find enclosed our manuscript entitled "**Modulation of T-type calcium channels by Lavender and Rosemary extracts**" by El Alaoui and colleagues that we would like to be considered for publication in **PLoS ONE**. All co-authors have agreed upon this submission and this article is not under review at any other journal.

In this article, we describe the pharmacological inhibition of Cav3.2 T-type calcium channels by Lavender and Rosemary extracts and their major active principles, respectively Linalool and Rosmarinic acid. Medicinal plants have been used throughout human history and interest in Lavender and Rosemary is high as they are the most popular medicinal plants cultivated in the Mediterranean basin. To date, little is known to date regarding the ability of natural products to modulate ionic channels, especially T-type calcium channels that have important physiological roles especially in neuronal excitability. Here we provide a detailed electrophysiological analysis of the T-type current inhibition by these compounds at relevant pharmacological concentrations. This inhibition is accompanied by a negative shift in the steady-state inactivation properties indicating a preferential binding to the inactivated state Cav3.2 channels. Overall, our findings reveal that inhibition of T-type channels could contribute to the beneficial effects (e.g. anxiolytic and neuroprotective) of these plants.

These findings are novel and our article is rather short and straightforward to pinpoint the important message that T-type calcium channels are blocked by Lavender and Rosemary extracts. We strongly believe that our article meets the standards of PLoS ONE and that our findings are of great interest for many readers of the journal.

We look forward to your response.

Sincerely yours,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'P. Lory'.

Philippe Lory, PhD

---

Mailing address :

Institut de **G**énomique **F**onctionnelle – 141, rue de la Cardonille – F-34094 Montpellier cedex 05 – France

**Tel** : 00 33 (0) 434 359 251 - **Fax** : 00 33 (0) 467 542 432 – **email** : philippe.lory@igf.cnrs.fr

## **Modulation of T-type Ca<sup>2+</sup> Channels by Lavender and Rosemary extracts**

Chaymae El Alaoui<sup>1,2,3,4,5</sup>, Jean Chemin<sup>1,2,3,4</sup>, Taoufiq Fechtali<sup>5</sup> and Philippe Lory<sup>1,2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Montpellier, <sup>2</sup>CNRS UMR 5203, <sup>3</sup>INSERM U1191, Département Neurosciences & Ion Channel Biology, Institut de Génétique Fonctionnelle, Montpellier, F-34094 France; <sup>4</sup>LabEx 'Ion Channel Science and Therapeutics', Montpellier, F34094 France; <sup>5</sup>Laboratoire de Neurosciences, Physiopathologies Intégrées et Substances Naturelles, Faculté des Sciences et Techniques Mohammed VI, Université Hassan II, Casablanca, Morocco.

### **\* Corresponding author**

Dr Philippe Lory,

Institut de Génétique Fonctionnelle, 141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier cedex 5, France.

email : [philippe.lory@igf.cnrs.fr](mailto:philippe.lory@igf.cnrs.fr) ; Tel : +33 434 359 251 ; Fax : + 33 467 542 432

## **Abstract**

Medicinal plants represent a significant reservoir of unexplored substances for early-stage drug discovery. Of interest, two flowering Mediterranean plants have been used for thousands of years for their beneficial effects on nervous disorders, including anxiety and mood. However, the therapeutic potential of these plants regarding their ability to target ion channels and neuronal excitability remains largely unknown. Towards this goal, we have investigated the ability of Lavender and Rosemary to modulate T-type calcium channels (TTCCs). TTCCs play important roles in neuronal excitability, neuroprotection, sensory processes and sleep. These channels are also involved in epilepsy and pain. Using the whole-cell patch-clamp technique, we have characterized how Lavender and Rosemary extracts, as well as their major active compounds Linalool and Rosmarinic acid, modulate the electrophysiological properties of recombinant TTCCs ( $Ca_v3.2$ ) expressed in HEK-293 cells. Both the methanolic and essential oil extracts as well as the active compounds of these plants inhibit  $Ca_v3.2$  current in a concentration-dependent manner. In addition, these products also induce a negative shift of the steady-state inactivation of  $Ca_v3.2$  current with no change in the activation properties. Taken together, our findings reveal that TTCCs are a molecular target of the Lavender and Rosemary compounds, suggesting that inhibition of TTCCs could contribute to the anxiolytic and the neuroprotective effects of these plants.

## **Keywords:**

T-type calcium channels; Patch-clamp; lavender extract; Rosemary extract; Linalool; Rosmarinic acid; patch-clamp

**Abbreviations :** TTCC, T-type calcium channel;  $Ca_v$ , voltage-gated calcium channel; HEK, human embryonic kidney; GFP, green fluorescent protein; HP, holding potential.

## Introduction

Medicinal plants have been identified and used throughout human history [1]. Because of their ability to synthesize a wide variety of chemical compounds (alkaloids, polyphenolics, terpenoids, fatty acids and lipids, etc.) either for their normal development or against stressful and threatening conditions, they have been suggested to be an interesting source of drugs either in the form of traditional preparations or as pure active principles for the pharmaceutical industry. Moreover, because of the potential side and adverse effects of synthetic drugs, scientists interested in drug discovery have turned their attention to herbal medicines as effective lead compounds for the management of health ailments including inflammatory, cardiovascular and neurological disorders [2,3]. It's worth noting that 49% of the new chemical drugs that were introduced between 1991 and 2002 had a natural origin witnessing the growing popularity of medicinal plants use worldwide [4].

Lavender and Rosemary are the most popular medicinal plants cultivated and grown nowadays. Natives to the Mediterranean basin and Southern Europe, they have been used either dried or as essential oil for a variety of culinary, cosmetic and therapeutic purposes [5-7]

Studies have reported the existence of approximately 28 species and over than 200 varieties of Lavender (*Lavandula sp.*). The genus Lavender belongs to the Labiatae/Lamiaceae family and is divided into four main species: *Lavandula latifolia*, *Lavandula angustifolia (LA)*; *Lavandula stoechas (LS)* and *Lavandula x intermedia* [8]. Lavender essential oil is generally produced by steam distillation and contains a complex mixture of mono- and sesquiterpenoid alcohols, esters, oxides, and ketones, in which the major components are the monoterpenoids linalool and linalyl acetate [5]. Lavender oil was suggested to possess anticonvulsant, anxiolytic, analgesic and neuroprotective properties [5,9-12].

Rosemary (*Rosmarinus officinalis, RO*) is one of the most interesting medicinal plants known for its promising medicinal virtues. *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) oil consists of high percentages of biologically active compounds such as phenolic acids (Rosmarinic acid, chlorogenic acid), phenolic diterpenes (e.g. carnosic acid, carnosol), and flavonoids (e.g. derivatives of apigenin and luteolin) [13,14]. A developing body of evidence suggests Rosemary to be a powerful remedy for various medical issues thanks to its anti-oxidant, antinociceptive, and neuroprotective properties [15-18]. Rosmarinic acid, one of the major components of *RO*, is a polyphenolic compound and has been shown to possess anti-inflammatory, anti-oxidant and anxiolytic/antidepressive-like properties [19-21].

The precise mode of action of these two medicinal plants remains unclear. Studies to unveil the molecular mechanisms implicated in their therapeutical effects have recently suggested the modulation of the GABAergic [22], the serotonergic neurotransmission [23], as well as voltage-gated calcium channels including high voltage-activated (HVA) calcium channels by *Lavandula angustifolia* [11]. However, it has not been investigated whether Lavender (*Lavandula angustifolia* and *Lavandula stoechas*) and Rosemary can also affect low voltage-activated (LVA), T-type calcium channels (TTCCs).

Compared to HVA calcium channels, TTCCs are specifically activated by small membrane depolarization that allow calcium entry near the cell membrane resting potential [24,25]. Heterogeneity in the functional properties of TTCCs is supported by molecular studies that have described three genes encoding these channels: the Cav3.1, Cav3.2, and Cav3.3 subunits [24,26]. These subunits are differentially expressed throughout the body, especially in the brain [27]. TTCCs are broadly involved in many physiological processes including sleep [28], proliferation [29,30], neuronal firing, epilepsy [31] and pain [32,33]. Furthermore, recent studies have reported TTCCs to be an interesting molecular target for various natural substances like bioactive lipids and lipoaminoacids [34-36], toxins [37] and natural products from plants including the genera Cannabis, Curcuma and Syzygium [38-40].

In the present study, we have searched for plant extracts modulating TTCCs and we describe the pharmacological inhibition of TTCCs by Lavender and Rosemary using Cav3.2 channels expressed in HEK-293.

## **Materials and Methods**

### **Methanolic extraction protocol.**

*Lavandula stoechas*, *Rosmarinus officinalis*, *Ricinus cummunis* and *Citrullus colocynthis* were collected in Agadir, Morocco. The botanical identity of each plant was determined and authenticated by taxonomist from the National Institute of Agronomic Research (INRA), Agadir, Morocco. Fresh plant materials were dried at 40°C during 48 to 96 hours, then homogenized to fine powder by grinding and sieving until the stabilization of weight. 20 g of dried plant materials were extracted with 200 ml of pure methanol and kept on a rotary shaker for maceration for a total duration of 72h. Thereafter, the extracts were filtered and evaporated to dryness in Rotavapor<sup>®</sup> vacuum (60 rpm at 40°C). The final extracts were stored at 4°C for further studies.

### **Plant essential oil and active principles.**

Essential oils of *Lavandula steachas*, *Lavandula angustifolia* Miller and *Rosmarinus officinalis* were purchased from Vitalba (Sartène, France). Rosmarinic acid (RA) and Linalool were purchased from Sigma-Aldrich.

### **Cell culture and transfection protocols.**

HEK-293 cells stably expressing the Cav3.2 channels isoform (kindly provided by Dr. E. Perez-Reyes, University of Virginia) were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with GlutaMax, 400µg/ml G418 (Life Technologies) and 10 % fetal bovine serum (Invitrogen). In some experiments, HEK-293 cells transfection with plasmids expressing human Cav3 constructs was performed using jet-PEI (QBiogen) with a DNA mix containing 0.5 % of a GFP encoding plasmid and 99.5 % of the Cav3 constructs. Two days after transfection, HEK-293 cells were dissociated with Versene (Invitrogen) and plated at a density of  $\sim 35 \times 10^3$  cells in 35 mm Petri dish for electrophysiological recordings performed the following day.

### **Electrophysiological recordings.**

Whole-cell calcium currents were recorded at room temperature using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices). For recording macroscopic T-type calcium currents, the extracellular solution contained the following (in mM): 135 NaCl, 20 TEACl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, and 10 HEPES (pH adjusted to 7.25 with KOH,  $\sim 330$  mOsm). Brosilicate glass pipettes have a typical resistance of 1.5-2.5 MOhm when filled with the internal solution containing the following (in mM): 140 CsCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 3 Mg-ATP, 0.6 GTPNa, and 3 CaCl<sub>2</sub> (pH adjusted to 7.25 with KOH  $\sim 315$  mOsm). Recordings were filtered at 2 kHz. During the Cav3.2 current recordings, the chamber was constantly perfused with the control and drug solutions using a gravity-driven homemade perfusion device (see indications in the figures). Data were analyzed using the pCLAMP9 (Molecular devices) and GraphPad Prism (GraphPad) softwares. The dose-response curves were obtained from fitting data to the Hill equation,  $I/I_{MAX} = 100 / (1 + 10^{(LogIC50 - Log[compound]) * HillSlope})$ . Current-voltage (*I-V*) curves were fitted using a combined Boltzmann and linear Ohmic relationships, where  $I =$

$G_{max} \times (V_m - V_{rev}) / (1 + \exp((V_m - V_{m0.5}) / \text{slope factor}))$ . Correspondingly, steady-state inactivation curves were fitted using the Boltzmann equation where  $I/I_{max} = 1 / (1 + \exp((V_m - V_{m0.5}) / \text{slope factor}))$ .

### **Statistical analysis.**

Results are presented as the mean  $\pm$  SEM, and  $n$  is the number of cells used. Statistical significance was evaluated by Student's unpaired t-test (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ )

## **Results**

### ***Modulation of Cav3.2 calcium channels by medicinal plant methanolic extracts***

In a first set of experiments, we tested the ability of several Mediterranean medicinal plants to modulate TTCCs. These experiments were performed using recombinant Cav3.2 channels. Cav3.2 channel modulation was determined by measuring the T-type current in whole cell configuration on cells stepped from -80 to -30 mV following superfusion of the extracts at a concentration of 30  $\mu\text{g/ml}$ . Figure 1 illustrates the efficacy of four methanolic plant extracts by showing typical Cav3.2 current trace recordings and the corresponding time plots. Application of *Lavandula stoechas* (LS) inhibited significantly Cav3.2 channels (Fig 1, A and B). The average current inhibition induced by 30  $\mu\text{g/ml}$  of LS was 85% ( $I/I_{ctrl} = 15 \pm 5.2\%$   $p < 0.01$ ,  $n=6$ ). LS developed a fast inhibitory effect that did not readily reverse upon wash-out. Similarly, a 42% inhibition ( $I/I_{ctrl} = 68 \pm 2.0\%$   $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) was obtained following application of the methanolic extract of *Rosmarinus officinalis* (RO) on Cav3.2 currents (Fig 1, C and D). On the contrary, no significant inhibition was obtained after the application of *Ricinus cummunis* (RC) (Fig 1, E and F,  $I/I_{ctrl} = 95.7 \pm 1.5\%$ ,  $n=7$ ) and *Citrullus colocynthis* (CC) extracts (Fig 1, G and H,  $I/I_{ctrl} = 95.4 \pm 2.1\%$ ,  $n=6$ ). These data led us to further investigate the efficacy of *Lavandula* and *Rosmarinus* species to modulate Cav3.2 channels.

### ***Cav3.2 channel inhibition by Lavandula species and Linalool is concentration-dependent***

Next, we characterized the effect of two *Lavandula* species essential oils; *Lavandula stoechas* (*LS*), *Lavandula angustifolia* Miller (*LA*) and their active principle Linalool.  $\text{Ca}_v3.2$  current recordings were performed during application of increasing concentrations of *LS*, *LA* and Linalool (Fig 2). T-type current inhibition by these three compounds was concentration-dependent. Analysis of the dose-response curve after treatment with *LS* essential oil revealed  $\text{IC}_{50}$  values of  $16.9 \pm 2.9 \mu\text{g/ml}$  ( $n=7$ ) with a Hill slope value of  $0.9 \pm 0.1$  (Fig 2A). TTCCs were also inhibited by serial concentrations of *LA* Miller essential oil solutions (Fig 2B). The  $\text{IC}_{50}$  value for *LA* Miller inhibition of  $\text{Ca}_v3.2$  currents was  $34.1 \pm 2.9 \mu\text{g/ml}$  (Fig 2B,  $n=8$ ) with a Hill slope factor of  $1.9 \pm 0.4$ . For  $\text{Ca}_v3.2$  current inhibition by Linalool, the  $\text{IC}_{50}$  value was  $84 \pm 8.8 \mu\text{M}$  with a Hill slope factor of  $1.01 \pm 0.08$  (Fig 2C,  $n=7$ ).

### ***Effects of Lavandula essential oils and Linalool on $\text{Ca}_v3.2$ channel activation***

Inhibition of  $\text{Ca}_v3.2$  channels by Lavender and its natural constituent Linalool may be related to specific modifications in  $\text{Ca}_v3.2$  channel gating properties. Hence, we investigated whether TTCC inhibition by Lavender could be related to change in channel availability or activation properties. Toward this goal, the inhibitory effect of these natural compounds on  $\text{Ca}_v3.2$  current was studied for a wide range of depolarizing test potentials (TPs) from  $-80$  to  $+50$  mV. Representative  $\text{Ca}_v3.2$  current traces before and after the application of  $30 \mu\text{g/ml}$  *LS* are shown in Figure 3A (top and bottom panels respectively), as well as the corresponding current-voltage (*I-V*) curves (Fig 3B). These average *I-V* curves show that  $30 \mu\text{g/ml}$  of *LS* inhibit the amplitude of  $\text{Ca}_v3.2$  currents similarly at all membrane potentials (Fig 3B,  $n=6$ ). Moreover, application of *LS* did not significantly shift the activation curve of  $\text{Ca}_v3.2$  channels. The  $V_{0.5}$  for activation was  $-53.8 \pm 0.4$  mV for control condition and  $-54.9 \pm 0.4$  mV during *LS* application, respectively, revealing no significant change in steady-state activation in the presence of *LS* ( $n=6$ ,  $p$  value = 0.11, Fig 3B). In addition, fitting of the individual current traces, as presented in Figure 3A, revealed that neither activation nor inactivation kinetics of  $\text{Ca}_v3.2$  channels were changed after Lavender treatment (Fig 3, C and D). Similar results were obtained with  $50 \mu\text{g/ml}$  *LA* Miller essential oil (Fig 3E,  $n=5$ ) and  $100 \mu\text{M}$  Linalool (Fig 3F,  $n=6$ ). Inhibition of  $\text{Ca}_v3.2$  currents following treatment with *LA* Miller essential oil and Linalool was conserved over the complete range of test potentials. Also, the threshold potential for activation and the membrane potential of the maximum peak current were the same before and during the application of *LA* Miller, with no significant shift in the activation curve of  $\text{Ca}_v3.2$  currents ( $V_{0.5\text{Ctrl}} = -54.8 \pm 0.4$  mV and  $V_{0.5\text{LAMiller}} = -54.1 \pm 0.3$

mV,  $n=5$ ,  $p=0.19$ ), and Linalool ( $V_{0.5Ctrl}=-50.5 \pm 0.7$  mV and  $V_{0.5Linalool} = -52.3 \pm 0.8$  mV,  $n=6$ ,  $p=0.14$ ).

### ***Effects of Lavandula on Cav3.2 current steady-state inactivation***

We next examined whether Lavender and its constituents could modify the steady-state inactivation properties of Cav3.2 channels. A representative family of Cav3.2 currents evoked by the protocol designed to measure steady-state inactivation is depicted in Figure 4A before (top traces) and during the application of 30  $\mu\text{g/ml}$  *LS* (bottom traces). *LS* (30  $\mu\text{g/ml}$ ) produced a depressant action of the maximal conductance of Cav3.2 channels as well as a significant hyperpolarizing shift of steady-state inactivation from  $-75.8 \pm 1.1$  mV in control conditions to  $-81.3 \pm 1.0$  mV in *LS* ( $n=6$ ,  $p<0.05$ , Fig 4B). Similar results were obtained after application of *LA Miller* (50  $\mu\text{g/ml}$ , Fig 4C) and Linalool (100  $\mu\text{M}$ , Fig 4D) with a significant shift in the steady-state inactivation from  $-75.9 \pm 0.7$  mV to  $-83.1 \pm 0.8$  mV for *LA Miller* ( $n=5$ ,  $p<0.001$ ) and from  $-74.6 \pm 0.7$  mV to  $-81.3 \pm 0.6$  mV for Linalool ( $n=6$ ,  $p<0.001$ ). These data demonstrate that Lavender constituents inhibit Cav3.2 current by decreasing the maximal conductance of Cav3.2 channels and induce a negative shift of Cav3.2 steady state-inactivation curve, suggesting that Lavender compounds could interact with the inactivated state of TTCCs.

### ***Inhibition of Cav3.2 calcium channels by Rosmarinus officinalis and Rosmarinic acid***

Next, we studied the effects of *Rosmarinus officinalis* (*RO*) and its active principle Rosmarinic acid (*RA*), a caffeic acid ester compound, on the modulation of Cav3.2 channels. The Cav3.2 current was inhibited by *RO* in a concentration-dependent manner (Fig 5A,  $n=6$ ). Cav3.2 current inhibition by *RO* yielded an  $IC_{50}$  was of  $53.5 \pm 3.7$   $\mu\text{g/ml}$  with hillslope value of  $0.7 \pm 0.05$  (Fig 5B,  $n=6$ ). Furthermore, *RA* similarly inhibited Cav3.2 current in a concentration-dependent manner. The  $IC_{50}$  value was  $48.2 \pm 1.4$   $\mu\text{M}$  with a Hillslope value of  $1.5 \pm 0.2$  (Fig 5, C and D,  $n=6$ ).

### ***Effect of Rosmarinus officinalis and Rosmarinic acid on Cav3.2 channel activation and inactivation***

Similar to that described for Lavender compounds, we then studied the effect of *RO* and *RA* on  $\text{Ca}_v3.2$  activation and inactivation properties. Analysis of current traces and  $I-V$  curves revealed that *RO* (50  $\mu\text{g/ml}$ ) inhibited  $\text{Ca}_v3.2$  currents at all tested potentials without changing the steady-state activation properties ( $V_{0.5\text{Control}} = -52.8 \pm 0.4$  mV,  $V_{0.5\text{RO}} = -53.5 \pm 0.5$  mV,  $n=7$ ,  $p=0.3$ , Fig 6A). Same results were obtained after treatment with 50  $\mu\text{M}$  *RA* ( $V_{0.5\text{Control}} = -51.8 \pm 0.6$  mV,  $V_{0.5\text{RA}} = -50.6 \pm 1.3$  mV,  $n=6$ ,  $p=0.4$ , Fig 6C). To further elucidate the blocking mechanisms of *RO* and *RA*, steady-state inactivation was determined in the absence and presence of these natural substances. These experiments showed that treatment with 50  $\mu\text{g/ml}$  *RO* both reduced the maximal conductance of  $\text{Ca}_v3.2$  channels and negatively shifted the midpoint of voltage-dependence of inactivation for  $\text{Ca}_v3.2$  towards negative potential ( $V_{0.5\text{Control}} = -73.7 \pm 0.9$  mV,  $V_{0.5\text{RO}} = -77.8 \pm 1.1$  mV,  $n=7$ ,  $p<0.05$ , Fig 6B). The application of 50  $\mu\text{M}$  of *RA* induced a shift towards more negative membrane potentials ( $V_{0.5\text{Control}} = -77.4 \pm 0.8$  mV,  $V_{0.5\text{RA}} = -82.4 \pm 1.2$  mV,  $n=6$ ,  $p<0.01$ , Fig 6D). In addition, neither activation nor inactivation kinetics were changed after *RO* and *RA* treatment of  $\text{Ca}_v3.2$  channels (data not shown).

### ***Lavandula steochas and Rosmarinus officinalis preferentially bind to the inactivated state of T-type calcium channels***

A growing body of reports suggested that TTCC blockers bind to / stabilize the inactivated state of these channels [38,41,42]. Indeed, the negative shift induced by Lavender and Rosemary in the channel availability suggests that these natural compounds preferentially bind to the inactivated state of  $\text{Ca}_v3.2$  channels, thus shifting the equilibrium away from states from which channels can open [43]. To evaluate further whether Lavender and Rosemary compounds bind to the inactivated state of TTCCs, we have measured the inhibition of  $\text{Ca}_v3.2$  currents by of *LS* and *RS* at HPs -100 and -80 mV (Fig 7, upper graphs). If the effects of *LS* and *RO* on channel inactivation would contribute significantly to the inhibition of the  $\text{Ca}_v3$  channels, then applying *LS* and *RO* to cells voltage-clamped at potentials significantly more negative than -80 mV would produce less current inhibition. As expected, the inhibition by *LS* (20  $\mu\text{g/ml}$ ) was significantly more important when cells were held at HP -80 mV ( $70 \pm 4.4$  %,  $n=6$ ) than at HP -100 mV ( $51 \pm 5.3$  %,  $n=6$ ,  $p<0.05$ ). Same data were obtained after the application of *RO* (20  $\mu\text{g/ml}$ ) with  $41.3 \pm 1.7\%$  of inhibition at HP -80 mV and  $23.4 \pm 1.7\%$  inhibition at HP -100 mV ( $n=6$   $p<0.01$ ). The efficacy of washout was examined for the two extracts at HPs -100 and -80 mV (Fig 7, lower graphs) and,

conversely, washout appeared significantly more efficient at HP -100 mV ( $LS_{\text{washout}} = 91.6 \pm 1.8\%$ ,  $RO_{\text{washout}} = 87.7 \pm 3.0\%$ ) than at HP -80 mV ( $LS_{\text{washout}} = 32.6 \pm 3.1\%$ ,  $RO_{\text{washout}} = 51.7 \pm 2.5\%$ ,  $p < 0.001$ ). Taken together, the results suggest that these natural compounds preferentially bind to, and stabilize, the inactivated states of  $Ca_v3.2$  channels.

## Discussion

In this study, we describe several important findings. First, among a selection of Mediterranean medicinal plants including *Lavandula stoechas*, *Rosmarinus officinalis*, *Ricinus cumunis* and *Citrullus colocynthis*, we have identified that Lavender and Rosemary compounds could significantly inhibit the  $Ca_v3.2$  TTCCs in a concentration-dependent manner. Importantly, Lavender and Rosemary are widely used medicinal plants. Second, our results provide evidence that their active principles, Linalool and Rosmarinic acid respectively, also inhibit  $Ca_v3.2$  channels. Third, we report that these compounds induce a negative shift in the steady-state inactivation properties and we show that their inhibitory effect on  $Ca_v3.2$  channels is significantly enhanced in the range of physiological membrane potential (HP -80 mV), compared to more negative potential (HP -100 mV). Taken together, our findings support a pharmacological modulation of TTCCs by Lavender and Rosemary and we suggest that TTCC inhibition by these natural components may contribute to the neuroprotective and anticonvulsant activities of these medicinal plants.

Lavender (*Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia* Miller) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) all inhibit the amplitude of  $Ca_v3.2$  current in a dose-dependent manner. The  $IC_{50}$  values of *L. stoechas*, *L. angustifolia* Miller and *R. officinalis* were estimated to be 16.9, 34.1 and 53.5  $\mu\text{g/ml}$  respectively, suggesting that  $Ca_v3.2$  channels are more sensitive to *Lavandula* species and in particular to *Lavandula stoechas*. Furthermore, Lavender and Rosemary also inhibit the other TTCC isoforms,  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.3$ . The  $IC_{50}$  values for *LA* Miller inhibition were  $26.1 \pm 4.8 \mu\text{g/ml}$  ( $n=7$ ) for  $Ca_v3.1$  and  $86.2 \pm 18.1 \mu\text{g/ml}$  for  $Ca_v3.3$  ( $n=7$ ) (data not shown). Interestingly, the percentage of inhibition obtained after treatment of the various TTCCs with 10  $\mu\text{g/ml}$  of *LA* Miller (31% for  $Ca_v3.1$ , 16% for  $Ca_v3.2$  and 10% for  $Ca_v3.3$ ) is similar to that obtained after treatment of HVA, P/Q-type calcium channels with Silexan (25%), a patented active substance produced from *L. angustifolia* flowers by steam distillation and consisting of the main active constituents linalool and linalyl acetate [11]. Altogether, our

data extend previous electrophysiological studies describing the effect of Lavender and its active principle Linalool on other voltage-gated calcium channels [11,44]. Importantly, we report for the first time to our knowledge, inhibition of voltage-gated calcium channels, in particular TTCCs, by *Rosmarinus officinalis* and its active principle Rosmarinic acid.

Linalool is a monoterpene compound reported to be the major component of Lavender essential oil. It has been reported to trigger glutamate activation in response to NMDA receptors modulation in the cerebral cortex [45] and reduces acetylcholine release at mouse neuromuscular junction by modifying nicotinic receptors kinetics [46], suggesting possible pathways in sedative and anticonvulsant effects in mice [47,48]. Other studies to investigate the molecular mechanisms associated with linalool therapeutic virtues revealed that Linalool could interact with voltage-gated channels, in particular voltage-gated calcium channels [11,44]. Narusuye et al. found that Linalool non-selectively suppresses the voltage-gated currents  $I_{Ca,L}$ ,  $I_K$ ,  $I_A$ , and  $I_{K_a}$  in retinal horizontal cells as well as the currents  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca,L}$ ,  $I_K$ ,  $I_A$ , and  $I_{K(Ca)}$  in retinal ganglion cells. Fura-2-based calcium imaging technique was used to test the effect of linalool on newt olfactory receptor cells (ORC) expressing both  $I_{Ca,L}$  and  $I_{Ca,T}$  (Kawai *et al.*, 1996) and showed that 3 mM Linalool reversibly inhibited calcium currents in ORC by  $44.9 \pm 2.6\%$  [44]. Similarly, Schuwald et al. reported a decrease on KCl-induced calcium influx in murine synaptosomes after treatment with linalool and linalyl acetate concentrations (1  $\mu$ M), suggesting potent anxiolytic properties of linalool via modulation of voltage-dependent calcium channels [11]. Our electrophysiological study confirms the inhibition of voltage-gated calcium channels, specifically TTCCs, by Linalool. Linalool attenuates  $Ca_v3.2$  currents in a dose-dependent manner. The  $IC_{50}$  for Linalool inhibition of TTCCs estimated to be 84  $\mu$ M is found to be lower than the  $IC_{50}$  obtained for the inhibition of other ionic channels in different preparations. As an example, The  $IC_{50}$  values of Linalool blockade for the voltage-gated sodium is estimated to be around 560  $\mu$ M [44], suggesting that Linalool is more potent in inhibiting  $Ca_v3.2$  channels.

Rosmarinic acid has been shown to exert neuroprotective effect against antioxidative stress and excitotoxicity and to possess anxiolytic/antidepressive-like effects [21,49]. The mechanism by which RA exerts its anti-inflammatory effects is not well understood, although it has been shown that RA inhibits lipoxigenase [50] and cyclooxygenase activity [51], block complement activation [52] and T-cell antigen receptor (TCR)-mediated signaling [53]. Whether Rosmarinic acid could modulate ion channels, especially voltage-gated channels, was currently unknown. Our study therefore reveals that TTCCs, are inhibited by *Rosmarinus*

*officinalis* and Rosmarinic acid in a dose- and voltage-dependent fashion. Consequently, TTCCs represent a novel molecular target for Rosmarinic acid.

Inhibition of TTCCs is highly dependent on their inactivation state. Analysis of the biophysical properties of Cav3.2 channels before and after Lavender (*Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia* Miller and *Linalool*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* and Rosmarinic acid) treatments showed that these natural compounds not only reduced the maximal conductance of Cav3.2 channels but also shifted the steady-state inactivation properties towards more negative membrane potentials without having effect on the activation properties. Our study describes that inhibition of Cav3.2 channels by Lavender and Rosemary was significantly enhanced for HP -80 mV, compared to HP -100 mV (Fig 7). Indeed, the blocking effect was more efficient at a HP mimicking resting's membrane potential, at which a large fraction of TTCCs are inactivated [43,54]. This suggests an interesting mechanism by which Lavender and Rosemary could attenuate the cell excitability by decreasing intracellular calcium concentration and inducing sedative and/or anticonvulsant-like effects, as well as other various therapeutic effects such as neuroprotective properties. Our results showing that these compounds negatively shift the inactivation state suggest that these natural compounds interact with inactivated TTCCs and stabilize them in the inactivated state. This is reminiscent to that reported for phenylalkylamines and dihydropyridines that bind preferentially to the inactivated state of L-type calcium channels (HVA), conferring tissue-selectivity of these drugs that are useful as antihypertensive and antiarrhythmics treatments [55,56].

TTCCs represent novel interesting molecular targets for pain and epilepsy [31,33,57-59]. Inhibition of TTCCs has been reported to play an important role in the therapeutic action of many drugs [60]. For example, Gomora et al. confirmed the hypothesis that the blockade of TTCCs may underlie the therapeutic usefulness of succinimide antiepileptics [61]. In the same context, Tringham and coworkers have identified two high affinity TTCC blockers that were able to attenuate burst firing of thalamic reticular nucleus neurons in the Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS) [62]. Blockade of TTCCs is suggested to be useful in a wide variety of neurological disorders such as neuropathic pain [63,64]. Indeed, Jagodic and collaborators have demonstrated that TTCCs are significantly upregulated in small dorsal root ganglion (DRG) during chronic constriction injury (CCI)-induced neuropathy [65]. Therefore, the inhibition of TTCCs by NNC 55-0396, a selective TTCC inhibitor [66] was suggested to be useful in decreasing pre- and postsynaptic transmission and the neuronal activity in anterior cingulate cortex after a CCI leading to the attenuation of neuropathic pain

[67]. ABT-639 is a peripherally acting TTCC blocker that selectively inhibits T channels in a dose-dependent manner. In preclinical studies, oral administration of ABT-639 was reported to alleviate nociceptive and neuropathic pain in rat models [68]. However, phase 2 clinical studies using microneurography, a relevant technique that assesses abnormal spontaneous activity in C-nociceptors as a marker for spontaneous pain, revealed that administration of ABT-639 100 mg twice daily did not reduce neuropathic pain in diabetic patients [69,70]. Interestingly, Z944, a potent selective blocker of TTCCs (50-160 nM) has shown to be effective in reducing pain in preclinical models as well as in human patients [71].

Other studies have also suggested TTCCs as interesting molecular targets for natural compounds. Eugenol, a local analgesic used in clinical dentistry that naturally present in cloves (*Syzygium aromaticum*) modulates TTCCs in a dose-dependent fashion with  $IC_{50}$  of 500  $\mu$ M. The depressant effect of Eugenol on TTCCs was suggested to inhibit action potentials and the neuronal conduction of sensory signals in TG neurons leading to eugenol pain-relieving action [38]. Furthermore, Ross et al. have demonstrated that  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol, the most prevalent biologically active constituents of *Cannabis sativa*, inhibit recombinant as well as native TTCCs [39]. Interestingly, Cannabidiol is currently under development as an antiepileptic drug [72]. It is likely that attenuation of TTCC conductance causes the decrease in neurotransmitter release mediated by these compounds contributing to the well-known psychoactive actions of cannabinoids, as well as the anti-nociceptive and anticonvulsant properties [39,72-74].

## **Conclusion**

Our data show that Lavender and Rosemary extracts efficiently inhibit TTCCs by preferentially binding to their inactivated state. Altogether, this study demonstrates that TTCCs represent a novel molecular target for Lavender and Rosemary likely to be involved in some of the Mediterranean medicinal plants' therapeutic virtues.

## **Acknowledgements**

This work was supported by LabEx 'Ion Channel Science and Therapeutics'. C. El Alaoui was supported by 'Bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Scientifique' Maroc, Erasmus Mundus Averroes and L'Oréal-UNESCO for Women in Science Programs. Authors are grateful to Dr. Isabelle Bidaud for critical help with cell culture. Special thanks to Dr. R. Bouharroud (INRA, Agadir) for plant extraction protocols.

### **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **References**

1. Petrovska BB (2012) Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev* 6: 1-5.
2. Sen T, Samanta SK (2014) Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 147: 59-110.
3. Sucher NJ, Carles MC (2015) A pharmacological basis of herbal medicines for epilepsy. *Epilepsy Behav.*
4. Koehn FE, Carter GT (2005) The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4: 206-220.
5. Woronuk G, Demissie Z, Rheault M, Mahmoud S (2011) Biosynthesis and therapeutic properties of Lavandula essential oil constituents. *Planta Med* 77: 7-15.
6. Koulivand PH, Khaleghi Ghadiri M, Gorji A (2013) Lavender and the nervous system. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 681304.
7. Ngo SN, Williams DB, Head RJ (2011) Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51: 946-954.
8. Cavanagh HM, Wilkinson JM (2002) Biological activities of lavender essential oil. *Phytother Res* 16: 301-308.
9. Heuberger E, Hongratanaworakit T, Bohm C, Weber R, Buchbauer G (2001) Effects of chiral fragrances on human autonomic nervous system parameters and self-evaluation. *Chem Senses* 26: 281-292.

10. Gilani AH, Aziz N, Khan MA, Shaheen F, Jabeen Q, et al. (2000) Ethnopharmacological evaluation of the anticonvulsant, sedative and antispasmodic activities of *Lavandula stoechas* L. *J Ethnopharmacol* 71: 161-167.
11. Schuwald AM, Noldner M, Wilmes T, Klugbauer N, Leuner K, et al. (2013) Lavender oil-potent anxiolytic properties via modulating voltage dependent calcium channels. *PLoS One* 8: e59998.
12. Lehrner J, Marwinski G, Lehr S, Jöhren P, Deecke L (2005) Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. *Physiol Behav* 86: 92-95.
13. Herrero M, Plaza M, Cifuentes A, Ibanez E (2010) Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *J Chromatogr A* 1217: 2512-2520.
14. Xiao C, Dai H, Liu H, Wang Y, Tang H (2008) Revealing the metabonomic variation of rosemary extracts using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *J Agric Food Chem* 56: 10142-10153.
15. Gonzalez-Trujano ME, Pena EI, Martinez AL, Moreno J, Guevara-Fefer P, et al. (2007) Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol* 111: 476-482.
16. Takaki I, Bersani-Amado LE, Vendruscolo A, Sartoretto SM, Diniz SP, et al. (2008) Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. *J Med Food* 11: 741-746.
17. Park SE, Kim S, Sapkota K, Kim SJ (2010) Neuroprotective effect of *Rosmarinus officinalis* extract on human dopaminergic cell line, SH-SY5Y. *Cell Mol Neurobiol* 30: 759-767.
18. Ozarowski M, Mikolajczak PL, Bogacz A, Gryszczynska A, Kujawska M, et al. (2013) *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia* 91: 261-271.
19. Rocha J, Eduardo-Figueira M, Barateiro A, Fernandes A, Brites D, et al. (2014) Anti-inflammatory Effect of Rosmarinic Acid and an Extract of *Rosmarinus officinalis* in Rat Models of Local and Systemic Inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*.
20. Gamaro GD, Suyenaga E, Borsoi M, Lermen J, Pereira P, et al. (2011) Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *ISRN Pharmacol* 2011: 451682.

21. Jin X, Liu P, Yang F, Zhang YH, Miao D (2013) Rosmarinic acid ameliorates depressive-like behaviors in a rat model of CUS and Up-regulates BDNF levels in the hippocampus and hippocampal-derived astrocytes. *Neurochem Res* 38: 1828-1837.
22. Huang L, Abuhamdah S, Howes MJ, Dixon CL, Elliot MS, et al. (2008) Pharmacological profile of essential oils derived from *Lavandula angustifolia* and *Melissa officinalis* with anti-agitation properties: focus on ligand-gated channels. *J Pharm Pharmacol* 60: 1515-1522.
23. Chioca LR, Ferro MM, Baretta IP, Oliveira SM, Silva CR, et al. (2013) Anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice: participation of serotonergic but not GABAA/benzodiazepine neurotransmission. *J Ethnopharmacol* 147: 412-418.
24. Perez-Reyes E (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83: 117-161.
25. Llinas RR, Steriade M (2006) Bursting of thalamic neurons and states of vigilance. *J Neurophysiol* 95: 3297-3308.
26. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57: 411-425.
27. Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, Daud A, Perez-Reyes E, et al. (1999) Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* 19: 1895-1911.
28. Anderson MP, Mochizuki T, Xie J, Fischler W, Manger JP, et al. (2005) Thalamic Cav3.1 T-type Ca<sup>2+</sup> channel plays a crucial role in stabilizing sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1743-1748.
29. Chemin J, Monteil A, Briquaire C, Richard S, Perez-Reyes E, et al. (2000) Overexpression of T-type calcium channels in HEK-293 cells increases intracellular calcium without affecting cellular proliferation. *FEBS Lett* 478: 166-172.
30. Chemin J, Nargeot J, Lory P (2002) Neuronal T-type alpha 1H calcium channels induce neuritegenesis and expression of high-voltage-activated calcium channels in the NG108-15 cell line. *J Neurosci* 22: 6856-6862.
31. Cain SM, Snutch TP (2013) T-type calcium channels in burst-firing, network synchrony, and epilepsy. *Biochim Biophys Acta* 1828: 1572-1578.

32. Bourinet E, Alloui A, Monteil A, Barrere C, Couette B, et al. (2005) Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *EMBO J* 24: 315-324.
33. Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V (2011) T-type voltage-gated calcium channels as targets for the development of novel pain therapies. *Br J Pharmacol* 163: 484-495.
34. Chemin J, Monteil A, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P (2001) Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J* 20: 7033-7040.
35. Barbara G, Alloui A, Nargeot J, Lory P, Eschalier A, et al. (2009) T-type calcium channel inhibition underlies the analgesic effects of the endogenous lipoamino acids. *J Neurosci* 29: 13106-13114.
36. Cazade M, Nuss CE, Bidaud I, Renger JJ, Uebele VN, et al. (2014) Cross-modulation and molecular interaction at the Cav3.3 protein between the endogenous lipids and the T-type calcium channel antagonist TTA-A2. *Mol Pharmacol* 85: 218-225.
37. Chuang RS, Jaffe H, Cribbs L, Perez-Reyes E, Swartz KJ (1998) Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat Neurosci* 1: 668-674.
38. Seo H, Li HY, Perez-Reyes E, Lee JH (2013) Effects of eugenol on T-type Ca<sup>2+</sup> channel isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* 347: 310-317.
39. Ross HR, Napier I, Connor M (2008) Inhibition of recombinant human T-type calcium channels by Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *J Biol Chem* 283: 16124-16134.
40. Enyeart JA, Liu H, Enyeart JJ (2009) Curcumin inhibits ACTH- and angiotensin II-stimulated cortisol secretion and Ca(v)3.2 current. *J Nat Prod* 72: 1533-1537.
41. Traboulsie A, Chemin J, Kupfer E, Nargeot J, Lory P (2006) T-type calcium channels are inhibited by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Mol Pharmacol* 69: 1963-1968.
42. Martin RL, Lee JH, Cribbs LL, Perez-Reyes E, Hanck DA (2000) Mibefradil block of cloned T-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 302-308.
43. Ertel EA, Cohen CJ (1994) Voltage-dependent interactions: The influence and significance of membrane potential on drug-receptor interactions. *Drug Development Research* 33: 203-213.
44. Narusuye K, Kawai F, Matsuzaki K, Miyachi E (2005) Linalool suppresses voltage-gated currents in sensory neurons and cerebellar Purkinje cells. *J Neural Transm* 112: 193-203.

45. Elisabetsky E, Brum LF, Souza DO (1999) Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine* 6: 107-113.
46. Re L, Barocci S, Sonnino S, Mencarelli A, Vivani C, et al. (2000) Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharmacol Res* 42: 177-182.
47. Linck VM, da Silva AL, Figueiro M, Caramao EB, Moreno PR, et al. (2010) Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine* 17: 679-683.
48. Linck VM, da Silva AL, Figueiro M, Piato AL, Herrmann AP, et al. (2009) Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine* 16: 303-307.
49. Fallarini S, Miglio G, Paoletti T, Minassi A, Amoruso A, et al. (2009) Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death. *Br J Pharmacol* 157: 1072-1084.
50. Kimura Y, Okuda H, Okuda T, Hatano T, Arichi S (1987) Studies on the activities of tannins and related compounds, X. Effects of caffeetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes. *J Nat Prod* 50: 392-399.
51. Kelm MA, Nair MG, Strasburg GM, DeWitt DL (2000) Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine* 7: 7-13.
52. Sahu A, Rawal N, Pangburn MK (1999) Inhibition of complement by covalent attachment of rosmarinic acid to activated C3b. *Biochem Pharmacol* 57: 1439-1446.
53. Won J, Hur YG, Hur EM, Park SH, Kang MA, et al. (2003) Rosmarinic acid inhibits TCR-induced T cell activation and proliferation in an Lck-dependent manner. *Eur J Immunol* 33: 870-879.
54. Huguenard JR (1996) Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu Rev Physiol* 58: 329-348.
55. Hondeghem LM, Katzung BG (1984) Antiarrhythmic agents: the modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channel-blocking drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 24: 387-423.
56. Hering S, Aczel S, Kraus RL, Berjukow S, Striessnig J, et al. (1997) Molecular mechanism of use-dependent calcium channel block by phenylalkylamines: role of inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13323-13328.

57. Powell KL, Cain SM, Snutch TP, O'Brien TJ (2014) Low threshold T-type calcium channels as targets for novel epilepsy treatments. *Br J Clin Pharmacol* 77: 729-739.
58. Bourinet E, Zamponi GW (2005) Voltage gated calcium channels as targets for analgesics. *Curr Top Med Chem* 5: 539-546.
59. Tsakiridou E, Bertollini L, de Curtis M, Avanzini G, Pape HC (1995) Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *J Neurosci* 15: 3110-3117.
60. Lory P, Chemin J (2007) Towards the discovery of novel T-type calcium channel blockers. *Expert Opin Ther Targets* 11: 717-722.
61. Gomora JC, Murbartian J, Arias JM, Lee JH, Perez-Reyes E (2002) Cloning and expression of the human T-type channel Ca(v)3.3: insights into prepulse facilitation. *Biophys J* 83: 229-241.
62. Tringham E, Powell KL, Cain SM, Kuplast K, Mezeyova J, et al. (2012) T-type calcium channel blockers that attenuate thalamic burst firing and suppress absence seizures. *Sci Transl Med* 4: 121ra119.
63. Llinas RR, Ribary U, Jeanmonod D, Kronberg E, Mitra PP (1999) Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 15222-15227.
64. Berger ND, Gadotti VM, Petrov RR, Chapman K, Diaz P, et al. (2014) NMP-7 inhibits chronic inflammatory and neuropathic pain via block of Cav3.2 T-type calcium channels and activation of CB2 receptors. *Mol Pain* 10: 77.
65. Jagodic MM, Pathirathna S, Joksovic PM, Lee W, Nelson MT, et al. (2008) Upregulation of the T-type calcium current in small rat sensory neurons after chronic constrictive injury of the sciatic nerve. *J Neurophysiol* 99: 3151-3156.
66. Huang L, Keyser BM, Tagmose TM, Hansen JB, Taylor JT, et al. (2004) NNC 55-0396 [(1S,2S)-2-(2-(N-[(3-benzimidazol-2-yl)propyl]-N-methylamino)ethyl)-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl cyclopropanecarboxylate dihydrochloride]: a new selective inhibitor of T-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 193-199.
67. Shen FY, Chen ZY, Zhong W, Ma LQ, Chen C, et al. (2015) Alleviation of neuropathic pain by regulating T-type calcium channels in rat anterior cingulate cortex. *Mol Pain* 11: 7.

68. Jarvis MF, Scott VE, McGaraughty S, Chu KL, Xu J, et al. (2014) A peripherally acting, selective T-type calcium channel blocker, ABT-639, effectively reduces nociceptive and neuropathic pain in rats. *Biochem Pharmacol* 89: 536-544.
69. Ziegler D, Duan WR, An G, Thomas JW, Nothaft W (2015) A randomized double-blind, placebo- and active-controlled study of T-type calcium channel blocker ABT-639 in diabetic patients with peripheral neuropathic pain. *Pain*.
70. Serra J, Duan WR, Locke C, Sola R, Liu W, et al. (2015) Effects of a T-type calcium channel blocker, ABT-639, on spontaneous activity in C-nociceptors in patients with painful diabetic neuropathy: a randomized controlled trial. *Pain*.
71. Lee M (2014) Z944: a first in class T-type calcium channel modulator for the treatment of pain. *J Peripher Nerv Syst* 19 Suppl 2: S11-12.
72. Bialer M, Johannessen SI, Levy RH, Perucca E, Tomson T, et al. (2015) Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Twelfth Eilat Conference (EILAT XII). *Epilepsy Res* 111: 85-141.
73. Hill TD, Cascio MG, Romano B, Duncan M, Pertwee RG, et al. (2013) Cannabidiol-rich cannabis extracts are anticonvulsant in mouse and rat via a CB1 receptor-independent mechanism. *Br J Pharmacol* 170: 679-692.
74. Hosking RD, Zajicek JP (2008) Therapeutic potential of cannabis in pain medicine. *Br J Anaesth* 101: 59-68.

## Figure legends

### Fig 1

**Modulation of Cav3.2 channels by medicinal plant methanolic extracts.** Whole-cell patch clamp recordings of T-type calcium current were obtained on HEK-293 cells stably expressing recombinant human Cav3.2 channels. Currents were elicited by stepping from a holding potential (HP) of -80 mV to a test pulse (TP) of -30 mV applied every 10 seconds. Effect of the methanolic extracts (30 µg/ml) of the medicinal plants *Lavandula stoechas* (A-B), *Rosmarinus officinalis* (C-D), *Ricinus cummunis* (E-F), or *Citrullus colocynthis* (G-H) are illustrated with representative current traces collected before (open triangle) and during bath

application (filled triangle) of the extracts (left panels). The corresponding time plots (right panels) illustrate the time-course of the inhibitory effect and washout of the extracts. Each extract panel is representative of 6 to 7 experiments.

## Fig 2

**Inhibition of Cav3.2 channel by *Lavandula* essential oils and Linalool.** Dose-response curves of the inhibitory effect of *Lavandula stoechas* (LS) (A) *Lavandula angustifolia* Miller (LA) (*officinalis*) (B) and Linalool (C) on Cav3.2 current. Inhibition of Cav3.2 channel currents was obtained by serial increase in concentrations of *Lavandula sp.* extracts. Percentages of inhibition were averaged and plotted against compound concentrations (right panels; n=7-8). Each point represents the mean  $\pm$  SEM.

## Fig 3

***Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia* and Linalool do not affect activation of Cav3.2 channels.** Representative current traces of the current-voltage (*I-V*) relationship (A) before and after the application of 30  $\mu$ g/ml *Lavandula stoechas* on Cav3.2 channel (HP -80 mV) and stepped to serial depolarizing TP ranging from -80 to +50 mV. (B) *I-V* relationship of Cav3.2 channels before and after 30  $\mu$ g/ml *Lavandula stoechas* (LS). Note that the *I-V* curve in the presence of LS is normalized to the control *I-V* curve (dotted line) for a better comparison. (C-D) Analysis of activation and inactivation kinetics after treatment with LS showed small shifts that were not statistically significant between control and LS-treated recordings. (E) Representative *I-V* relationship of Cav3.2 channels before and after 50  $\mu$ g/ml *Lavandula angustifolia* Miller. (F) Representative *I-V* relationship of Cav3.2 channels before and after 100  $\mu$ M Linalool. For a better comparison, the *I-V* relationships in the presence of the compounds are normalized (panels E and F, dotted curves). Data represents the mean  $\pm$  SEM, n=6.

## Fig 4

***Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia* Miller and Linalool effects on steady-state inactivation of Cav3.2 channels.** To measure steady-state inactivation (at TP -30 mV), cells were voltage-clamped for 5 seconds at potentials between -110 and -40 mV (10 mV

increments). (A) Representative traces before and after treatment with 30  $\mu\text{g/ml}$  *Lavandula stoechas* essential oil (LS EO). (B) Steady-state inactivation before and after 30  $\mu\text{g/ml}$  *Lavandula stoechas* essential oil (LS EO). (C) Steady-state inactivation before and after 50  $\mu\text{g/ml}$  *Lavandula angustifolia* Miller essential oil (LA EO). (D) Steady-state inactivation before and after 100  $\mu\text{M}$  Linalool. Normalized steady-state inactivation curve in the presence of the compounds are represented by dotted curves in panels B and D. Data represents the mean  $\pm$  SEM (n=5-6).

### Fig 5

**Cav3.2 channel inhibition by *Rosmarinus officinalis* essential oil.** Dose-response curves for *Rosmarinus officinalis* essential oil (RO EO) (A-B). and Rosmarinic acid (C-D). Representative current traces before and after application of serial concentrations of RO EO are superimposed, as shown on the left panels of each concentration-response curve. Each point represents the mean  $\pm$  SEM. n=6.

### Fig 6

***Rosmarinus officinalis* and Rosmarinic acid affect steady-state inactivation but not activation of Cav3.2 channels.** (A) Representative *I-V* relationship of Cav3.2 channels before and after treatment with 50  $\mu\text{g/ml}$  *Rosmarinus officinalis*. (B) Representative curve of the steady-state inactivation before and after 50  $\mu\text{g/ml}$  *Rosmarinus officinalis*. (C) Representative *I-V* relationship of Cav3.2 channels before and after 50  $\mu\text{M}$  Rosmarinic acid. (D) The steady-state inactivation before and after 50  $\mu\text{M}$  Rosmarinic acid. Normalized *I-V* and steady state inactivation curves in the presence of RO and RA are represented by dotted curves in the four panels. Data represents the mean  $\pm$  SEM (n=6-7).

### Fig 7

**Efficacy of Cav3.2 inhibition by *Lavandula stoechas* and *Rosmarinus officinalis* is dependent of the resting membrane potential.** Inhibition and washout of Cav3.2 channels by 20  $\mu\text{g/ml}$  *Lavandula stoechas*, or 20  $\mu\text{g/ml}$  *Rosmarinus officinalis* was examined for HPs of -100 mV and -80 mV. Each bar represents the average of five to six similar experiments. Data represent the mean  $\pm$  SEM.

Fig 1  
Click here to download Figure: Fig 1.pdf

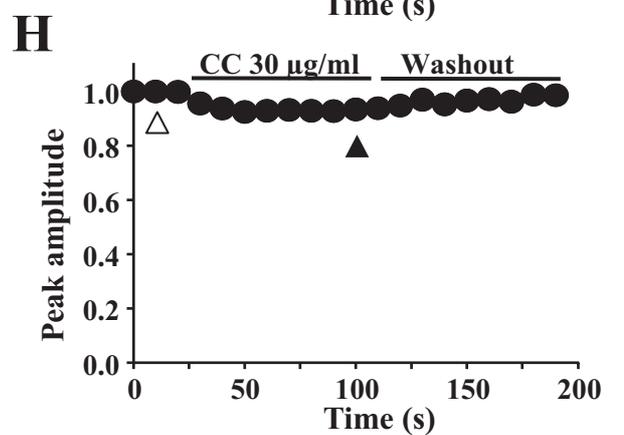
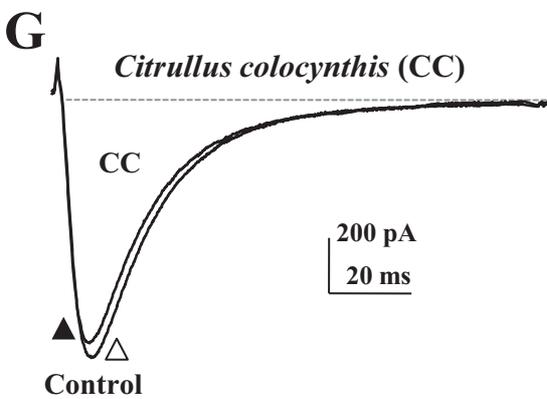
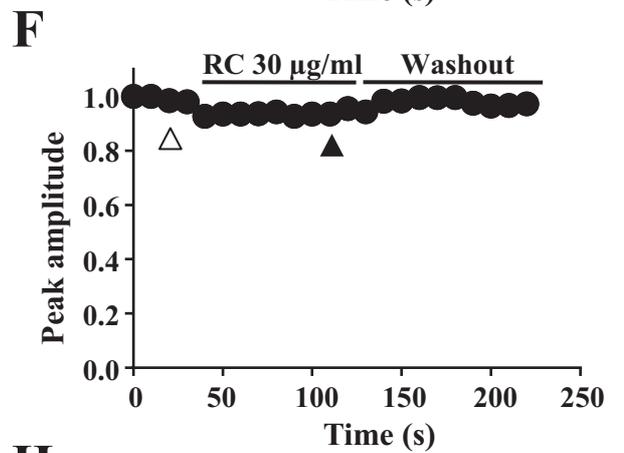
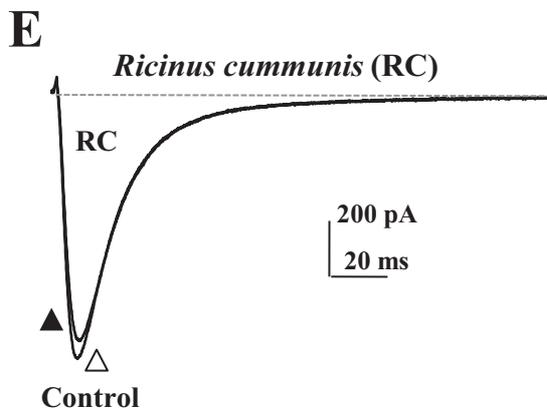
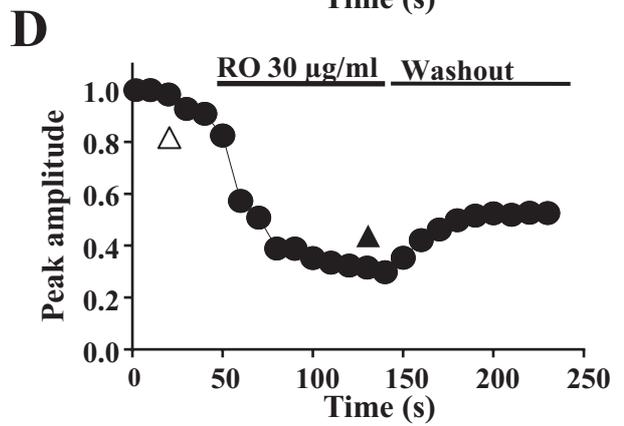
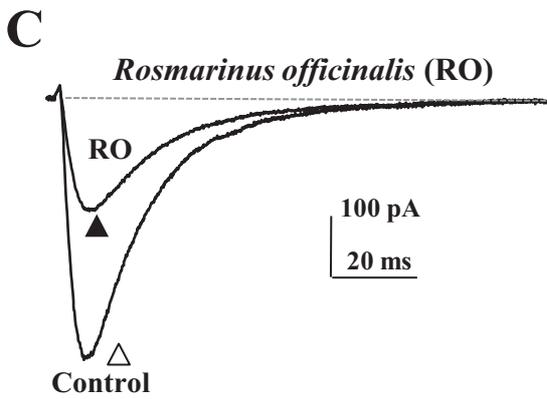
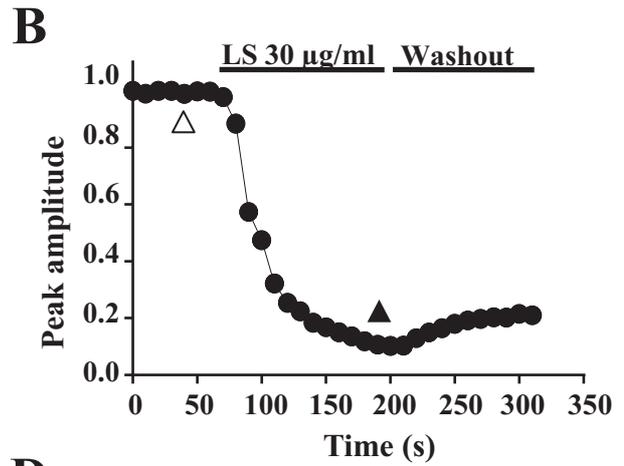
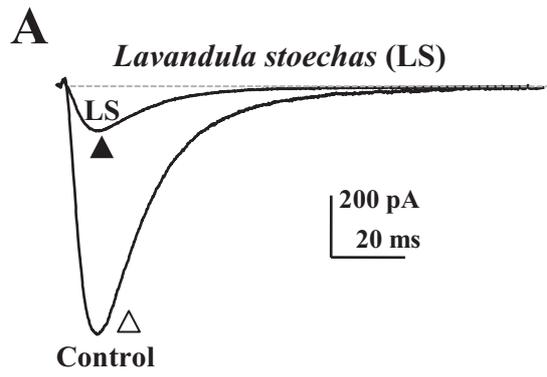


Fig 2  
Click here to download Figure: Fig 2.pdf

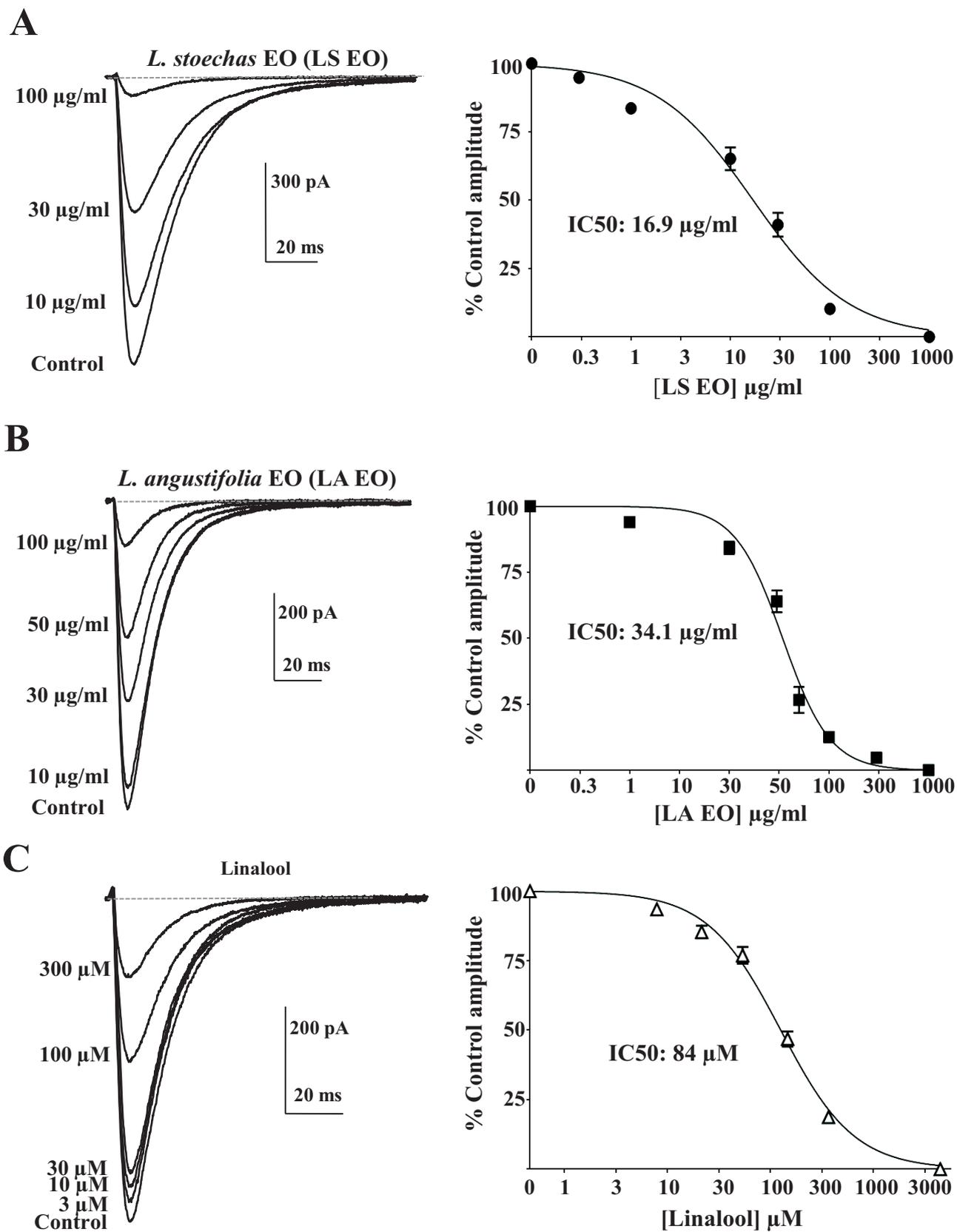


Fig 3  
[Click here to download Figure: Fig 3.pdf](#)

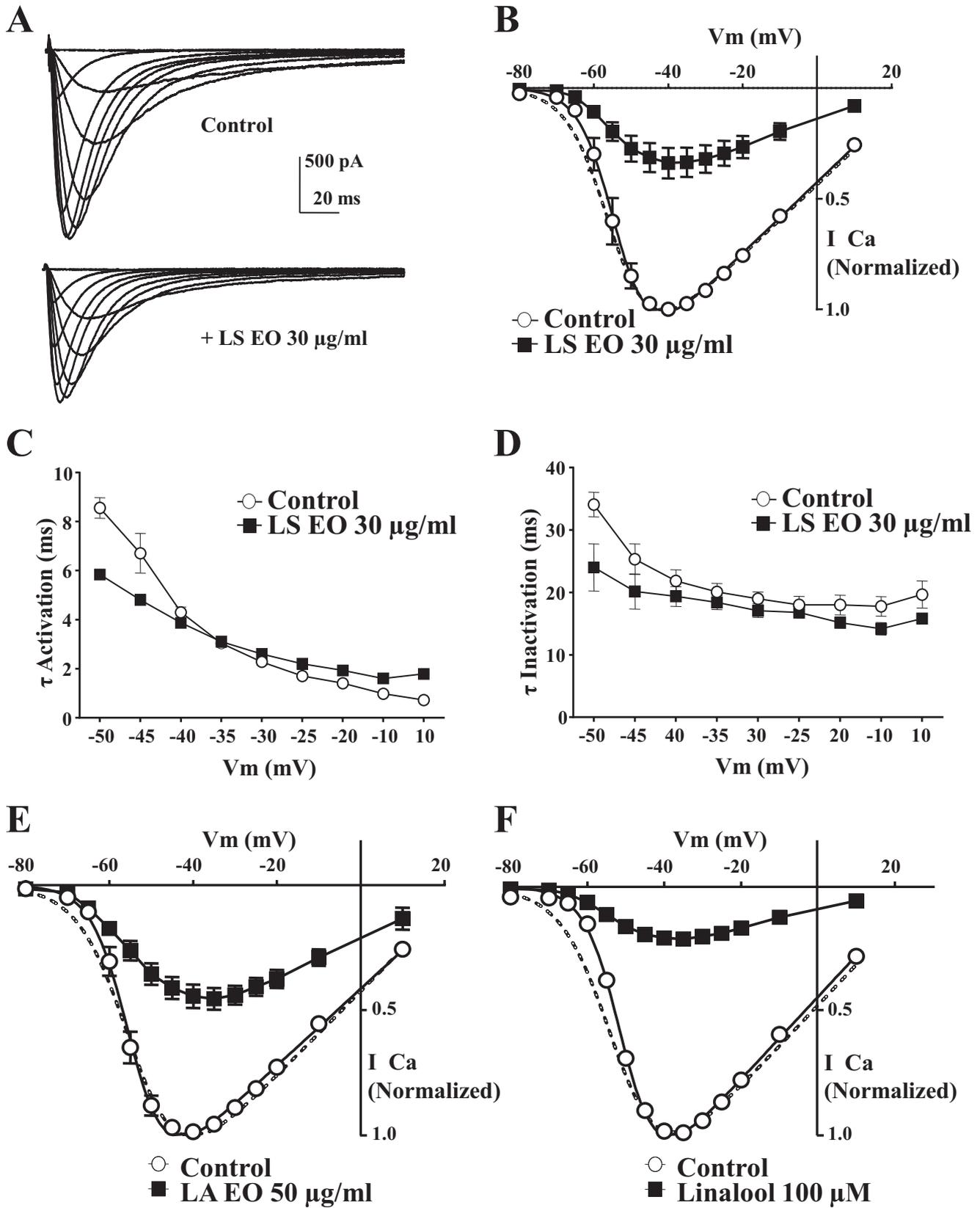


Fig 4  
Click here to download Figure: Fig 4.pdf

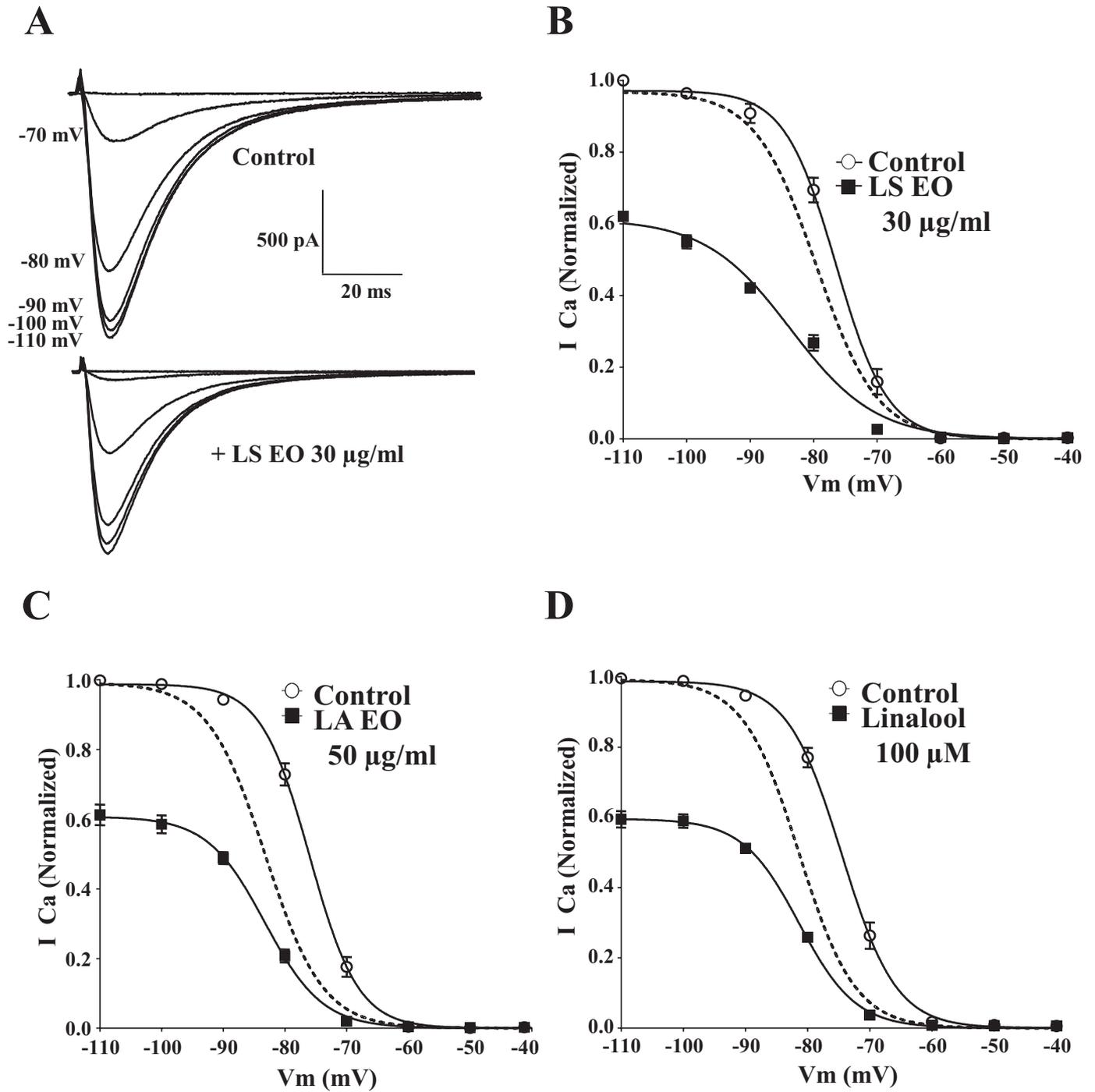


Fig 5  
Click here to download Figure: Fig 5.pdf

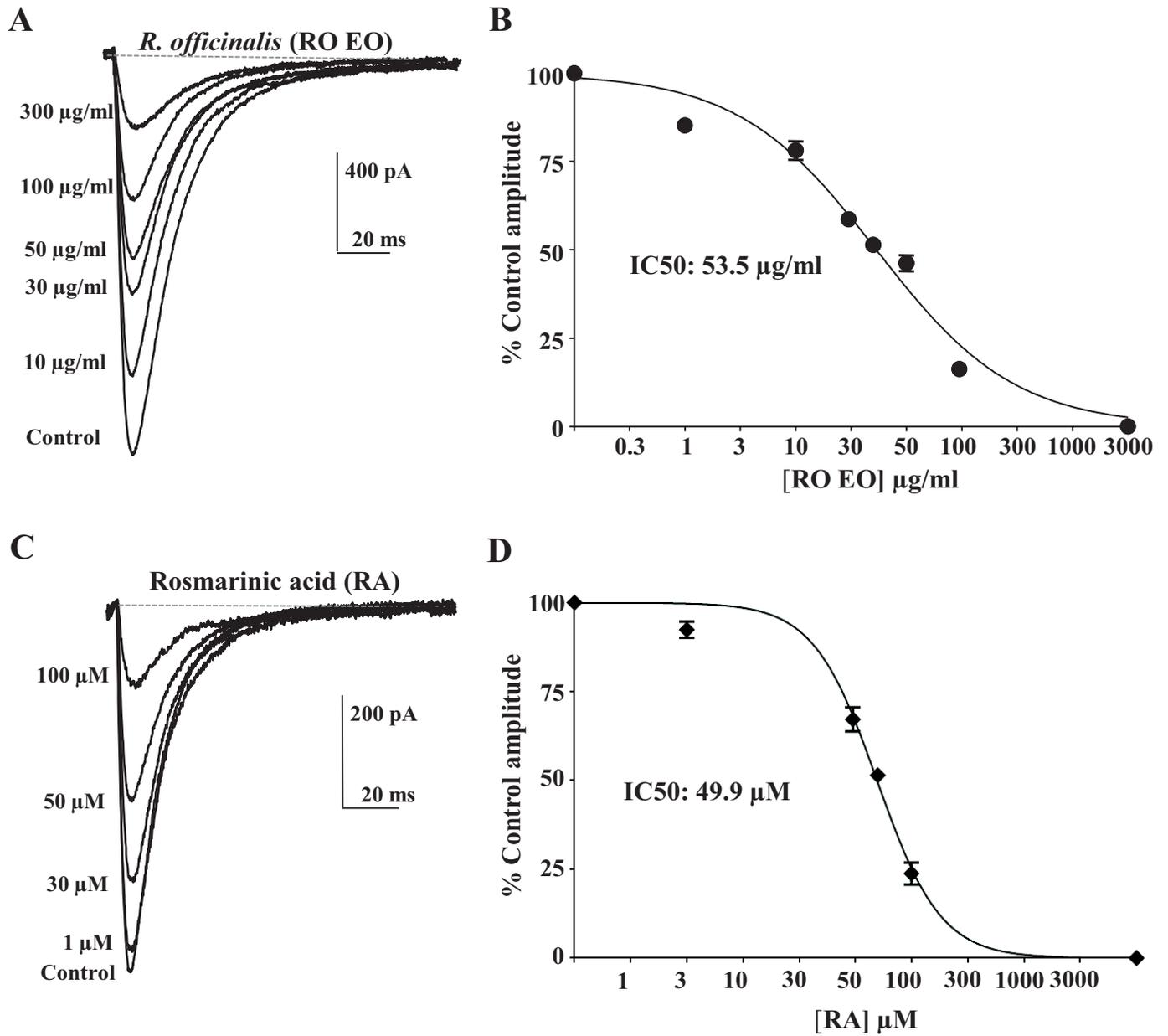


Fig 6  
Click here to download Figure: Fig 6.pdf

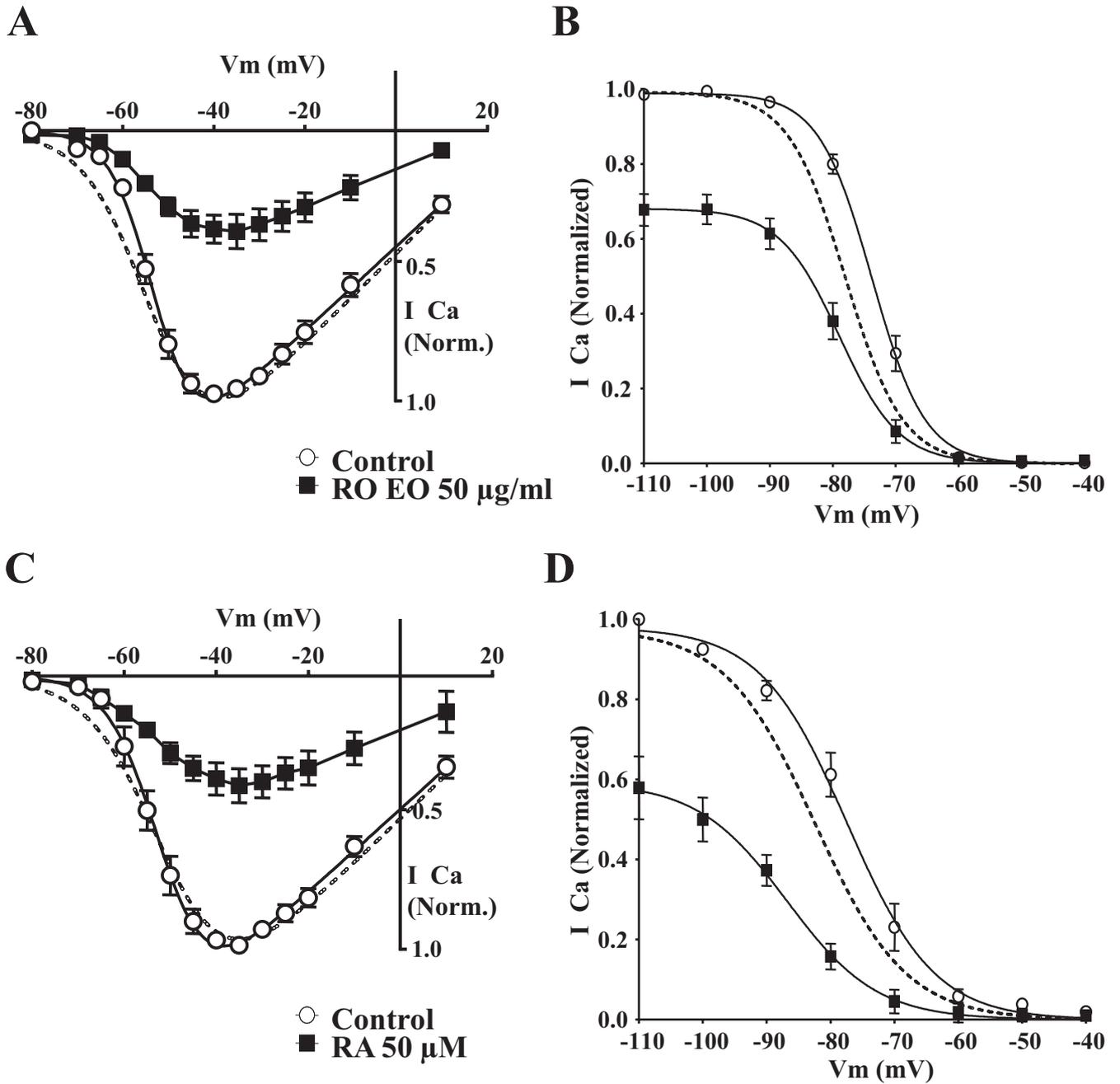
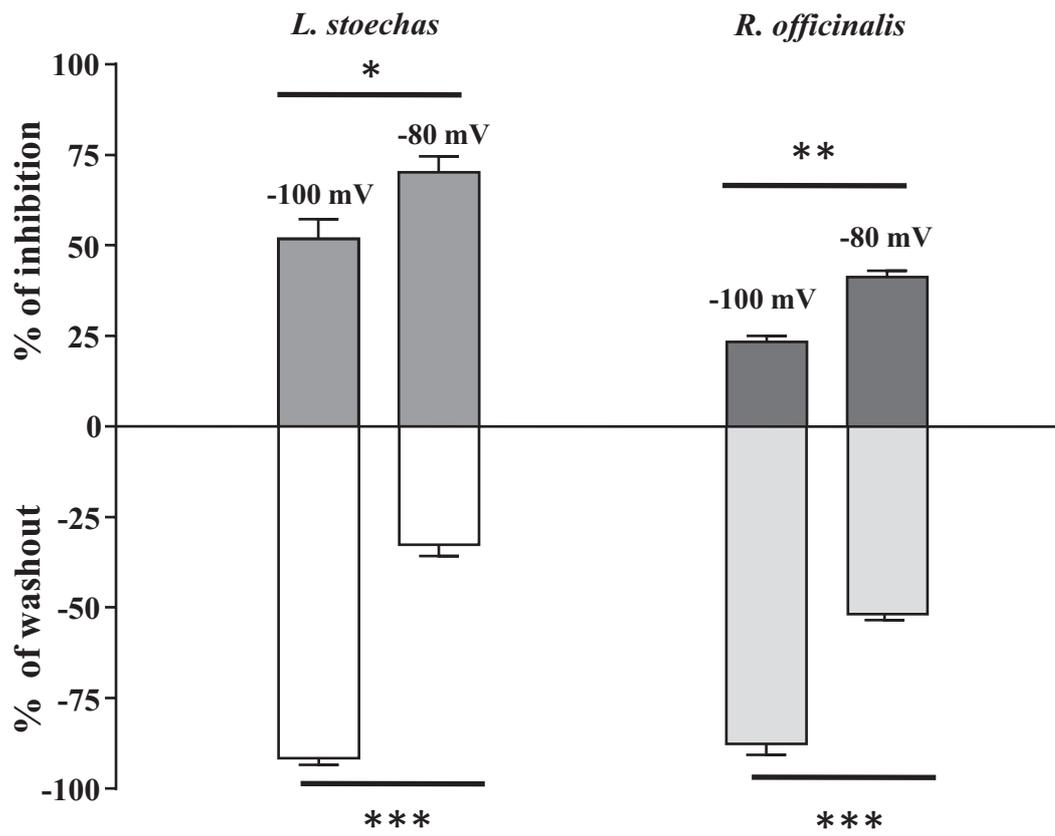


Fig 7  
Click here to download Figure: Fig 7.pdf



# **Annexe II**

# T-type calcium channels are inhibited by *Peganum harmala* and its $\beta$ -carboline alkaloid harmaline

Chaymae El Alaoui<sup>1,2</sup>, Jean Chemin<sup>1</sup>, Taoufiq Fechtali<sup>2</sup>, Philippe Lory<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département de Physiologie, Institut de Génétique Fonctionnelle, CNRS UMR 5203, INSERM U661, Université de Montpellier, 34094 Montpellier, France. <sup>2</sup>Laboratoire de Neurosciences, Physiopathologies Intégrées et Substances Naturelles, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan II, Casablanca, Maroc.

*Corresponding author: Philippe.Lory@igf.cnrs.fr*

## Abstract

*Peganum harmala*, known as harmal, is a Mediterranean plant that has been used for centuries for therapeutical purposes. A growing body of reports has shown various pharmacological effects of *Peganum harmala* that are comprised between cytotoxic and neuroprotective properties. The aim of this study was to examine the effects of *Peganum harmala* and its purified natural compound Harmaline, on the modulation of T-type calcium channels, Cav3.1 ( $\alpha_{1G}$ ), Cav3.2 ( $\alpha_{1H}$ ) and Cav3.3 ( $\alpha_{1I}$ ), which are a subfamily of voltage gated calcium channels that appears to mediate important contributions to sensory processes, pacemaker activity, and neuronal excitability. Electrophysiological recordings on HEK293 show that *Peganum harmala* and harmaline reduced significantly T-type channels currents over the voltage range tested. Both *P. harmala* extract and harmaline shifted steady-state inactivation toward more negative membrane potentials and did significantly accelerate inactivation kinetics of T channels. Taken together, our findings suggest that T channels could be involved in the mechanisms underlying the antidepressant and neuroprotective properties of harmala alkaloids.

**Keywords** T-type calcium channels, whole-cell, Patch-clamp, *Peganum harmala*, harmaline, HEK293, kinetics, steady-state inactivation.

## Introduction

The idea of using medicinal plants as therapeutic remedies has expanded as an alternative for the treatment of many diseases. Since they are capable of producing a vast array of secondary metabolites as a self-defense mechanism against stressful and threatening conditions or in their normal growth and development, plants offer a unique and interesting renewable source for the discovery of potential new drugs. Therefore, a vast array of medicinal plants and their purified compounds have been evaluated extensively for the treatment of a multitude of disorders.

*Peganum harmala*, commonly known as Harmal, is one of the most known medicinal plants used in folk medicine. Native to North Africa, the Mediterranean region, the middle east and

Asia, *P. harmala* has been traditionally used as a healing agent for cardiovascular (Eddouks *et al.*, 2002; Tahraoui *et al.*, 2007; Leporatti *et al.*, 2009), gastrointestinal (Pieroni *et al.*, 2005; Farouk *et al.*, 2008) and nervous problems (Abu-Irmaileh *et al.*, 2003; Leporatti *et al.*, 2009).

The pharmacological active principles of *P. harmala* are the  $\beta$ -carbolines harmaline, harmine and harmalol which are mainly present in the seeds and the roots of *Peganum harmala* as shown by Herraiz and collaborators (Herraiz *et al.*, 2010; Handforth, 2012). Endogenously distributed in different mammalian tissues (Airaksinen *et al.*, 1981),  $\beta$ -carbolines have been implicated neurodegenerative disorders but also in neuroprotective processes by interacting with a multitude of neurotransmitter receptors and ion exchangers. They bind GABA<sub>A</sub> receptors (Rommelspacher *et al.*, 1980), activate 5HT<sub>2A</sub> et 5HT<sub>2C</sub> receptors (McCormick *et al.*, 1998), induce the impairment of Na<sup>+</sup> proton exchange and mitochondrial monoamine oxidase enzymes (MAO) (Glennon *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2003; Grella *et al.*, 2003; Herraiz *et al.*, 2010) and modulate voltage sensitive channels including HVA and LVA calcium channels. (Spletstoeser *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2010; Zhan *et al.*, 2012). Despite this vast array of effects of *P. harmala* and its alkaloids, little is known about their effect on calcium channels and especially Low voltage gated calcium channels.

LVA also known as T-type calcium channels (TTTC) are a subgroup of voltage gated calcium channels (VGCCs) specifically activated by small membrane depolarization (Perez-Reyes, 2003). Molecular cloning studies have identified three genes encoding TTTC isoforms: Cav3.1 ( $\alpha_{1G}$ ), Cav3.2 ( $\alpha_{1H}$ ) and Cav3.3 ( $\alpha_{1I}$ ) (Perez-Reyes, 2003; Catterall *et al.*, 2005). TTTC are involved in various physiological activities including proliferation (Chemin *et al.*, 2000) and sleep (Anderson *et al.*, 2005) as well as physiopathological processes like pain (Bourinet *et al.*, 2005) and epilepsy (Cain *et al.*, 2013). Therefore, T-type calcium channels represent an interesting molecular target for therapy. Different substances have been shown to interact with TTTC like bioactive lipids and lipoaminoacids (Chemin *et al.*, 2001; Barbara *et al.*, 2009; Cazade *et al.*, 2014), Toxins (Chuang *et al.*, 1998) and natural products including the genera Cannabis, Curcuma and Syzium (Ross *et al.*, 2008; Enyeart *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2013). In the present study, have studied for the first time the effect of the whole extract of *P. harmala* and its alkaloid harmaline on the three isoforms Cav3.1, Cav3.2, and Cav3.3 expressed in HEK-293 cells which provide an excellent experimental system to study in details the pharmacology and the physiological properties of TTTC. Thanks to our results, we hope to contribute to a better understanding of mechanisms underlying the therapeutic action of *P. harmala*.

## Materials and Methods

### *Plant material*

*Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) plants were collected in Agadir, Morocco. The botanical identity of the plant was determined and authenticated by taxonomist from the National Institute of Agronomic Research (INRA), Agadir, Morocco. Fresh plant materials were dried at 40°C during 48 to 96 hours, then homogenized to fine powder by grinding and sieving until the stabilization of weight. 20 g of dried plant material was extracted with 200 ml of pure methanol and kept on a rotary shaker for maceration for a total duration of 72h. Thereafter, the extract was filtered and evaporated to dryness in Rotavapor<sup>®</sup> vacuum (60 rpm

at 40°C). The final extract was stored at 4°C for further studies. Harmaline was purchased from Sigma-Aldrich.

### ***Cell culture and transfection protocols***

tsA-201 cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with GlutaMax and 10 % fetal bovine serum (Invitrogen). tsA-201 cells transfection was performed using jet-PEI (QBiogen) with a DNA mix containing 0.5 % of a GFP encoding plasmid and 99.5 % of either the plasmid constructs coding for human Cav3.1 (Cribbs *et al.*, 1998; Perez-Reyes *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Perez-Reyes *et al.*, 1999; Monteil *et al.*, 2000a; Monteil *et al.*, 2000b), Cav3.2 (Cribbs *et al.*, 1998; Perez-Reyes *et al.*, 1999), and Cav3.3 (Gomora *et al.*, 2002) channel isoforms. Two days after transfection, tsA-201 cells were dissociated with Versene (Invitrogen) and plated at a density of  $\sim 35 \times 10^3$  cells per 35 mm Petri dish for electrophysiological recordings performed the following day.

### ***Electrophysiological recordings***

Whole-cell calcium currents were recorded at room temperature using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices). For recording macroscopic TTTC, the extracellular solution contained the following (in mM): 135 NaCl, 20 TEACl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, and 10 HEPES (pH adjusted to 7.25 with KOH,  $\sim 330$  mOsm). Brosilicate glass pipettes have a typical resistance of 1.5-2.5 MOhm when filled with the internal solution containing the following (in mM): 140 CsCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 3 Mg-ATP, 0.6 GTPNa, and 3 CaCl<sub>2</sub> (pH adjusted to 7.25 with KOH  $\sim 315$  mOsm). Recordings were filtered at 2 kHz. Drugs were applied by a gravity-driven homemade perfusion device and control experiments were performed using the solvent alone. Recordings were fitted using a combined Boltzmann and linear Omic relationships, where  $I = G_{max} \times (V_m - V_{rev}) / (1 + \exp((V_m - V_{m0.5}) / slope\ factor))$ . Correspondingly, steady-state inactivation curves were fitted using the Boltzmann equation where  $I/I_{max} = 1 / (1 + \exp((V_m - V_{m0.5}) / slope\ factor))$ . Data were analyzed using the pCLAMP9 (Molecular devices), and GraphPad Prism (GraphPad) software. Results are presented as the mean  $\pm$  SEM, and n is the number of cells used.

## **Results**

### ***Peganum harmala* inhibition of Cloned Cav3 T-type calcium channel isoforms**

We first investigated whether *P. harmala* crude extract can modulate TTTC expressed in tsA-201 cells. For this purpose, we superfused cells expressing the three Cav<sub>3</sub> currents; Cav<sub>3.1</sub> (A), Cav<sub>3.2</sub> (B) and Cav<sub>3.3</sub> (C) with two concentrations of *P. harmala* methanolic extract (10 and 20  $\mu$ g/ml). Typical trace recordings of the three TTTC isoforms were elicited by stepping cells from -80 to -30 mV at a HP of -80 mV. We found that 20  $\mu$ g/ml of *P. harmala* strongly inhibits the three isoforms Cav<sub>3.1</sub>, Cav<sub>3.2</sub> and Cav<sub>3.3</sub> with inhibition values that were estimated to be  $88.15 \pm 2.39$ ,  $82.48 \pm 1.09$  and  $61.70 \pm 2.22\%$  respectively (Fig. 2. A-C, n=6). A representative time plot of the Cav<sub>3.2</sub> isoform (Fig. 2, D) illustrates the time-course of the inhibitory effect during *P. harmala* application and subsequent wash-out with control solution that did not completely reverse the methanolic extract during washing (Data not shown for Cav<sub>3.1</sub> and Cav<sub>3.3</sub>). In addition, comparison of the inhibitory effect of *P. harmala* on T

channels isoforms revealed that both Cav3.1 and Cav3.2 are more sensitive to the natural extract than Cav3.3 (E, n=6). Then, inhibition of T channel currents by *P. harmala* was examined for HPs of -100 and -80 mV (Fig. 2, F). The results show that the inhibition of Cav3.2 isoforms by 20 µg/ml *P. harmala* is significantly more important when cells were held at -80 mV ( $82.48 \pm 1.09$ , n=6) than -100 mV ( $65.86 \pm 7.56\%$ , n=6), suggesting that *P. harmala* alkaloids preferentially bind to the inactivated state of T type calcium channels.

#### **Effects of *P. harmala* on biophysical properties of T-type calcium channel currents.**

We next examined whether current inhibition by *P. harmala* involves modifications in biophysical properties of Cav3 channel currents (Fig. 3). Exposure to 20 µg/ml *P. harmala* extract slightly affected the voltage dependence of activation (*I-V* relationship curve) of TTTC (Fig. 3, A-B). The values for half-activation ( $V_{0.5}$ ) of Cav3.3 current were estimated to be  $-55.85 \pm 0.38$  mV in control condition and  $-56.11 \pm 0.35$  mV in the presence of 20 µg/ml of *P. harmala* extract (Fig. 3B). Similarly, no significant effects were obtained after the application of *P. harmala* extract on Cav3.1 and Cav3.2. The  $V_{0.5}$  values of the two isoforms are  $-48.40 \pm 0.65$  mV versus  $-49.8 \pm 0.95$  mV for Cav3.1 and  $-51.92 \pm 0.47$  mV versus  $52.11 \pm 0.46$  for Cav3.2. We further investigated the effect of *P. harmala* methanolic extract on T channels steady-state inactivation properties (Fig.3 C-D, n=6). We noticed that Cav3.3 current amplitude strongly depends on the resting membrane potential (Fig 3.C). Analysis of the steady-state inactivation properties of the Cav3.3 showed an important shift of ~10 mV toward more negative potentials after treatment with 20 µg/ml *P. harmala*. The potential for half-steady state inactivation ( $V_{0.5}$ ) of Cav3.3 current was  $-73.50 \pm 0.36$  mV versus  $-82.71 \pm 0.35$  mV in the presence of harmala extract (Fig.3 D, n=6). In contrast, 20 µg/ml of *P. harmala* did not affect the slope of factor of the steady-state inactivation for Cav3.3 which are estimated to be  $5.59 \pm 0.31$  and  $6.31 \pm 0.32$  mV in the absence and the presence of the extract, respectively (n=6). Similar results were obtained for Cav3.1 and Cav3.2 with negative shift of ~7 mV in  $V_{0.5}$  values for both isoforms. The values are of  $-73.89 \pm 0.33$  mV versus  $-79.90 \pm 0.51$  for Cav3.1 and  $-72.49 \pm 0.29$  versus  $-79.37 \pm 0.45$  mV for Cav3.2 (n=5). In agreement with Cav3.3 results, *P. harmala* extract did not affect the slope factor of the steady-state inactivation of Cav3.1 and Cav3.2. For Cav3.1, the slope values were  $4.83 \pm 0.28$  mV and  $4.90 \pm 0.47$  (n=5), and  $4.28 \pm 0.25$  and  $4.24 \pm 0.45$  for Cav3.2 (n=5), in the absence and the presence of *P. harmala* extract, respectively (Data not shown).

#### ***Peganum harmala* extract does affect T-type calcium channels inactivation kinetics**

Next, we examined whether *Peganum harmala* can affect Cav3 calcium channel kinetics. Currents are elicited by serial step pulses ranging from -80 to +50 mV from a holding potential of -80 mV and measured before and after treatment with 10 µg/ml *P. harmala*. We analyzed T-channel currents by fitting double exponentials to them corresponding to activation and inactivation kinetics. According to kinetics analysis, 10µg/ml of *P. harmala* showed significant accelerated inactivation kinetics, whereas activation kinetics were not affected (Fig.4 n=5).

#### **Harmaline inhibition of Cav3 T-type calcium channel isoforms**

We next examined the ability of Harmaline (see schematic structure of Harmaline in Figure 1) to modulate TTTC that were stably transfected in HEK239 cells. Whole-cell patch clamp recordings were performed by superfusing a single concentration of 50  $\mu$ M Harmaline on cells stepped from -80 to -30 mV. All T-type calcium channel currents were inhibited by Harmaline (Fig. 5, A-F). 50  $\mu$ M of Harmaline significantly inhibits the three isoforms Cav3.1, Cav3.2 and Cav3.3 with inhibition values estimated to be  $59.27 \pm 3.75$ ,  $62.24 \pm 2.09$  and  $36.23 \pm 1.57$  %, respectively (Fig. 5. A-E, n=5-8). A representative time plot of the Cav3 isoforms illustrates the time-course of the inhibitory effect before and after Harmaline treatment and subsequent wash-out with control solution that did not completely reverse the active principle during washing. In addition, comparison of the inhibitory effect of Harmaline on T-type channels isoforms revealed that both Cav3.1 and Cav3.2 are more sensitive to the natural molecule than Cav3.3 isoform.

#### ***Effects of Harmaline on Cav3 channel currents activation***

Cav3 calcium channels were affected by *P. harmala* and its natural alkaloid Harmaline over the voltage range tested. We investigated whether this current inhibition involves modification of Cav3 channel biophysical properties (Fig.6 A-D). Representative current traces of Cav3.2 channels before and after the application of 50  $\mu$ M of Harmaline are shown for comparison (Fig. 6, A). Analysis of the current-voltage-curves revealed a modest shift of  $\sim 3$ mV in half-activation ( $V_{0.5}$ ). Harmaline did not significantly shift the activation curve of Cav3.2 channels. The Values of  $V_{0.5}$  are of  $-51.65 \pm 0.56$  and  $-54.10 \pm 0.41$  mV for Cav3.1 (Fig.6, B, n=6),  $-52.38 \pm 0.31$  and  $-53.95 \pm 0.41$  mV for Cav3.2 (Fig.6, C, n=6) and  $-49.20 \pm 0.40$  and  $-51.13 \pm 0.76$  mV for Cav3.3 (Fig.6, D, n=8) in the absence and the presence of Harmaline, respectively.

#### ***Effects of Harmaline on Cav3 Steady-state Inactivation properties***

We thus examined whether Harmaline affected Steady-state inactivation properties of TTTC. Representative current traces of Cav3.1 channels before and after the application of 50  $\mu$ M of Harmaline are shown for comparison (Fig. 7, A). Smooth curves were obtained from fitting data to Boltzmann equation (see Materials and Methods). Treatment with 50  $\mu$ M harmaline negatively shifted the voltage-dependence of inactivation of the three isoforms (Fig. 7, B-D). The application of 50  $\mu$ M of Harmaline induced a negative shift of  $\sim 7$  mV. The negative shifting effect of both compounds almost disappeared after washing out the drug (Data not shown). The Values of  $V_{0.5inact}$  are of  $74.63 \pm 0.42$  and  $80.31 \pm 0.56$  mV for Cav3.1 (Fig.7, B, n=5),  $75.23 \pm 0.31$  and  $82.23 \pm 0.23$  mV for Cav3.2 (Fig.7, C, n=6), and  $74.63 \pm 0.25$  and  $79.92 \pm 0.41$  mV for Cav3.3 (Fig.7, D, n=8), in the absence and the presence of Harmaline, respectively. The negative shifting effect of channel availability by Harmaline suggests this molecule preferentially binds to inactivated states of TTTC, thus shifting the equilibrium away from states from which channels can open (Ertel *et al.*, 1994). To further examine whether Harmaline binds to the inactivated states of T-type calcium channels, we used a direct method by measuring current inhibition at various holding potentials (HPs). The inhibition of Cav3.2 currents by of Harmaline was examined by applying voltage protocols in which the holding potential was kept at -100 and -80 mV (Fig. 8). Our results show that inhibition by 50  $\mu$ M of Harmaline was significantly more important when cells were held at -80 mV ( $36.23 \pm 1.57$  %) than -100 mV ( $27.63 \pm 1.63$ %). Taken together, the results suggest that the drugs preferentially bind to the inactivated states of TTTC.

## Discussion

*Peganum harmala* L. (Harmal) is a Mediterranean medicinal plant that has been used since ancient times for a multitude of health issues (el Bahri *et al.*, 1991; Farouk *et al.*, 2008). Our results show that both the crude extract of *Peganum harmala* and its purified active alkaloid harmaline attenuated T-type calcium channels currents over a large voltage array and in a dose dependant manner. *P. harmala* methanolic extract reduced Cav3.1, Cav3.2 and Cav3.3 currents by  $88.15 \pm 2.39$ ,  $82.48 \pm 1.09$  and  $61.70 \pm 2.22\%$  respectively, after treatment with 20  $\mu\text{g/ml}$  of the extract. Similarly, 50  $\mu\text{M}$  of harmaline inhibited all T channel isoforms with values estimated to be  $59.27 \pm 3.75$  for Cav3.1,  $62.24 \pm 2.09$  for Cav3.2 and  $36.23 \pm 1.57\%$  for Cav3.3 for voltage step from -80 to -30 mV. This first part of our results shows that Cav3.1 and Cav3.2 are more sensitive to harmala molecules than Cav3.3 isoform. Time plot curves tracing the activity of both compounds reveal a partly reversible effect on T channels. The present findings show for the first time the effect of the whole extract on LVA currents and further confirm, thanks to a detailed study, some aspects of harmaline inhibition on the three T channels isoforms using a recombinant system to better evaluate the pharmacological effect of harmaline on T channel isoforms by avoiding indirect effects that could results from the non specific binding of harmaline on other ion channels (Spletstoesser *et al.*, 2005).

Harmaline concentrations used in the present study (10-50  $\mu\text{M}$ ) for voltage-clamp recordings are similar to those used by Park *et al.* but slightly smaller than what has been used for current clamp recordings by Spletstoesser *et al.* and Zhang *et al.* meaning that our results are comparable. Our findings are in agreement with those obtained with other in vitro and in vivo studies demonstrating an inhibition of LVA calcium currents by harmaline using recombinant Cav3.1 channels (Park *et al.*, 2010) or native T channels in rat dorsal root ganglion neurons (Spletstoesser *et al.*, 2005) and olivary neurons (Zhan *et al.*, 2012).

Inhibition of TTTC is highly dependent on their inactivation state. Analysis of biophysical properties of the three Cav3 isoforms showed harmal shifted steady-state inactivation curves of T-type channels towards more negative membrane potentials without having a statistically significant effect on the activation curves, suggesting that the block is more efficient at holding potentials at which T-channels are inactivated (Ertel *et al.*, 1994; Huguenard, 1996). Furthermore, we showed throughout our study that *P. harmala* and harmaline inhibition sensitivity for channels was significantly enhanced by a change of holding potential from -100 to -80 mV which could be related to an interesting mechanism by which harmal stabilizes Cav3 channels in the inactivated state to produce its neuroprotective effect.

*P. harmala* and harmaline have been studied for their cytotoxic and neuroprotective roles. The mechanisms underlying the neuroprotective effect of harmal are still unclear. The  $\beta$ -carboline harmaline have been shown to exert multiple pharmacological effects including Inhibition of MAO enzymes. Inhibitors of these mitochondrial enzymes are useful as antidepressants (MAO-A inhibitors) and neuroprotectants (MAO-B inhibitors)(Ben-Shlomo *et al.*, 2004; Herraiz *et al.*, 2005). Furthermore, attenuation of hydroxyl radical formation and thiol oxidation lead to inhibitory effects on dopamine-induced apoptosis in PC12 (Lee *et al.*, 2000). Further studies have suggested that reduction of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels by harmaline lead to a direct attenuation of neuron excitability leading to neuroprotective processes against neuronal apoptosis (Spletstoesser *et al.*, 2005).

T-type calcium channels are specifically activated by small membrane depolarization (Perez-Reyes, 2003). Blockade of T channels has been reported to be useful in a wide variety of neurological disorders such as neuropathic pain and epilepsy (Llinas *et al.*, 1999; Huguenard, 2002; Berger *et al.*, 2014). Therefore, inhibition of T channels by *P. harmala* and its alkaloids at small depolarisations will reduce action potentials thus reducing neurons firing activity witnessed in some nervous diseases like epilepsy.

To conclude, *P. harmala* and harmaline are able to reduce Cav3 calcium currents by binding preferentially to the inactivated state of the channels. Therefore, we suggest that all TTTC isoforms, expressed in different tissues, are molecular targets for harmal extracts and are likely to contribute to pharmacological changes and therapeutical effects owing to harmala components.

### **Acknowledgements**

The PhD student work was supported by Erasmus mundus Averroes and L'Oréal-UNESCO for women in science programs. Special thanks to Dr. Bouharroud R. for the Plant extraction part in INRA, Agadir.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Abu-Irmaileh BE, Afifi FU (2003). Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbs. *Journal of ethnopharmacology* **89**(2-3): 193-197.
- Airaksinen MM, Kari I (1981). Beta-Carbolines, Psychoactive Compounds in the Mammalian Body .1. Occurrence, Origin and Metabolism. *Med Biol* **59**(1): 21-34.
- Anderson MP, Mochizuki T, Xie J, Fischler W, Manger JP, Talley EM, *et al.* (2005). Thalamic Cav3.1 T-type Ca<sup>2+</sup> channel plays a crucial role in stabilizing sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(5): 1743-1748.
- Anderson NJ, Robinson ES, Husbands SM, Delagrangé P, Nutt DJ, Hudson AL (2003). Characterization of [(3)H]harmaline binding to rat whole brain membranes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1009**: 175-179.
- Barbara G, Alloui A, Nargeot J, Lory P, Eschalier A, Bourinet E, *et al.* (2009). T-type calcium channel inhibition underlies the analgesic effects of the endogenous lipoamino acids. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**(42): 13106-13114.
- Ben-Shlomo Y, Bhatia K (2004). Using monoamine oxidase type B inhibitors in Parkinson's disease. *Bmj* **329**(7466): 581-582.
- Berger ND, Gadotti VM, Petrov RR, Chapman K, Diaz P, Zamponi GW (2014). NMP-7 inhibits chronic inflammatory and neuropathic pain via block of Cav3.2 T-type calcium channels and activation of CB2 receptors. *Molecular pain* **10**: 77.
- Bourinet E, Alloui A, Monteil A, Barrère C, Couette B, Poirot O, *et al.* (2005). Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *The EMBO journal* **24**(2): 315-324.
- Cain SM, Snutch TP (2013). T-type calcium channels in burst-firing, network synchrony, and epilepsy. *Biochimica et biophysica acta* **1828**(7): 1572-1578.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews* **57**(4): 411-425.
- Cazade M, Nuss CE, Bidaud I, Renger JJ, Uebele VN, Lory P, *et al.* (2014). Cross-modulation and molecular interaction at the Cav3.3 protein between the endogenous lipids and the T-type calcium channel antagonist TTA-A2. *Molecular pharmacology* **85**(2): 218-225.
- Chemin J, Monteil A, Briquaire C, Richard S, Perez-Reyes E, Nargeot J, *et al.* (2000). Overexpression of T-type calcium channels in HEK-293 cells increases intracellular calcium without affecting cellular proliferation. *FEBS letters* **478**(1-2): 166-172.

Chemin J, Monteil A, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P (2001). Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *The EMBO journal* **20**(24): 7033-7040.

Chuang RS, Jaffe H, Cribbs L, Perez-Reyes E, Swartz KJ (1998). Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nature neuroscience* **1**(8): 668-674.

Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, *et al.* (1998). Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family. *Circulation research* **83**(1): 103-109.

Eddouks M, Maghrani M, Lemhadri A, Ouahidi ML, Jouad H (2002). Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *Journal of ethnopharmacology* **82**(2-3): 97-103.

el Bahri L, Chemli R (1991). Peganum harmala L: a poisonous plant of North Africa. *Veterinary and human toxicology* **33**(3): 276-277.

Enyeart JA, Liu H, Enyeart JJ (2009). Curcumin inhibits ACTH- and angiotensin II-stimulated cortisol secretion and Ca(v)3.2 current. *Journal of natural products* **72**(8): 1533-1537.

Ertel EA, Cohen CJ (1994). Voltage-dependent interactions: The influence and significance of membrane potential on drug-receptor interactions. *Drug Development Research* **33**(3): 203-213.

Farouk L, Laroubi A, Aboufatima R, Benharref A, Chait A (2008). Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of Peganum harmala L.: possible mechanisms involved. *Journal of ethnopharmacology* **115**(3): 449-454.

Glennon RA, Dukat M, Grella B, Hong S, Costantino L, Teitler M, *et al.* (2000). Binding of beta-carbolines and related agents at serotonin (5-HT<sub>2</sub>) and 5-HT<sub>1A</sub>), dopamine (D<sub>2</sub>) and benzodiazepine receptors. *Drug and alcohol dependence* **60**(2): 121-132.

Gomora JC, Murbartian J, Arias JM, Lee JH, Perez-Reyes E (2002). Cloning and expression of the human T-type channel Ca(v)3.3: insights into prepulse facilitation. *Biophysical journal* **83**(1): 229-241.

Grella B, Teitler M, Smith C, Herrick-Davis K, Glennon RA (2003). Binding of beta-carbolines at 5-HT<sub>2</sub> serotonin receptors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **13**(24): 4421-4425.

Handforth A (2012). Harmaline tremor: underlying mechanisms in a potential animal model of essential tremor. *Tremor and other hyperkinetic movements* **2**.

Herraiz T, Chaparro C (2005). Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: beta-carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications* **326**(2): 378-386.

Herraiz T, Gonzalez D, Ancin-Azpilicueta C, Aran VJ, Guillen H (2010). beta-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **48**(3): 839-845.

Huguenard JR (1996). Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annual review of physiology* **58**: 329-348.

Huguenard JR (2002). Block of T-Type Ca(2+) Channels Is an Important Action of Succinimide Antiabsence Drugs. *Epilepsy currents / American Epilepsy Society* **2**(2): 49-52.

Lee CS, Han ES, Jang YY, Han JH, Ha HW, Kim DE (2000). Protective effect of harmalol and harmaline on MPTP neurotoxicity in the mouse and dopamine-induced damage of brain mitochondria and PC12 cells. *Journal of neurochemistry* **75**(2): 521-531.

Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, *et al.* (1999). Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**(6): 1912-1921.

Leporatti ML, Ghedira K (2009). Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine* **5**: 31.

Llinas RR, Ribary U, Jeanmonod D, Kronberg E, Mitra PP (1999). Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(26): 15222-15227.

McCormick SJ, Tunnickliff G (1998). Inhibitors of synaptosomal gamma-hydroxybutyrate transport. *Pharmacology* **57**(3): 124-131.

Monteil A, Chemin J, Bourinet E, Mennessier G, Lory P, Nargeot J (2000a). Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *The Journal of biological chemistry* **275**(9): 6090-6100.

Monteil A, Chemin J, Leuranguer V, Altier C, Mennessier G, Bourinet E, *et al.* (2000b). Specific properties of T-type calcium channels generated by the human alpha 1I subunit. *The Journal of biological chemistry* **275**(22): 16530-16535.

Park YG, Park HY, Lee CJ, Choi S, Jo S, Choi H, *et al.* (2010). Ca(V)3.1 is a tremor rhythm pacemaker in the inferior olive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(23): 10731-10736.

Perez-Reyes E (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological reviews* **83**(1): 117-161.

Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, *et al.* (1998). Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **391**(6670): 896-900.

Perez-Reyes E, Lee JH, Cribbs LL (1999). Molecular characterization of two members of the T-type calcium channel family. *Annals of the New York Academy of Sciences* **868**: 131-143.

Pieroni A, Muenz H, Akbulut M, Baser KH, Durmuskahya C (2005). Traditional phytotherapy and trans-cultural pharmacy among Turkish migrants living in Cologne, Germany. *Journal of ethnopharmacology* **102**(1): 69-88.

Rommelspacher H, Nanz C, Borbe HO, Fehske KJ, Muller WE, Wollert U (1980). 1-Methyl-beta-carboline (harmaline), a potent endogenous inhibitor of benzodiazepine receptor binding. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **314**(1): 97-100.

Ross HR, Napier I, Connor M (2008). Inhibition of recombinant human T-type calcium channels by Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *The Journal of biological chemistry* **283**(23): 16124-16134.

Seo H, Li HY, Perez-Reyes E, Lee JH (2013). Effects of eugenol on T-type Ca<sup>2+</sup> channel isoforms. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **347**(2): 310-317.

Spletstoeser F, Bonnet U, Wiemann M, Bingmann D, Busselberg D (2005). Modulation of voltage-gated channel currents by harmaline and harmaline. *British journal of pharmacology* **144**(1): 52-58.

Tahraoui A, El-Hilaly J, Israili ZH, Lyoussi B (2007). Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *Journal of ethnopharmacology* **110**(1): 105-117.

Zhan X, Graf WM (2012). Harmaline attenuates voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> currents in neurons of the inferior olive. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* **15**(5): 657-668.

## Paper figures

### Figure 1

**Schematic structure of harmaline.** Harmaline is an indole alkaloid that belongs to the group of harlama alkaloids and  $\beta$ -carbolines. Harmaline can be converted to Harmine.

### Figure 2

#### ***Peganum harmala* inhibition of Cloned Cav3 T-type calcium channel isoforms**

Whole-cell patch clamp recordings of T-type calcium currents were obtained from HEK293 cells stably transfected with Cav3.1 (A, n=6), Cav3.2 (B, n=6), Cav3.3 (C, n=6) channels. Currents were elicited by stepping from -80 (holding potential (HP)) to -30 mV every 10 seconds. The modulation of T-type calcium channels by *Peganum harmala* methanolic extract is illustrated with representative current traces before (Control traces) and during bath application of 10 and 20  $\mu$ g/ml of the extract (A-C). The time plot (D) illustrates an example of the time-course of the inhibitory effect and wash-out of *Peganum harmala* extract using Cav3.2 channel isoforms. (E) Comparison of the inhibitory effect of *P. harmala* on T-type calcium channels isoforms (n=6). Example of Steady-state inhibition of Cav3.2 channel isoforms by *P. harmala*, examined for different HPs -100 and -80 mV (F, n=6-8). The dotted line indicated the zero current level. Data represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of the data are evaluated by Student's unpaired *t* tests, with \*P<0.05, \*\*P<0.01, or P\*\*\*<0.001.

### Figure

#### **Effects of *P. harmala* on biophysical properties of T-type calcium channel currents.**

(A) Representative current traces of the current-voltage (I-V) relationship before and after the application of 20 $\mu$ g/ml *P. harmala* on Cav3.3 channels (HP -80 mV) stepped to serial depolarizing test potentials (TP) ranging from -80 to +70 mV (n=6). (B) I-V relationship of Cav3.3 channels before and after *P. harmala* treatment (n=6). (C) Representative current traces of steady-state inactivation obtained by voltage-clamping HEK239 expressing T channels for 5 seconds at potentials between -110 and -40 mV by increments of 10 mV (TP -30 mV). (D) Effect of 20  $\mu$ g/ml *P. harmala* on Cav3.3 steady-state inactivation curves obtained from experiments illustrated in C (n=6). Data were fitted with Boltzmann esuation. Data represent the mean  $\pm$  SEM.

### Figure 4

#### ***Peganum harmala* effects on the current kinetics of T-type calcium channels.**

Analysis of Activation (A) and inactivation time constants (B) of Cav3.2 channel currents evoked by serial step pulses ranging from -80 to +50 mV from a holding potential of -80 mV and measured before and after treatment with 10  $\mu$ g/ml *P. harmala*. Currents were fitted with an exponential equation  $[I=p1*\exp(-x1/p2)+p3]$  .Statistical significance of the data are evaluated by Student's unpaired *t* tests, with \*P<0.05, \*\*P<0.01, or P\*\*\*<0.001. Data represent the mean  $\pm$  SEM, n=5.

### Figure 5

**Modulation of T-type calcium channel isoforms by Harmaline alkaloid.** T-type calcium currents were evoked by stepping HEK293 cells stably expressing recombinant T-type calcium channels. Currents were elicited by stepping cells from -80 (holding potential (HP)) to -30 mV every 10 seconds. The effect Harmaline on Cav3.1 (A-B), Cav3.2 (C-D) and Cav3.3 (E-F), are illustrated with representative current traces collected before and during bath application Harmaline (left panels). The corresponding time plots (right panels) illustrate the time-course of the inhibitory effect and wash-out of the  $\beta$ -carboline. Each panel is representative of 6 similar experiments (n=6) as illustrated by the insets in panels A, C, and E. The dotted line indicated the zero current level. Data represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of the data are evaluated by Student's unpaired *t* tests, with \*P<0.05, \*\*P<0.01, or P\*\*\*<0.001.

### Figure 6

**Harmaline effect on T-type channels current-voltage (I-V) relationship.** (A) Representative families of traces of T-channels isoforms recorded at different potentials before and after the application of 50  $\mu$ M Harmaline. Currents were evoked by serial depolarizing test potentials (TP) ranging from -80 to +70 mV from HP of -80 mV. Effects of 50  $\mu$ M on the three T channels isoforms I-V relationships; Cav3.1 (B), Cav3.2 (C) and Cav3.3 (D) obtained from experiments illustrated in (A). Data represent the mean  $\pm$  SEM. n=6-8.

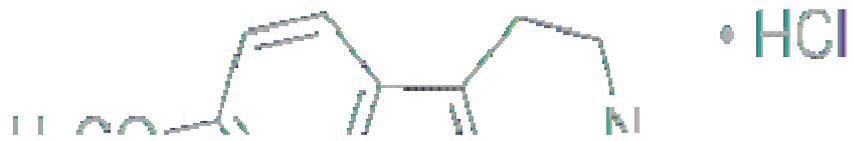
### Figure 7

**Effects of Harmaline on recombinant T-type calcium channels steady-state inactivation** (A) T channels current traces elicited from HPs ranged from -110 to -40 mV at -30 mV (5 s duration, 10 mV increments) in the absence and presence of 50  $\mu$ M Harmaline. Effects of 50  $\mu$ M on the three T channels isoforms steady-state inactivation; Cav3.1 (B), Cav3.2 (C) and Cav3.3 (D) obtained from experiments illustrated in (A). Data represent the mean  $\pm$  SEM. n=6.

### Figure 8

**State-dependant inhibition effects of Harmaline on T-type calcium channels.**

Cav3.3 currents were evoked by a test potential of -30 mV from different HPs of -100 and -80 mV (n=6). Data represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance of the data are evaluated by Student's unpaired *t* tests, with \*P<0.05, \*\*P<0.01, or P\*\*\*<0.001



# Figure 2

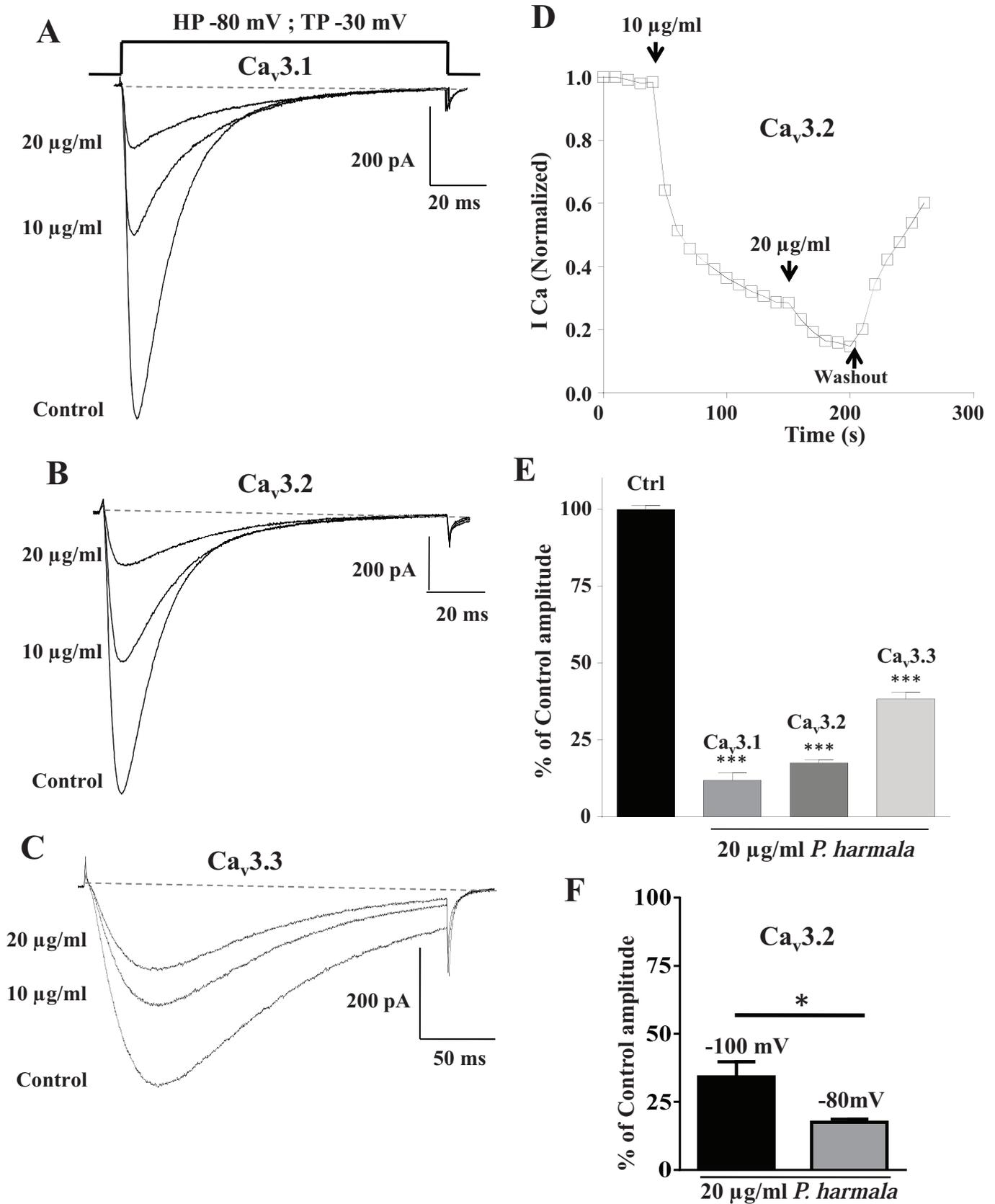


Figure 3

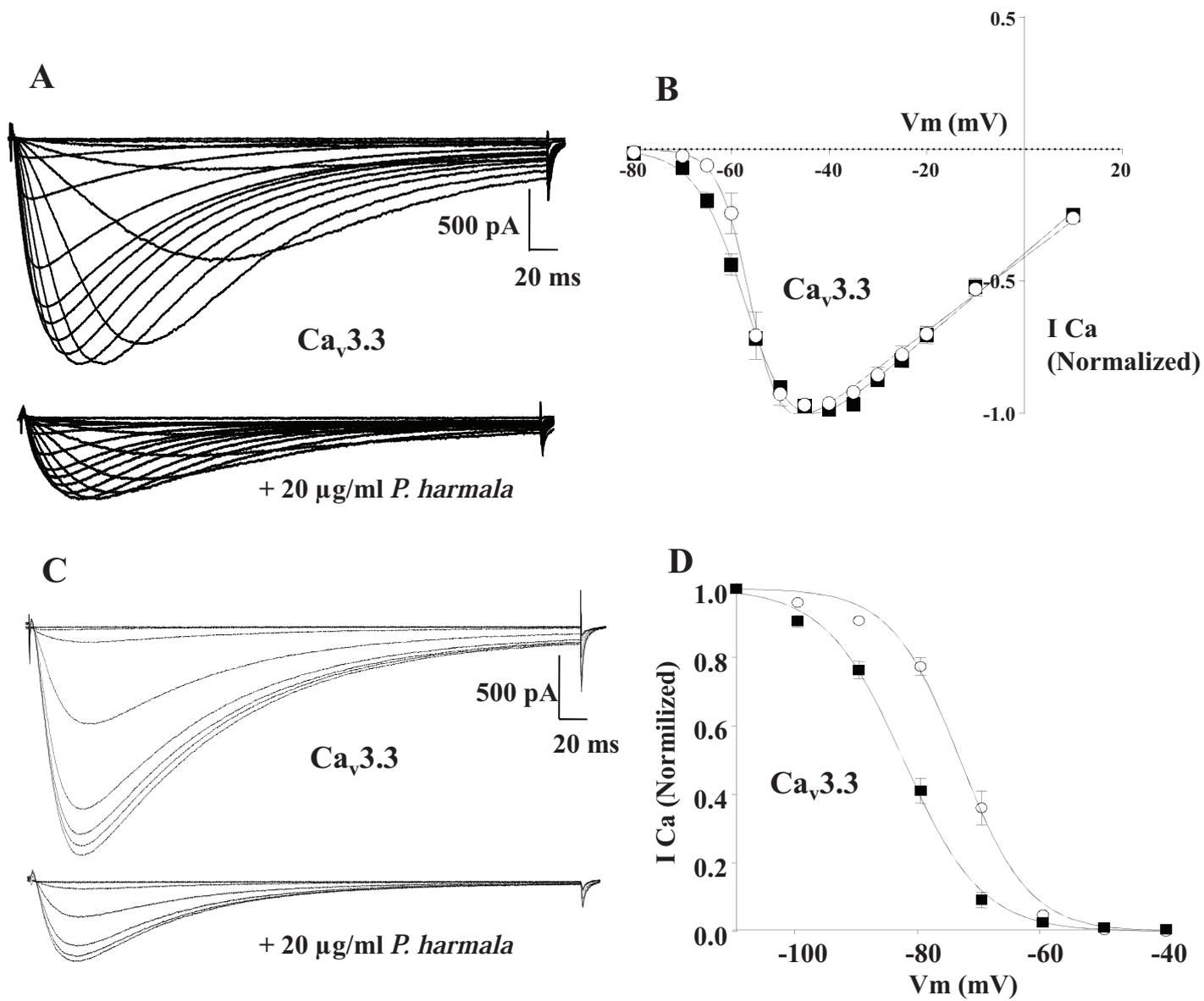
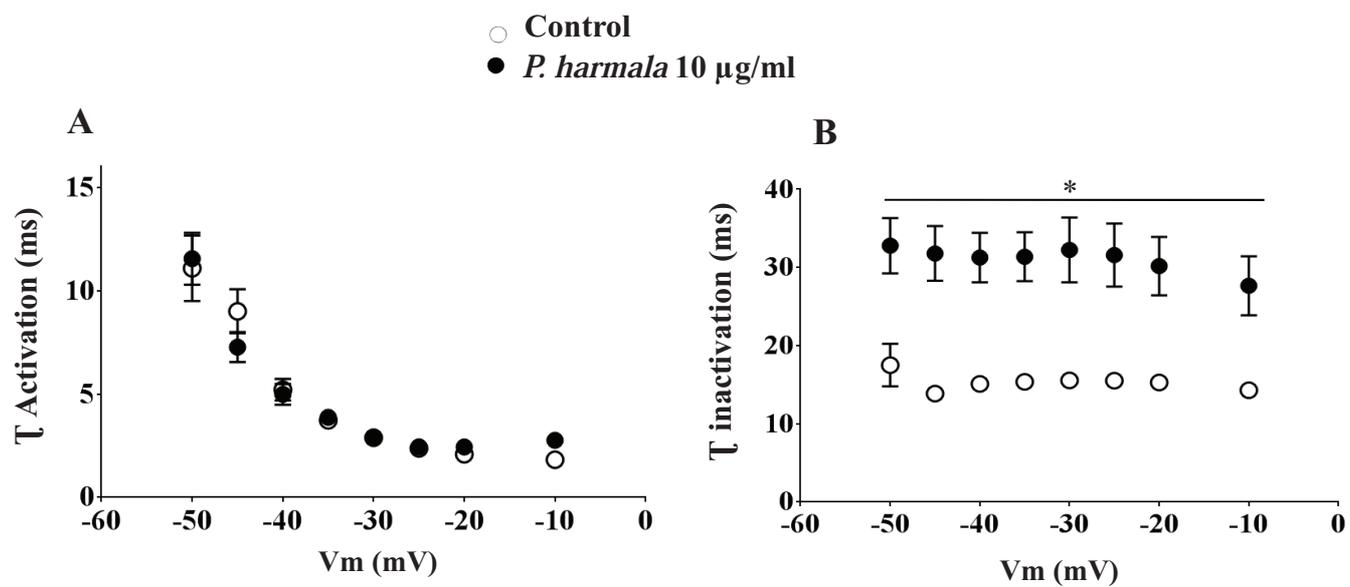


Figure 4



**Figure 5**

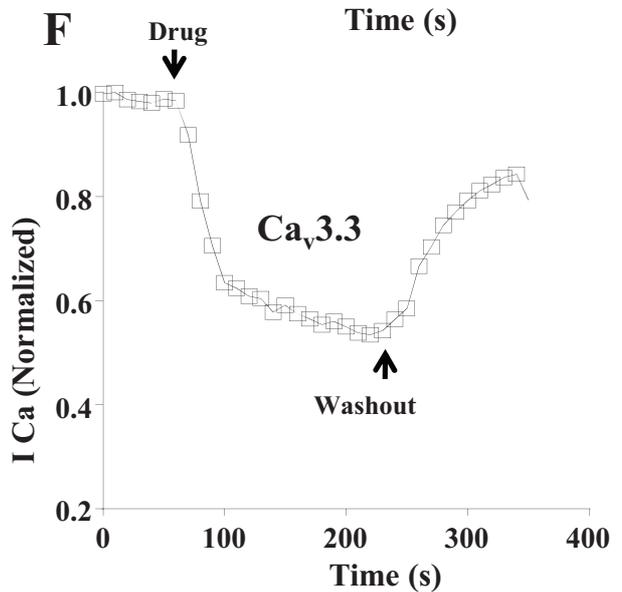
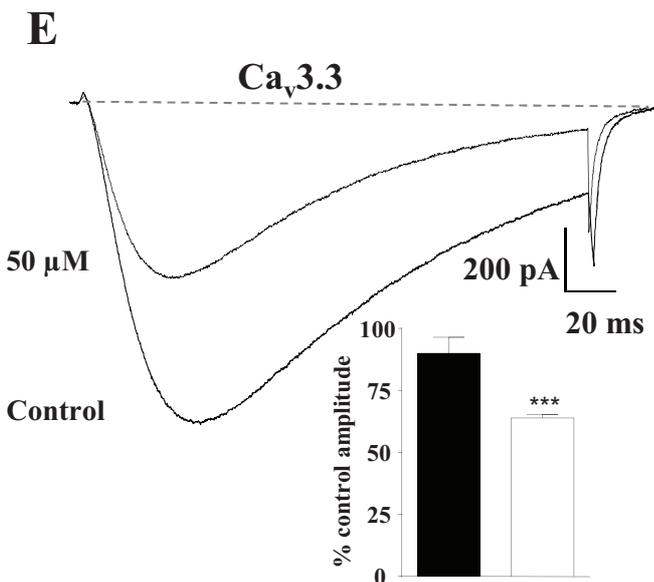
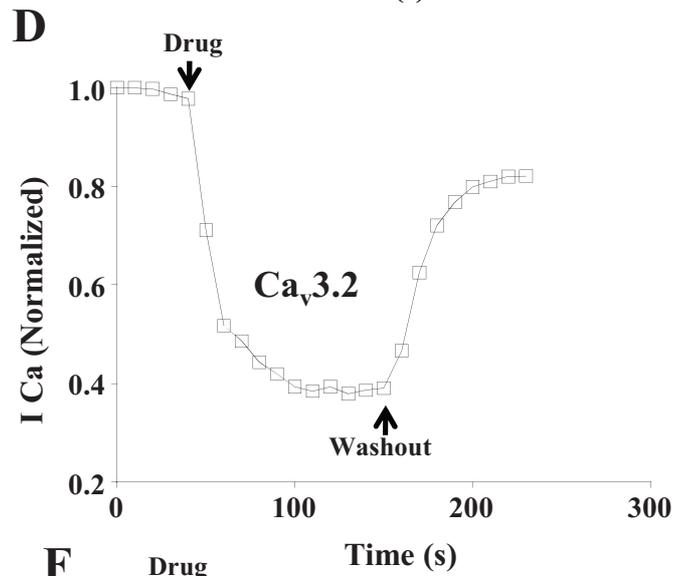
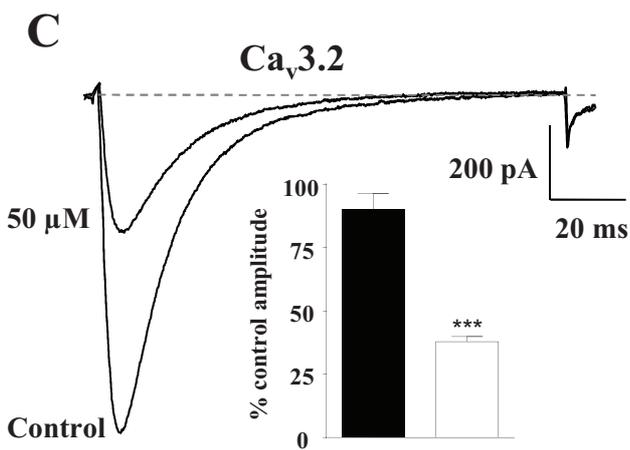
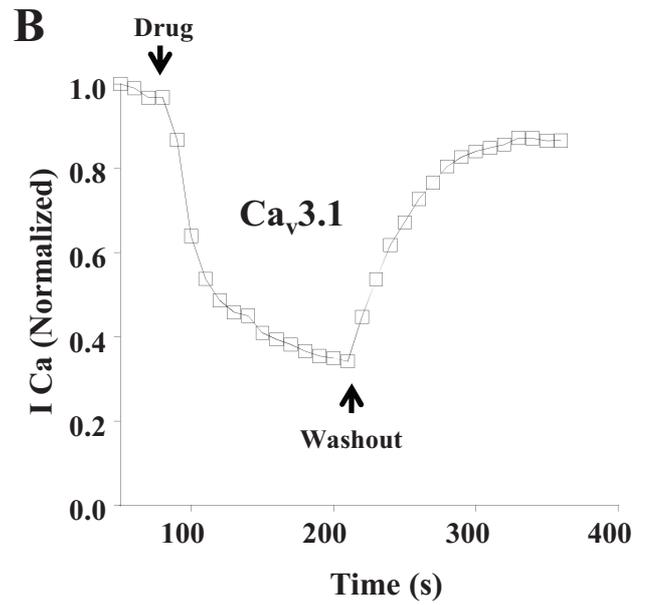
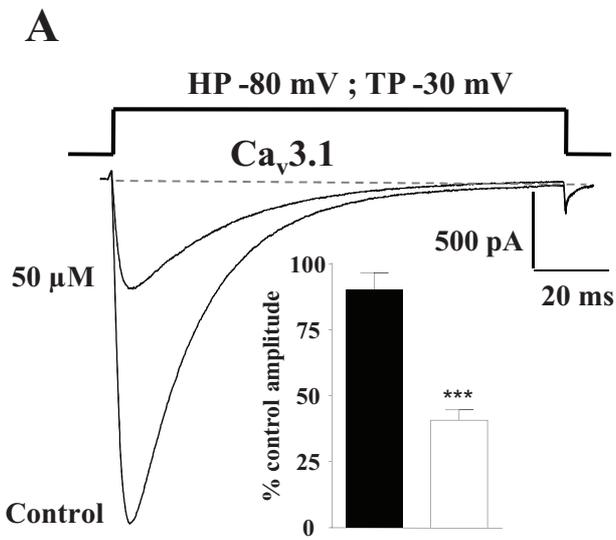
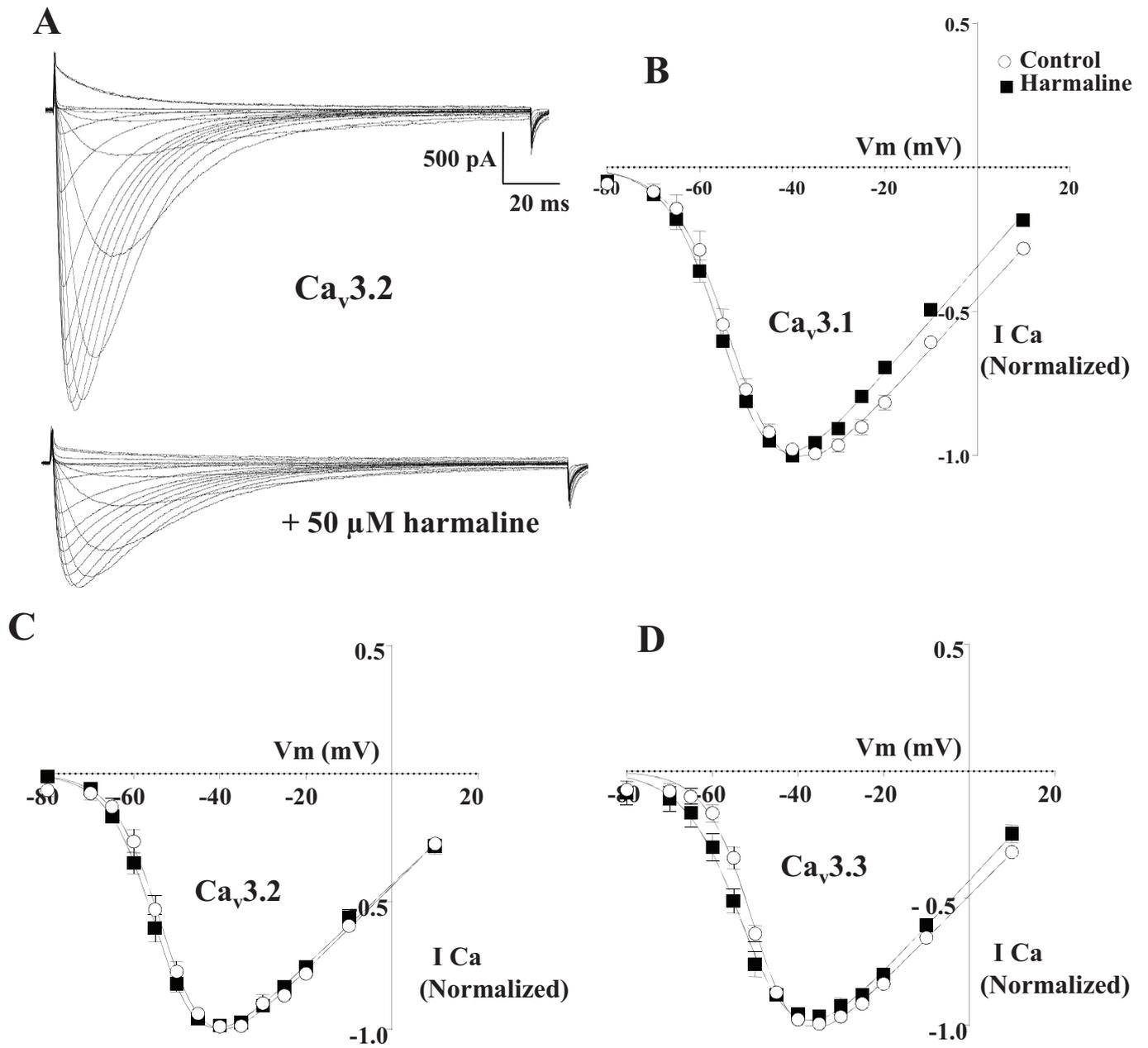
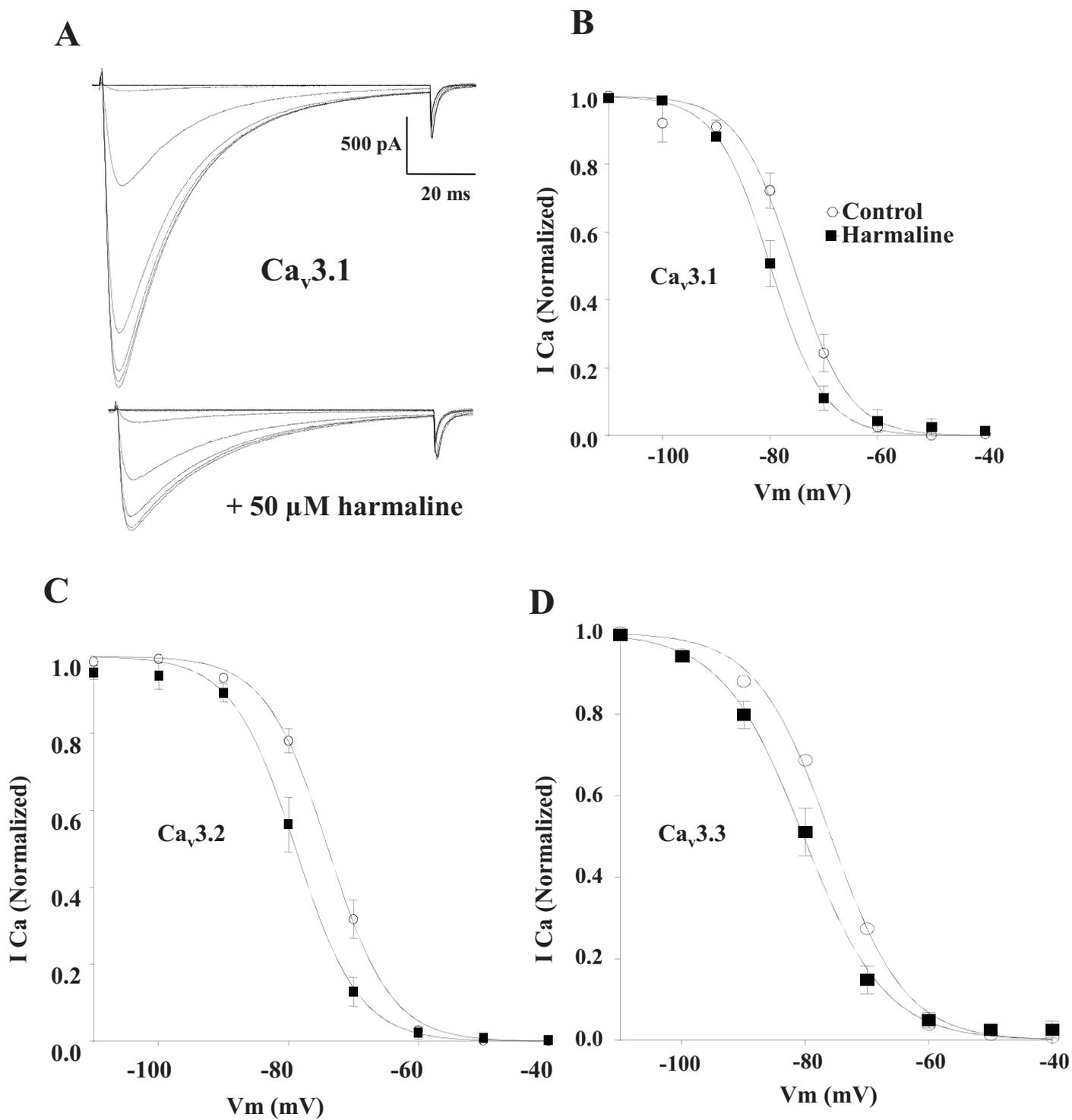


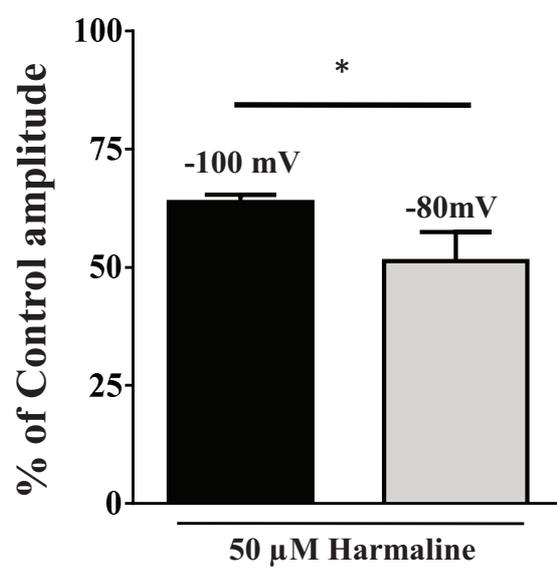
Figure 6



**Figure 7**



**Figure 8**



# Références

## VI. Références

Adams M, Schneider SV, Kluge M, Kessler M, Hamburger M (2012). Epilepsy in the Renaissance: a survey of remedies from 16th and 17th century German herbals. *Journal of ethnopharmacology* **143**(1): 1-13.

Adams ME, Myers RA, Imperial JS, Olivera BM (1993). Toxotyping rat brain calcium channels with omega-toxins from spider and cone snail venoms. *Biochemistry* **32**(47): 12566-12570.

Afrikanova T, Serruys AS, Buenafe OE, Clinckers R, Smolders I, de Witte PA, *et al.* (2013). Validation of the zebrafish pentylenetetrazol seizure model: locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. *PloS one* **8**(1): e54166.

Anderson MP, Mochizuki T, Xie J, Fischler W, Manger JP, Talley EM, *et al.* (2005). Thalamic Cav3.1 T-type Ca<sup>2+</sup> channel plays a crucial role in stabilizing sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(5): 1743-1748.

Anderson NJ, Robinson ES, Husbands SM, Delagrangé P, Nutt DJ, Hudson AL (2003). Characterization of [(3)H]harmane binding to rat whole brain membranes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1009**: 175-179.

Armstrong CM, Matteson DR (1985). Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science* **227**(4682): 65-67.

Arnoult C, Lemos JR, Florman HM (1997). Voltage-dependent modulation of T-type calcium channels by protein tyrosine phosphorylation. *The EMBO journal* **16**(7): 1593-1599.

Awad R, Muhammad A, Durst T, Trudeau VL, Arnason JT (2009). Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytotherapy research : PTR* **23**(8): 1075-1081.

Bakkers J (2011). Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovascular research* **91**(2): 279-288.

Baraban SC (2007). Emerging epilepsy models: insights from mice, flies, worms and fish. *Current opinion in neurology* **20**(2): 164-168.

Baraban SC, Taylor MR, Castro PA, Baier H (2005). Pentylenetetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* **131**(3): 759-768.

Barnes S, Kelly ME (2002). Calcium channels at the photoreceptor synapse. *Advances in experimental medicine and biology* **514**: 465-476.

Barton ME, Klein BD, Wolf HH, White HS (2001). Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy. *Epilepsy research* **47**(3): 217-227.

Baskind R, Birbeck GL (2005). Epilepsy-associated stigma in sub-Saharan Africa: the social landscape of a disease. *Epilepsy & behavior : E&B* **7**(1): 68-73.

Baxendale S, Holdsworth CJ, Meza Santoscoy PL, Harrison MR, Fox J, Parkin CA, *et al.* (2012). Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *Disease models & mechanisms* **5**(6): 773-784.

Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, *et al.* (1998). Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nature genetics* **19**(3): 264-267.

Ben-Shlomo Y, Bhatia K (2004). Using monoamine oxidase type B inhibitors in Parkinson's disease. *Bmj* **329**(7466): 581-582.

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, *et al.* (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* **51**(4): 676-685.

Berg JM (1990). Zinc fingers and other metal-binding domains. Elements for interactions between macromolecules. *The Journal of biological chemistry* **265**(12): 6513-6516.

Berger ND, Gadotti VM, Petrov RR, Chapman K, Diaz P, Zamponi GW (2014). NMP-7 inhibits chronic inflammatory and neuropathic pain via block of Cav3.2 T-type calcium channels and activation of CB2 receptors. *Molecular pain* **10**: 77.

Berghmans S, Hunt J, Roach A, Goldsmith P (2007). Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy research* **75**(1): 18-28.

Bernard K, Wang W, Narlawar R, Schmidt B, Kirk KL (2009). Curcumin cross-links cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) polypeptides and potentiates CFTR channel activity by distinct mechanisms. *The Journal of biological chemistry* **284**(45): 30754-30765.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**(7): 517-529.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **1**(1): 11-21.

Beurrier C, Congar P, Bioulac B, Hammond C (1999). Subthalamic nucleus neurons switch from single-spike activity to burst-firing mode. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**(2): 599-609.

Bhutada P, Mundhada Y, Bansod K, Dixit P, Umathe S, Mundhada D (2010). Anticonvulsant activity of berberine, an isoquinoline alkaloid in mice. *Epilepsy & behavior : E&B* **18**(3): 207-210.

Bialer M, Johannessen SI, Levy RH, Perucca E, Tomson T, White HS (2013). Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Eleventh Eilat Conference (EILAT XI). *Epilepsy research* **103**(1): 2-30.

Bialer M, Johannessen SI, Levy RH, Perucca E, Tomson T, White HS (2015). Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Twelfth Eilat Conference (EILAT XII). *Epilepsy research* **111**: 85-141.

Bickmeyer U, Weinsberg F, Muller E, Wiegand H (1998). Blockade of voltage-operated calcium channels, increase in spontaneous catecholamine release and elevation of intracellular calcium levels in bovine chromaffin cells by the plant alkaloid tetrandrine. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **357**(4): 441-445.

Bidaud I, Mezghrani A, Swayne LA, Monteil A, Lory P (2006). Voltage-gated calcium channels in genetic diseases. *Biochimica et biophysica acta* **1763**(11): 1169-1174.

Bijlenga P, Liu JH, Espinos E, Haenggeli CA, Fischer-Lougheed J, Bader CR, *et al.* (2000). T-type alpha 1H Ca<sup>2+</sup> channels are involved in Ca<sup>2+</sup> signaling during terminal differentiation (fusion) of human myoblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(13): 7627-7632.

Bourinet E, Alloui A, Monteil A, Barrere C, Couette B, Poirot O, *et al.* (2005a). Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *The EMBO journal* **24**(2): 315-324.

Bourinet E, Stotz SC, Spaetgens RL, Dayanithi G, Lemos J, Nargeot J, *et al.* (2001). Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of alpha(1E) (Ca(V)2.3) calcium channels. *Biophysical journal* **81**(1): 79-88.

Bourinet E, Zamponi GW (2005b). Voltage gated calcium channels as targets for analgesics. *Current topics in medicinal chemistry* **5**(6): 539-546.

Brette F, Salle L, Orchard CH (2004). Differential modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> current by SR Ca<sup>2+</sup> release at the T-tubules and surface membrane of rat ventricular myocytes. *Circulation research* **95**(1): e1-7.

Broicher T, Kanyshkova T, Meuth P, Pape HC, Budde T (2008). Correlation of T-channel coding gene expression, IT, and the low threshold Ca<sup>2+</sup> spike in the thalamus of a rat model of absence epilepsy. *Molecular and cellular neurosciences* **39**(3): 384-399.

Buckingham SD, Sattelle DB (2009). Fast, automated measurement of nematode swimming (thrashing) without morphometry. *BMC neuroscience* **10**: 84.

Cain SM, Snutch TP (2010). Contributions of T-type calcium channel isoforms to neuronal firing. *Channels* **4**(6): 475-482.

Cain SM, Snutch TP (2013). T-type calcium channels in burst-firing, network synchrony, and epilepsy. *Biochimica et biophysica acta* **1828**(7): 1572-1578.

Catterall WA (1991). Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: a tale of two calcium channels. *Cell* **64**(5): 871-874.

Catterall WA (2014). Sodium channels, inherited epilepsy, and antiepileptic drugs. *Annual review of pharmacology and toxicology* **54**: 317-338.

Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG (2005a). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological reviews* **57**(4): 397-409.

Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J (2005b). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews* **57**(4): 411-425.

Caulfield MP, Brown DA (1992). Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *British journal of pharmacology* **106**(2): 231-232.

Cavanagh HM, Wilkinson JM (2002). Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy research : PTR* **16**(4): 301-308.

Chemin J, Mezghrani A, Bidaud I, Dupasquier S, Marger F, Barrere C, *et al.* (2007). Temperature-dependent modulation of Ca<sub>v</sub>3 T-type calcium channels by protein kinases C and A in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **282**(45): 32710-32718.

Chemin J, Monteil A, Bourinet E, Nargeot J, Lory P (2001). Alternatively spliced alpha(1G) (Ca(V)3.1) intracellular loops promote specific T-type Ca(2+) channel gating properties. *Biophysical journal* **80**(3): 1238-1250.

Chemin J, Monteil A, Briquaire C, Richard S, Perez-Reyes E, Nargeot J, *et al.* (2000). Overexpression of T-type calcium channels in HEK-293 cells increases intracellular calcium without affecting cellular proliferation. *FEBS letters* **478**(1-2): 166-172.

Chemin J, Nargeot J, Lory P (2002). Neuronal T-type alpha 1H calcium channels induce neuritogenesis and expression of high-voltage-activated calcium channels in the NG108-15 cell line. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**(16): 6856-6862.

Chen Y, Parker WD, Wang K (2014). The role of T-type calcium channel genes in absence seizures. *Frontiers in neurology* **5**: 45.

Choe W, Messinger RB, Leach E, Eckle VS, Obradovic A, Salajegheh R, *et al.* (2011). TTA-P2 is a potent and selective blocker of T-type calcium channels in rat sensory neurons and a novel antinociceptive agent. *Molecular pharmacology* **80**(5): 900-910.

Choi SW, Kim KS, Shin DH, Yoo HY, Choe H, Ko TH, *et al.* (2013). Class 3 inhibition of hERG K<sup>+</sup> channel by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and curcumin. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **465**(8): 1121-1134.

Chuang RS, Jaffe H, Cribbs L, Perez-Reyes E, Swartz KJ (1998). Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nature neuroscience* **1**(8): 668-674.

Clapham DE (2007). Calcium signaling. *Cell* **131**(6): 1047-1058.

Clozel JP, Banken L, Osterrieder W (1989). Effects of Ro 40-5967, a novel calcium antagonist, on myocardial function during ischemia induced by lowering coronary perfusion pressure in dogs: comparison with verapamil. *Journal of cardiovascular pharmacology* **14**(5): 713-721.

Clozel JP, Ertel EA, Ertel SI (1997). Discovery and main pharmacological properties of mibefradil (Ro 40-5967), the first selective T-type calcium channel blocker. *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension* **15**(5): S17-25.

Coelho VR, Vieira CG, de Souza LP, Moyses F, Basso C, Papke DK, *et al.* (2015). Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. *Life sciences* **122**: 65-71.

Cole AJ, Koh S, Zheng Y (2002). Are seizures harmful: what can we learn from animal models? *Progress in brain research* **135**: 13-23.

Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, *et al.* (1998). Cloning and characterization of  $\alpha 1H$  from human heart, a member of the T-type  $Ca^{2+}$  channel gene family. *Circulation research* **83**(1): 103-109.

Cueni L, Canepari M, Lujan R, Emmenegger Y, Watanabe M, Bond CT, *et al.* (2008). T-type  $Ca^{2+}$  channels, SK2 channels and SERCAs gate sleep-related oscillations in thalamic dendrites. *Nature neuroscience* **11**(6): 683-692.

Cunliffe VT, Baines RA, Giachello CN, Lin WH, Morgan A, Reuber M, *et al.* (2015). Epilepsy research methods update: Understanding the causes of epileptic seizures and identifying new treatments using non-mammalian model organisms. *Seizure* **24**: 44-51.

Curtis BM, Catterall WA (1984). Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* **23**(10): 2113-2118.

D'Antuono M, Kohling R, Ricalzone S, Gotman J, Biagini G, Avoli M (2010). Antiepileptic drugs abolish ictal but not interictal epileptiform discharges in vitro. *Epilepsia* **51**(3): 423-431.

Darmanin S, Wismayer PS, Camilleri Podesta MT, Micallef MJ, Buhagiar JA (2009). An extract from *Ricinus communis* L. leaves possesses cytotoxic properties and induces apoptosis in SK-MEL-28 human melanoma cells. *Natural product research* **23**(6): 561-571.

Darszon A, Lopez-Martinez P, Acevedo JJ, Hernandez-Cruz A, Trevino CL (2006). T-type  $Ca^{2+}$  channels in sperm function. *Cell calcium* **40**(2): 241-252.

de Almeida RN, Agra Mde F, Maior FN, de Sousa DP (2011). Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. *Molecules* **16**(3): 2726-2742.

Dedeurwaerdere S, van Raay L, Morris MJ, Reed RC, Hogan RE, O'Brien TJ (2011). Fluctuating and constant valproate administration gives equivalent seizure control in rats with genetic and acquired epilepsy. *Seizure* **20**(1): 72-79.

Delgado L, Schmachtenberg O (2008). Immunohistochemical localization of GABA, GAD65, and the receptor subunits GABAA $\alpha 1$  and GABAB1 in the zebrafish cerebellum. *Cerebellum* **7**(3): 444-450.

Destexhe A, Neubig M, Ulrich D, Huguenard J (1998). Dendritic low-threshold calcium currents in thalamic relay cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**(10): 3574-3588.

Dingledine R (2012). Glutamatergic Mechanisms Related to Epilepsy: Ionotropic Receptors. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV (eds). *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 4th edn. Bethesda (MD). p<sup>^</sup>pp.

Doldan MJ, Prego B, Holmqvist BI, de Miguel E (1999). Distribution of GABA-immunolabeling in the early zebrafish (*Danio rerio*) brain. *European journal of morphology* **37**(2-3): 126-129.

Eddouks M, Chattopadhyay D, De Feo V, Cho WC (2012). Medicinal plants in the prevention and treatment of chronic diseases. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* **2012**: 458274.

el Bahri L, Chemli R (1991). *Peganum harmala* L: a poisonous plant of North Africa. *Veterinary and human toxicology* **33**(3): 276-277.

Elger CE, Schmidt D (2008). Modern management of epilepsy: a practical approach. *Epilepsy & behavior : E&B* **12**(4): 501-539.

Elisabetsky E, Brum LF, Souza DO (1999). Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **6**(2): 107-113.

Eller P, Berjukov S, Wanner S, Huber I, Hering S, Knaus HG, *et al.* (2000). High affinity interaction of mibefradil with voltage-gated calcium and sodium channels. *British journal of pharmacology* **130**(3): 669-677.

Ellis LD, Seibert J, Soanes KH (2012). Distinct models of induced hyperactivity in zebrafish larvae. *Brain research* **1449**: 46-59.

Enyeart JA, Liu H, Enyeart JJ (2009). Curcumin inhibits ACTH- and angiotensin II-stimulated cortisol secretion and Ca(v)3.2 current. *Journal of natural products* **72**(8): 1533-1537.

Enyeart JJ, Biagi BA, Mlinar B (1992). Preferential block of T-type calcium channels by neuroleptics in neural crest-derived rat and human C cell lines. *Molecular pharmacology* **42**(2): 364-372.

Ertel EA, Cohen CJ (1994). Voltage-dependent interactions: The influence and significance of membrane potential on drug-receptor interactions. *Drug Development Research* **33**(3): 203-213.

Fallarini S, Miglio G, Paoletti T, Minassi A, Amoruso A, Bardelli C, *et al.* (2009). Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death. *British journal of pharmacology* **157**(6): 1072-1084.

Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z (1985). Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization* **63**(6): 965-981.

Farouk L, Laroubi A, Aboufatima R, Benharref A, Chait A (2008). Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: possible mechanisms involved. *Journal of ethnopharmacology* **115**(3): 449-454.

Fetcho JR (2007). The utility of zebrafish for studies of the comparative biology of motor systems. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution* **308**(5): 550-562.

Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, *et al.* (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* **55**(4): 475-482.

Fleming A, Diekmann H, Goldsmith P (2013). Functional characterisation of the maturation of the blood-brain barrier in larval zebrafish. *PloS one* **8**(10): e77548.

Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW (1987). Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *The Journal of physiology* **394**: 149-172.

Francois A, Kerckhove N, Meleine M, Alloui A, Barrere C, Gelot A, *et al.* (2013). State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance Ca(V)<sub>3.2</sub> selectivity and support analgesic effects. *Pain* **154**(2): 283-293.

Fueta Y, Avoli M (1992). Effects of antiepileptic drugs on 4-aminopyridine-induced epileptiform activity in young and adult rat hippocampus. *Epilepsy research* **12**(3): 207-215.

Gackiere F, Bidaux G, Lory P, Prevarskaya N, Mariot P (2006). A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell calcium* **39**(4): 357-366.

Gamaro GD, Suyenaga E, Borsoi M, Lermen J, Pereira P, Ardenghi P (2011). Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *ISRN pharmacology* **2011**: 451682.

Gecz J (2010). Glutamate receptors and learning and memory. *Nature genetics* **42**(11): 925-926.

Glennon RA, Dukat M, Grella B, Hong S, Costantino L, Teitler M, *et al.* (2000). Binding of beta-carbolines and related agents at serotonin (5-HT<sub>2</sub>) and 5-HT<sub>1A</sub>), dopamine (D<sub>2</sub>) and benzodiazepine receptors. *Drug and alcohol dependence* **60**(2): 121-132.

Gomora JC, Daud AN, Weiergraber M, Perez-Reyes E (2001). Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs. *Molecular pharmacology* **60**(5): 1121-1132.

Gomora JC, Enyeart JJ (1999). Dual pharmacological properties of a cyclic AMP-sensitive potassium channel. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **290**(1): 266-275.

Gomora JC, Murbartian J, Arias JM, Lee JH, Perez-Reyes E (2002). Cloning and expression of the human T-type channel Ca<sub>v</sub>3.3: insights into prepulse facilitation. *Biophysical journal* **83**(1): 229-241.

Gonzalez-Trujano ME, Pena EI, Martinez AL, Moreno J, Guevara-Fefer P, Deciga-Campos M, *et al.* (2007). Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *Journal of ethnopharmacology* **111**(3): 476-482.

Gorji A (2003). Pharmacological treatment of headache using traditional Persian medicine. *Trends in pharmacological sciences* **24**(7): 331-334.

Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, *et al.* (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO journal* **20**(24): 6969-6978.

Grella B, Teitler M, Smith C, Herrick-Davis K, Glennon RA (2003). Binding of beta-carbolines at 5-HT<sub>2</sub> serotonin receptors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **13**(24): 4421-4425.

Groen JL, Andrade A, Ritz K, Jalalzadeh H, Haagmans M, Bradley TE, *et al.* (2015). CACNA1B mutation is linked to unique myoclonus-dystonia syndrome. *Human molecular genetics* **24**(4): 987-993.

Gross RA (1992). A brief history of epilepsy and its therapy in the Western Hemisphere. *Epilepsy research* **12**(2): 65-74.

Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *The Journal of physiology* **395**: 233-253.

Halberstein RA (2005). Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Annals of epidemiology* **15**(9): 686-699.

Handforth A (2012). Harmaline tremor: underlying mechanisms in a potential animal model of essential tremor. *Tremor and other hyperkinetic movements* **2**.

Harries AD, Murray MB, Jeon CY, Ottmani SE, Lonroth K, Barreto ML, *et al.* (2010). Defining the research agenda to reduce the joint burden of disease from diabetes mellitus and tuberculosis. *Tropical medicine & international health : TM & IH* **15**(6): 659-663.

Hering S, Aczel S, Kraus RL, Berjukow S, Striessnig J, Timin EN (1997). Molecular mechanism of use-dependent calcium channel block by phenylalkylamines: role of inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(24): 13323-13328.

Heron SE, Phillips HA, Mulley JC, Mazarib A, Neufeld MY, Berkovic SF, *et al.* (2004). Genetic variation of CACNA1H in idiopathic generalized epilepsy. *Annals of neurology* **55**(4): 595-596.

Herraiz T, Chaparro C (2005). Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: beta-carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications* **326**(2): 378-386.

Herraiz T, Chaparro C (2006a). Analysis of monoamine oxidase enzymatic activity by reversed-phase high performance liquid chromatography and inhibition by beta-carboline alkaloids occurring in foods and plants. *Journal of chromatography. A* **1120**(1-2): 237-243.

Herraiz T, Chaparro C (2006b). Human monoamine oxidase enzyme inhibition by coffee and beta-carbolines norharman and harman isolated from coffee. *Life sciences* **78**(8): 795-802.

Herraiz T, Gonzalez D, Ancin-Azpilicueta C, Aran VJ, Guillen H (2010). beta-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **48**(3): 839-845.

Herrero M, Plaza M, Cifuentes A, Ibanez E (2010). Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *Journal of chromatography. A* **1217**(16): 2512-2520.

Hildebrand ME, David LS, Hamid J, Mulatz K, Garcia E, Zamponi GW, *et al.* (2007). Selective inhibition of Cav3.3 T-type calcium channels by Galphaq/11-coupled muscarinic acetylcholine receptors. *The Journal of biological chemistry* **282**(29): 21043-21055.

Hill TD, Cascio MG, Romano B, Duncan M, Pertwee RG, Williams CM, *et al.* (2013). Cannabidiol-rich cannabis extracts are anticonvulsant in mouse and rat via a CB1 receptor-independent mechanism. *British journal of pharmacology* **170**(3): 679-692.

Holder N, Xu Q (2008). The zebrafish: an overview of its early development. *Methods in molecular biology* **461**: 483-491.

Hondeghem LM, Katzung BG (1984). Antiarrhythmic agents: the modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channel-blocking drugs. *Annual review of pharmacology and toxicology* **24**: 387-423.

Hortopan GA, Dinday MT, Baraban SC (2010). Zebrafish as a model for studying genetic aspects of epilepsy. *Disease models & mechanisms* **3**(3-4): 144-148.

Hosking RD, Zajicek JP (2008). Therapeutic potential of cannabis in pain medicine. *British journal of anaesthesia* **101**(1): 59-68.

Hu CW, Sheng Y, Zhang Q, Liu HB, Xie X, Ma WC, *et al.* (2012). Curcumin inhibits hERG potassium channels in vitro. *Toxicology letters* **208**(2): 192-196.

Huang L, Keyser BM, Tagmose TM, Hansen JB, Taylor JT, Zhuang H, *et al.* (2004). NNC 55-0396 [(1S,2S)-2-(2-(N-[(3-benzimidazol-2-yl)propyl]-N-methylamino)ethyl)-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl cyclopropanecarboxylate dihydrochloride]: a new selective inhibitor of T-type calcium channels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **309**(1): 193-199.

Huang W, Lu C, Wu Y, Ouyang S, Chen Y (2015). T-type calcium channel antagonists, mibefradil and NNC-55-0396 inhibit cell proliferation and induce cell apoptosis in leukemia cell lines. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **34**: 54.

Huguenard JR (1996). Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annual review of physiology* **58**: 329-348.

Iftinca MC (2011). Neuronal T-type calcium channels: what's new? Iftinca: T-type channel regulation. *Journal of medicine and life* **4**(2): 126-138.

Iftinca MC, Zamponi GW (2009). Regulation of neuronal T-type calcium channels. *Trends in pharmacological sciences* **30**(1): 32-40.

Ishikawa T, Kaneko M, Shin HS, Takahashi T (2005). Presynaptic N-type and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels mediating synaptic transmission at the calyx of Held of mice. *The Journal of physiology* **568**(Pt 1): 199-209.

Jarvis MF, Scott VE, McGaraughty S, Chu KL, Xu J, Niforatos W, *et al.* (2014). A peripherally acting, selective T-type calcium channel blocker, ABT-639, effectively reduces nociceptive and neuropathic pain in rats. *Biochemical pharmacology* **89**(4): 536-544.

Jeong JY, Kwon HB, Ahn JC, Kang D, Kwon SH, Park JA, *et al.* (2008). Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish. *Brain research bulletin* **75**(5): 619-628.

Jin X, Liu P, Yang F, Zhang YH, Miao D (2013). Rosmarinic acid ameliorates depressive-like behaviors in a rat model of CUS and Up-regulates BDNF levels in the hippocampus and hippocampal-derived astrocytes. *Neurochemical research* **38**(9): 1828-1837.

Karaki H, Kishimoto T, Ozaki H, Sakata K, Umeno H, Urakawa N (1986). Inhibition of calcium channels by harmaline and other harmala alkaloids in vascular and intestinal smooth muscles. *British journal of pharmacology* **89**(2): 367-375.

Kawai H, Arata N, Nakayasu H (2001). Three-dimensional distribution of astrocytes in zebrafish spinal cord. *Glia* **36**(3): 406-413.

Kelly KM, Gross RA, Macdonald RL (1990). Valproic acid selectively reduces the low-threshold (T) calcium current in rat nodose neurons. *Neuroscience letters* **116**(1-2): 233-238.

Kelm MA, Nair MG, Strasburg GM, DeWitt DL (2000). Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **7**(1): 7-13.

Khamse S, Sadr SS, Roghani M, Hasanzadeh G, Mohammadian M (2015). Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms. *Pharmaceutical biology* **53**(12): 1818-1825.

Khosravani H, Altier C, Simms B, Hamming KS, Snutch TP, Mezeyova J, *et al.* (2004). Gating effects of mutations in the Cav3.2 T-type calcium channel associated with childhood absence epilepsy. *The Journal of biological chemistry* **279**(11): 9681-9684.

Kimura Y, Okuda H, Okuda T, Hatano T, Arichi S (1987). Studies on the activities of tannins and related compounds, X. Effects of caffeetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of natural products* **50**(3): 392-399.

King VF, Garcia ML, Himmel D, Reuben JP, Lam YK, Pan JX, *et al.* (1988). Interaction of tetrandrine with slowly inactivating calcium channels. Characterization of calcium channel modulation by an alkaloid of Chinese medicinal herb origin. *The Journal of biological chemistry* **263**(5): 2238-2244.

Kirmizibekmez H, Demirci B, Yesilada E, Baser KH, Demirci F (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* growing wild in Turkey. *Natural product communications* **4**(7): 1001-1006.

Koehn FE, Carter GT (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **4**(3): 206-220.

Kotagal P (2011). Neurostimulation: vagus nerve stimulation and beyond. *Seminars in pediatric neurology* **18**(3): 186-194.

Koulivand PH, Khaleghi Ghadiri M, Gorji A (2013). Lavender and the nervous system. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* **2013**: 681304.

Kramer MA, Cash SS (2012). Epilepsy as a disorder of cortical network organization. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **18**(4): 360-372.

Kraus RL, Li Y, Gregan Y, Gotter AL, Uebele VN, Fox SV, *et al.* (2010). In vitro characterization of T-type calcium channel antagonist TTA-A2 and in vivo effects on arousal in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **335**(2): 409-417.

Kwan CY, Achike FI (2002). Tetrandrine and related bis-benzylisoquinoline alkaloids from medicinal herbs: cardiovascular effects and mechanisms of action. *Acta pharmacologica Sinica* **23**(12): 1057-1068.

Kwan P, Brodie MJ (2000). Early identification of refractory epilepsy. *The New England journal of medicine* **342**(5): 314-319.

Kwan P, Trinka E, Van Paesschen W, Rektor I, Johnson ME, Lu S (2014). Adjunctive brivaracetam for uncontrolled focal and generalized epilepsies: results of a phase III, double-blind, randomized, placebo-controlled, flexible-dose trial. *Epilepsia* **55**(1): 38-46.

Lee CS, Han ES, Jang YY, Han JH, Ha HW, Kim DE (2000). Protective effect of harmalol and harmaline on MPTP neurotoxicity in the mouse and dopamine-induced damage of brain mitochondria and PC12 cells. *Journal of neurochemistry* **75**(2): 521-531.

Lee J, Kim D, Shin HS (2004). Lack of delta waves and sleep disturbances during non-rapid eye movement sleep in mice lacking alpha1G-subunit of T-type calcium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(52): 18195-18199.

Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, *et al.* (1999a). Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**(6): 1912-1921.

Lee JH, Gomora JC, Cribbs LL, Perez-Reyes E (1999b). Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophysical journal* **77**(6): 3034-3042.

Lee M (2014a). Z944: a first in class T-type calcium channel modulator for the treatment of pain. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* **19 Suppl 2**: S11-12.

Lee MH, Yeon KY, Park CK, Li HY, Fang Z, Kim MS, *et al.* (2005). Eugenol inhibits calcium currents in dental afferent neurons. *Journal of dental research* **84**(9): 848-851.

Lee SK (2014b). Old versus New: Why Do We Need New Antiepileptic Drugs? *Journal of epilepsy research* **4**(2): 39-44.

Lee Y, Kim D, Kim YH, Lee H, Lee CJ (2010). Improvement of pentylenetetrazol-induced learning deficits by valproic acid in the adult zebrafish. *European journal of pharmacology* **643**(2-3): 225-231.

Lin TY, Lin YW, Lu CW, Huang SK, Wang SJ (2013). Berberine Inhibits the Release of Glutamate in Nerve Terminals from Rat Cerebral Cortex. *PloS one* **8**(6): e67215.

Lin TY, Lu CW, Wang CC, Wang YC, Wang SJ (2011). Curcumin inhibits glutamate release in nerve terminals from rat prefrontal cortex: possible relevance to its antidepressant mechanism. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **35**(7): 1785-1793.

Linck VM, da Silva AL, Figueiro M, Caramao EB, Moreno PR, Elisabetsky E (2010). Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **17**(8-9): 679-683.

Linck VM, da Silva AL, Figueiro M, Piato AL, Herrmann AP, Dupont Birck F, *et al.* (2009). Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **16**(4): 303-307.

Lipp J (1991). Possible mechanisms of morphine analgesia. *Clinical neuropharmacology* **14**(2): 131-147.

Liu JH, Bijlenga P, Occhiodoro T, Fischer-Lougheed J, Bader CR, Bernheim L (1999). Mibefradil (Ro 40-5967) inhibits several Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> currents in human fusion-competent myoblasts. *British journal of pharmacology* **126**(1): 245-250.

Liu K, Gui B, Sun Y, Shi N, Gu Z, Zhang T, *et al.* (2013). Inhibition of L-type Ca(2+) channels by curcumin requires a novel protein kinase-theta isoform in rat hippocampal neurons. *Cell calcium* **53**(3): 195-203.

Liu QY, Karpinski E, Pang PK (1992). Tetrandrine inhibits both T and L calcium channel currents in ventricular cells. *Journal of cardiovascular pharmacology* **20**(4): 513-519.

Liu QY, Li B, Gang JM, Karpinski E, Pang PK (1995). Tetrandrine, a Ca<sup>++</sup> antagonist: effects and mechanisms of action in vascular smooth muscle cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **273**(1): 32-39.

Llinas R, Yarom Y (1981). Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurones in vitro. *The Journal of physiology* **315**: 569-584.

Llinas RR, Ribary U, Jeanmonod D, Kronberg E, Mitra PP (1999). Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(26): 15222-15227.

Lory P, Chemin J (2007). Towards the discovery of novel T-type calcium channel blockers. *Expert opinion on therapeutic targets* **11**(5): 717-722.

Loscher W (2002). Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research* **50**(1-2): 105-123.

Loscher W (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* **20**(5): 359-368.

- Loscher W, Klitgaard H, Twyman RE, Schmidt D (2013). New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nature reviews. Drug discovery* **12**(10): 757-776.
- Magiorkinis E, Sidiropoulou K, Diamantis A (2010). Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. *Epilepsy & behavior : E&B* **17**(1): 103-108.
- Malawska B (2005). New anticonvulsant agents. *Current topics in medicinal chemistry* **5**(1): 69-85.
- Mangoni ME, Nargeot J (2008). Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiological reviews* **88**(3): 919-982.
- Marescaux C, Vergnes M (1995). Genetic Absence Epilepsy in Rats from Strasbourg (GAERS). *Italian journal of neurological sciences* **16**(1-2): 113-118.
- Marescaux C, Vergnes M, Depaulis A (1992). Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg--a review. *Journal of neural transmission. Supplementum* **35**: 37-69.
- Markowitz K, Moynihan M, Liu M, Kim S (1992). Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinically oriented review. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* **73**(6): 729-737.
- Martin ED, Araque A, Buno W (2001). Synaptic regulation of the slow Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: implication in epileptogenesis. *Journal of neurophysiology* **86**(6): 2878-2886.
- Martin ED, Pozo MA (2004). Valproate reduced synaptic activity increase induced by 4-aminopyridine at the hippocampal CA3-CA1 synapse. *Epilepsia* **45**(5): 436-440.
- Martin RL, Lee JH, Cribbs LL, Perez-Reyes E, Hanck DA (2000). Mibefradil block of cloned T-type calcium channels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **295**(1): 302-308.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**(6284): 561-564.
- Matthews EA, Dickenson AH (2001). Effects of ethosuximide, a T-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker, on dorsal horn neuronal responses in rats. *European journal of pharmacology* **415**(2-3): 141-149.

McCleskey EW, Fox AP, Feldman DH, Cruz LJ, Olivera BM, Tsien RW, *et al.* (1987). Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**(12): 4327-4331.

McDonough SI, Bean BP (1998). Mibefradil inhibition of T-type calcium channels in cerebellar purkinje neurons. *Molecular pharmacology* **54**(6): 1080-1087.

McKay BE, McRory JE, Molineux ML, Hamid J, Snutch TP, Zamponi GW, *et al.* (2006). Ca(V)<sub>3</sub> T-type calcium channel isoforms differentially distribute to somatic and dendritic compartments in rat central neurons. *The European journal of neuroscience* **24**(9): 2581-2594.

McNulty MM, Hanck DA (2004). State-dependent mibefradil block of Na<sup>+</sup> channels. *Molecular pharmacology* **66**(6): 1652-1661.

Mehrke G, Zong XG, Flockerzi V, Hofmann F (1994). The Ca(++)-channel blocker Ro 40-5967 blocks differently T-type and L-type Ca<sup>++</sup> channels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **271**(3): 1483-1488.

Meldrum BS, Rogawski MA (2007). Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **4**(1): 18-61.

Meves H, Simard JM, Watt DD (1986). Interactions of scorpion toxins with the sodium channel. *Annals of the New York Academy of Sciences* **479**: 113-132.

Meyer A, Biermann CH, Orti G (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **252**(1335): 231-236.

Miralles A, Esteban S, Sastre-Coll A, Moranta D, Asensio VJ, Garcia-Sevilla JA (2005). High-affinity binding of beta-carbolines to imidazoline I2B receptors and MAO-A in rat tissues: norharman blocks the effect of morphine withdrawal on DOPA/noradrenaline synthesis in the brain. *European journal of pharmacology* **518**(2-3): 234-242.

Molineux ML, McRory JE, McKay BE, Hamid J, Mehaffey WH, Rehak R, *et al.* (2006). Specific T-type calcium channel isoforms are associated with distinct burst phenotypes in deep cerebellar nuclear neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(14): 5555-5560.

Monteil A, Chemin J, Bourinet E, Mennessier G, Lory P, Nargeot J (2000a). Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *The Journal of biological chemistry* **275**(9): 6090-6100.

Monteil A, Chemin J, Leuranguer V, Altier C, Mennessier G, Bourinet E, *et al.* (2000b). Specific properties of T-type calcium channels generated by the human alpha 1I subunit. *The Journal of biological chemistry* **275**(22): 16530-16535.

Moosmang S, Haider N, Bruderl B, Welling A, Hofmann F (2006). Antihypertensive effects of the putative T-type calcium channel antagonist mibefradil are mediated by the L-type calcium channel Cav1.2. *Circulation research* **98**(1): 105-110.

Moshi MJ, Kagashe GA, Mbwambo ZH (2005). Plants used to treat epilepsy by Tanzanian traditional healers. *Journal of ethnopharmacology* **97**(2): 327-336.

Murbartian J, Arias JM, Lee JH, Gomora JC, Perez-Reyes E (2002). Alternative splicing of the rat Ca(v)3.3 T-type calcium channel gene produces variants with distinct functional properties(1). *FEBS letters* **528**(1-3): 272-278.

Nam SM, Choi JH, Yoo DY, Kim W, Jung HY, Kim JW, *et al.* (2014). Effects of curcumin (*Curcuma longa*) on learning and spatial memory as well as cell proliferation and neuroblast differentiation in adult and aged mice by upregulating brain-derived neurotrophic factor and CREB signaling. *Journal of medicinal food* **17**(6): 641-649.

Narusuye K, Kawai F, Matsuzaki K, Miyachi E (2005). Linalool suppresses voltage-gated currents in sensory neurons and cerebellar Purkinje cells. *Journal of neural transmission* **112**(2): 193-203.

Nelson MT, Todorovic SM, Perez-Reyes E (2006). The role of T-type calcium channels in epilepsy and pain. *Current pharmaceutical design* **12**(18): 2189-2197.

Nelson MT, Woo J, Kang HW, Vitko I, Barrett PQ, Perez-Reyes E, *et al.* (2007). Reducing agents sensitize C-type nociceptors by relieving high-affinity zinc inhibition of T-type calcium channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**(31): 8250-8260.

Newman DJ, Cragg GM (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products* **70**(3): 461-477.

Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR (2010). Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia* **51**(5): 883-890.

Nikonenko I, Bancila M, Bloc A, Muller D, Bijlenga P (2005). Inhibition of T-type calcium channels protects neurons from delayed ischemia-induced damage. *Molecular pharmacology* **68**(1): 84-89.

Nilius B (1986). Possible functional significance of a novel type of cardiac Ca channel. *Biomedica biochimica acta* **45**(8): K37-45.

Nilius B, Carbone E (2014). Amazing T-type calcium channels: updating functional properties in health and disease. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **466**(4): 623-626.

Nosal OV, Lyubanova OP, Naidenov VG, Shuba YM (2013). Complex modulation of Ca(v)3.1 T-type calcium channel by nickel. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **70**(9): 1653-1661.

Nsour WM, Lau CB, Wong IC (2000). Review on phytotherapy in epilepsy. *Seizure* **9**(2): 96-107.

Obejero-Paz CA, Gray IP, Jones SW (2008). Ni<sup>2+</sup> block of CaV3.1 (alpha1G) T-type calcium channels. *The Journal of general physiology* **132**(2): 239-250.

Ochs R, Gloor P, Quesney F, Ives J, Olivier A (1984). Does head-turning during a seizure have lateralizing or localizing significance? *Neurology* **34**(7): 884-890.

Olivera BM, Cruz LJ, de Santos V, LeCheminant GW, Griffin D, Zeikus R, *et al.* (1987). Neuronal calcium channel antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using omega-conotoxin from *Conus magus* venom. *Biochemistry* **26**(8): 2086-2090.

Orellana-Paucar AM, Serruys AS, Afrikanova T, Maes J, De Borggraeve W, Alen J, *et al.* (2012). Anticonvulsant activity of bisabolene sesquiterpenoids of *Curcuma longa* in zebrafish and mouse seizure models. *Epilepsy & behavior : E&B* **24**(1): 14-22.

Ozarowski M, Mikolajczak PL, Bogacz A, Gryszczynska A, Kujawska M, Jodynys-Liebert J, *et al.* (2013). *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia* **91**: 261-271.

Pandey AK, Li W, Yin X, Stocco DM, Grammas P, Wang X (2010). Blocking L-type calcium channels reduced the threshold of cAMP-induced steroidogenic acute regulatory gene expression in MA-10 mouse Leydig cells. *The Journal of endocrinology* **204**(1): 67-74.

Park SE, Kim S, Sapkota K, Kim SJ (2010a). Neuroprotective effect of *Rosmarinus officinalis* extract on human dopaminergic cell line, SH-SY5Y. *Cellular and molecular neurobiology* **30**(5): 759-767.

Park YG, Park HY, Lee CJ, Choi S, Jo S, Choi H, *et al.* (2010b). Ca(V)<sub>3.1</sub> is a tremor rhythm pacemaker in the inferior olive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(23): 10731-10736.

Parker CA, Anderson NJ, Robinson ES, Price R, Tyacke RJ, Husbands SM, *et al.* (2004). Harmane and harmalan are bioactive components of classical clonidine-displacing substance. *Biochemistry* **43**(51): 16385-16392.

Parker L, Howlett IC, Rusan ZM, Tanouye MA (2011). Seizure and epilepsy: studies of seizure disorders in *Drosophila*. *International review of neurobiology* **99**: 1-21.

Perez-Reyes E (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiological reviews* **83**(1): 117-161.

Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, *et al.* (1998). Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **391**(6670): 896-900.

Perez-Reyes E, Lee JH, Cribbs LL (1999). Molecular characterization of two members of the T-type calcium channel family. *Annals of the New York Academy of Sciences* **868**: 131-143.

Peterson RT, Macrae CA (2012). Systematic approaches to toxicology in the zebrafish. *Annual review of pharmacology and toxicology* **52**: 433-453.

Petrovska BB (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews* **6**(11): 1-5.

Pfeiffer M, Draguhn A, Meierkord H, Heinemann U (1996). Effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) agonists and GABA uptake inhibitors on pharmacosensitive and pharmacoresistant epileptiform activity in vitro. *British journal of pharmacology* **119**(3): 569-577.

Powell KL, Cain SM, Snutch TP, O'Brien TJ (2014). Low threshold T-type calcium channels as targets for novel epilepsy treatments. *British journal of clinical pharmacology* **77**(5): 729-739.

Rahn JJ, Bestman JE, Josey BJ, Inks ES, Stackley KD, Rogers CE, *et al.* (2014). Novel Vitamin K analogs suppress seizures in zebrafish and mouse models of epilepsy. *Neuroscience* **259**: 142-154.

Rajakulendran S, Graves TD, Labrum RW, Kotzadimitriou D, Eunson L, Davis MB, *et al.* (2010). Genetic and functional characterisation of the P/Q calcium channel in episodic ataxia with epilepsy. *The Journal of physiology* **588**(Pt 11): 1905-1913.

Re L, Barocci S, Sonnino S, Mencarelli A, Vivani C, Paolucci G, *et al.* (2000). Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* **42**(2): 177-182.

Reger TS, Yang ZQ, Schlegel KA, Shu Y, Mattern C, Cube R, *et al.* (2011). Pyridyl amides as potent inhibitors of T-type calcium channels. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **21**(6): 1692-1696.

Remy S, Beck H (2006). Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain : a journal of neurology* **129**(Pt 1): 18-35.

Reynolds ER, Stauffer EA, Feeney L, Rojahn E, Jacobs B, McKeever C (2004). Treatment with the antiepileptic drugs phenytoin and gabapentin ameliorates seizure and paralysis of *Drosophila* bang-sensitive mutants. *Journal of neurobiology* **58**(4): 503-513.

Reynolds MF, Sisk EC, Rasgon NL (2007). Valproate and neuroendocrine changes in relation to women treated for epilepsy and bipolar disorder: a review. *Current medicinal chemistry* **14**(26): 2799-2812.

Rieckhof GE, Yoshihara M, Guan Z, Littleton JT (2003). Presynaptic N-type calcium channels regulate synaptic growth. *The Journal of biological chemistry* **278**(42): 41099-41108.

Rocha J, Eduardo-Figueira M, Barateiro A, Fernandes A, Brites D, Bronze R, *et al.* (2014). Anti-inflammatory Effect of Rosmarinic Acid and an Extract of *Rosmarinus officinalis* in Rat Models of Local and Systemic Inflammation. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*.

Rommelspacher H, Nanz C, Borbe HO, Fehske KJ, Muller WE, Wollert U (1980). 1-Methyl-beta-carboline (harmaline), a potent endogenous inhibitor of benzodiazepine receptor binding. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **314**(1): 97-100.

Ross HR, Napier I, Connor M (2008). Inhibition of recombinant human T-type calcium channels by Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *The Journal of biological chemistry* **283**(23): 16124-16134.

Rossier MF, Python CP, Capponi AM, Schlegel W, Kwan CY, Vallotton MB (1993). Blocking T-type calcium channels with tetrandrine inhibits steroidogenesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* **132**(3): 1035-1043.

Sahu A, Rawal N, Pangburn MK (1999). Inhibition of complement by covalent attachment of rosmarinic acid to activated C3b. *Biochemical pharmacology* **57**(12): 1439-1446.

Salvi J, Bertaso F, Mausset-Bonnefont AL, Metz A, Lemmers C, Ango F, *et al.* (2014). RNAi silencing of P/Q-type calcium channels in Purkinje neurons of adult mouse leads to episodic ataxia type 2. *Neurobiology of disease* **68**: 47-56.

Santi CM, Cayabyab FS, Sutton KG, McRory JE, Mezeyova J, Hamming KS, *et al.* (2002). Differential inhibition of T-type calcium channels by neuroleptics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**(2): 396-403.

Santoni G, Santoni M, Nabissi M (2012). Functional role of T-type calcium channels in tumour growth and progression: prospective in cancer therapy. *British journal of pharmacology* **166**(4): 1244-1246.

Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibanez E, Senorans FJ, Reglero G (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of food protection* **68**(4): 790-795.

Schaffer M, Schaffer PM, Zidan J, Bar Sela G (2011). Curcuma as a functional food in the control of cancer and inflammation. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **14**(6): 588-597.

Schiff PL, Jr. (1991). Bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Journal of natural products* **54**(3): 645-749.

Schmidt D (2012). Is antiepileptogenesis a realistic goal in clinical trials? Concerns and new horizons. *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape* **14**(2): 105-113.

Schmidt D, Schachter SC (2014). Drug treatment of epilepsy in adults. *Bmj* **348**: g254.

Schuwald AM, Noldner M, Wilmes T, Klugbauer N, Leuner K, Muller WE (2013). Lavender oil-potent anxiolytic properties via modulating voltage dependent calcium channels. *PloS one* **8**(4): e59998.

Sen T, Samanta SK (2014). Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **147**: 59-110.

Seo H, Li HY, Perez-Reyes E, Lee JH (2013). Effects of eugenol on T-type Ca<sup>2+</sup> channel isoforms. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **347**(2): 310-317.

Serra J, Duan WR, Locke C, Sola R, Liu W, Nothaft W (2015). Effects of a T-type calcium channel blocker, ABT-639, on spontaneous activity in C-nociceptors in patients with painful diabetic neuropathy: a randomized controlled trial. *Pain*.

Shen FY, Chen ZY, Zhong W, Ma LQ, Chen C, Yang ZJ, *et al.* (2015). Alleviation of neuropathic pain by regulating T-type calcium channels in rat anterior cingulate cortex. *Molecular pain* **11**: 7.

Shipe WD, Barrow JC, Yang ZQ, Lindsley CW, Yang FV, Schlegel KA, *et al.* (2008). Design, synthesis, and evaluation of a novel 4-aminomethyl-4-fluoropiperidine as a T-type Ca<sup>2+</sup> channel antagonist. *Journal of medicinal chemistry* **51**(13): 3692-3695.

Shorvon SD (2009). Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the first 50 years, 1909-1958. *Epilepsia* **50 Suppl 3**: 69-92.

Sidach SS, Mintz IM (2002). Kurtoxin, a gating modifier of neuronal high- and low-threshold Ca channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**(6): 2023-2034.

Song I, Kim D, Choi S, Sun M, Kim Y, Shin HS (2004). Role of the alpha1G T-type calcium channel in spontaneous absence seizures in mutant mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**(22): 5249-5257.

Song J, Tanouye MA (2008). From bench to drug: human seizure modeling using *Drosophila*. *Progress in neurobiology* **84**(2): 182-191.

Sorensen AT, Kokaia M (2013). Novel approaches to epilepsy treatment. *Epilepsia* **54**(1): 1-10.

Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **83**(1): 13-34.

Splawski I, Timothy KW, Decher N, Kumar P, Sachse FB, Beggs AH, *et al.* (2005). Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(23): 8089-8096; discussion 8086-8088.

Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, *et al.* (2004). Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* **119**(1): 19-31.

- Splawski I, Yoo DS, Stotz SC, Cherry A, Clapham DE, Keating MT (2006). CACNA1H mutations in autism spectrum disorders. *The Journal of biological chemistry* **281**(31): 22085-22091.
- Splettstoesser F, Bonnet U, Wiemann M, Bingmann D, Busselberg D (2005). Modulation of voltage-gated channel currents by harmaline and harmane. *British journal of pharmacology* **144**(1): 52-58.
- Steriade M (2005). Sleep, epilepsy and thalamic reticular inhibitory neurons. *Trends in neurosciences* **28**(6): 317-324.
- Stewart AM, Desmond D, Kyzar E, Gaikwad S, Roth A, Riehl R, *et al.* (2012). Perspectives of zebrafish models of epilepsy: what, how and where next? *Brain research bulletin* **87**(2-3): 135-143.
- Sucher NJ, Carles MC (2015). A pharmacological basis of herbal medicines for epilepsy. *Epilepsy & behavior : E&B*.
- Surges R, Sander JW (2012). Sudden unexpected death in epilepsy: mechanisms, prevalence, and prevention. *Current opinion in neurology* **25**(2): 201-207.
- Tagarelli G, Tagarelli A, Liguori M, Piro A (2013). Treating epilepsy in Italy between XIX and XX century. *Journal of ethnopharmacology* **145**(2): 608-613.
- Takaki I, Bersani-Amado LE, Vendruscolo A, Sartoretto SM, Diniz SP, Bersani-Amado CA, *et al.* (2008). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of Rosmarinus officinalis L. essential oil in experimental animal models. *Journal of medicinal food* **11**(4): 741-746.
- Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, Daud A, Perez-Reyes E, Bayliss DA (1999). Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**(6): 1895-1911.
- Talley EM, Solorzano G, Depaulis A, Perez-Reyes E, Bayliss DA (2000). Low-voltage-activated calcium channel subunit expression in a genetic model of absence epilepsy in the rat. *Brain research. Molecular brain research* **75**(1): 159-165.
- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, *et al.* (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**(6128): 313-318.

Tang CM, Presser F, Morad M (1988). Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science* **240**(4849): 213-215.

Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V (2011). T-type voltage-gated calcium channels as targets for the development of novel pain therapies. *British journal of pharmacology* **163**(3): 484-495.

Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V, Meyenburg A, Mennerick S, Perez-Reyes E, Romano C, *et al.* (2001). Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors. *Neuron* **31**(1): 75-85.

Todorovic SM, Lingle CJ (1998). Pharmacological properties of T-type Ca<sup>2+</sup> current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *Journal of neurophysiology* **79**(1): 240-252.

Todorovic SM, Perez-Reyes E, Lingle CJ (2000). Anticonvulsants but not general anesthetics have differential blocking effects on different T-type current variants. *Molecular pharmacology* **58**(1): 98-108.

Traboulsie A, Chemin J, Chevalier M, Quignard JF, Nargeot J, Lory P (2007). Subunit-specific modulation of T-type calcium channels by zinc. *The Journal of physiology* **578**(Pt 1): 159-171.

Traboulsie A, Chemin J, Kupfer E, Nargeot J, Lory P (2006). T-type calcium channels are inhibited by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Molecular pharmacology* **69**(6): 1963-1968.

Treiman DM (2001). GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* **42 Suppl 3**: 8-12.

Tringham E, Powell KL, Cain SM, Kuplast K, Mezeyova J, Weerapura M, *et al.* (2012). T-type calcium channel blockers that attenuate thalamic burst firing and suppress absence seizures. *Science translational medicine* **4**(121): 121ra119.

Tsakiridou E, Bertollini L, de Curtis M, Avanzini G, Pape HC (1995). Selective increase in T-type calcium conductance of reticular thalamic neurons in a rat model of absence epilepsy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **15**(4): 3110-3117.

Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends in neurosciences* **11**(10): 431-438.

Uebele VN, Nuss CE, Fox SV, Garson SL, Cristescu R, Doran SM, *et al.* (2009). Positive allosteric interaction of structurally diverse T-type calcium channel antagonists. *Cell biochemistry and biophysics* **55**(2): 81-93.

Veldman MB, Lin S (2008). Zebrafish as a developmental model organism for pediatric research. *Pediatric research* **64**(5): 470-476.

Wang G, Lemos JR (1995). Tetrandrine: a new ligand to block voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> and Ca(+)-activated K<sup>+</sup> channels. *Life sciences* **56**(5): 295-306.

Watterson JM, Watson DG, Meyer EM, Lenox RH (2002). A role for protein kinase C and its substrates in the action of valproic acid in the brain: implications for neural plasticity. *Brain research* **934**(1): 69-80.

Weiss JH, Sensi SL, Koh JY (2000). Zn(2+): a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends in pharmacological sciences* **21**(10): 395-401.

Welsby PJ, Wang H, Wolfe JT, Colbran RJ, Johnson ML, Barrett PQ (2003). A mechanism for the direct regulation of T-type calcium channels by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(31): 10116-10121.

Wheeler DB, Randall A, Sather WA, Tsien RW (1995). Neuronal calcium channels encoded by the alpha 1A subunit and their contribution to excitatory synaptic transmission in the CNS. *Progress in brain research* **105**: 65-78.

White R, Rose K, Zon L (2013). Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. *Nature reviews. Cancer* **13**(9): 624-636.

Wiegand H, Meis S, Gotzsch U (1990). Inhibition by tetrandrine of calcium currents at mouse motor nerve endings. *Brain research* **524**(1): 112-118.

Williams ME, Feldman DH, McCue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB, *et al.* (1992). Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* **8**(1): 71-84.

Williams SN, Locke CJ, Braden AL, Caldwell KA, Caldwell GA (2004). Epileptic-like convulsions associated with LIS-1 in the cytoskeletal control of neurotransmitter signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Human molecular genetics* **13**(18): 2043-2059.

Wolfe JT, Wang H, Howard J, Garrison JC, Barrett PQ (2003). T-type calcium channel regulation by specific G-protein betagamma subunits. *Nature* **424**(6945): 209-213.

Won J, Hur YG, Hur EM, Park SH, Kang MA, Choi Y, *et al.* (2003). Rosmarinic acid inhibits TCR-induced T cell activation and proliferation in an Lck-dependent manner. *European journal of immunology* **33**(4): 870-879.

Xiao C, Dai H, Liu H, Wang Y, Tang H (2008). Revealing the metabonomic variation of rosemary extracts using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Journal of agricultural and food chemistry* **56**(21): 10142-10153.

Yang SN, Berggren PO (2006). The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocrine reviews* **27**(6): 621-676.

Yang ZQ, Barrow JC, Shipe WD, Schlegel KA, Shu Y, Yang FV, *et al.* (2008). Discovery of 1,4-substituted piperidines as potent and selective inhibitors of T-type calcium channels. *Journal of medicinal chemistry* **51**(20): 6471-6477.

Yu MH, Choi JH, Chae IG, Im HG, Yang SA, More K, *et al.* (2013). Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. *Food chemistry* **136**(2): 1047-1054.

Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Gutkind JS, Manji HK, Chen G (2001). The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. *The Journal of biological chemistry* **276**(34): 31674-31683.

Yuen ES, Troconiz IF (2015). Can pentylenetetrazole and maximal electroshock rodent seizure models quantitatively predict antiepileptic efficacy in humans? *Seizure* **24**: 21-27.

Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP (1997). Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit. *Nature* **385**(6615): 442-446.

Zamponi GW, Lory P, Perez-Reyes E (2010). Role of voltage-gated calcium channels in epilepsy. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **460**(2): 395-403.

Zhan X, Graf WM (2012). Harmaline attenuates voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> currents in neurons of the inferior olive. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* **15**(5): 657-668.

Zhang L, Geng Y, Duan W, Wang D, Fu M, Wang X (2009). Ionic liquid-based ultrasound-assisted extraction of fangchinoline and tetrandrine from *Stephaniae tetrandrae*. *Journal of separation science* **32**(20): 3550-3554.

Ziegler D, Duan WR, An G, Thomas JW, Nothaft W (2015). A randomized double-blind, placebo- and active-controlled study of T-type calcium channel blocker ABT-639 in diabetic patients with peripheral neuropathic pain. *Pain*.

## VII. Curriculum vitae

### Chaymae El Alaoui

---



#### Chaymae El Alaoui

Née le 16 Février 1987  
Résidence Prestige El Oulfa

Imm. 3 GH12, N°18  
Casablanca

Tél : +212667189124

[Chaymae.elalaoui@gmail.com](mailto:Chaymae.elalaoui@gmail.com)

---

## Curriculum vitae

### Formation

---

- 2011-2015** Doctorante en Neurosciences et Neuropharmacologie, Laboratoire de Neurosciences/ Biologie des canaux ioniques, Institut de génomique fonctionnelle, CNRS, Faculté de Médecine, Université de Montpellier, France et Laboratoire de Neurosciences, Physiopathologies intégrées et substances naturelles, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan II-Casablanca, Maroc.
- 2013-2014** Diplôme du 3<sup>ème</sup> cycle en management des affaires, UFR Administration économique et sociale, Université de Montpellier, France.
- 2009-2011** Ingénieur d'état en Biotechnologie médicale, Faculté des sciences et d'ingénierie, Université Al Akhawayn, Ifrane, Maroc.
- 2005-2009** Licence en Sciences de la Vie, Faculté des Sciences, Université Abdelmalek Essaadi, Tétouan, Maroc et Faculté de sciences et techniques, Université de Montpellier, France. Mobilité internationale.
- 2002-2005** Baccalauréat: Sciences Expérimentales. Mention: Bien

## Expérience professionnelle

---

- 2011-2015** Laboratoire de Neurosciences/ Biologie des canaux ioniques, IGF, CNRS, Montpellier, France et Laboratoire de Neurosciences, Physiopathologies intégrées et substances naturelles, FSTM, Maroc: Etude des effets modulateurs des plantes médicinales méditerranéennes sur les canaux calciques de type T et l'évaluation de leurs effets anticonvulsivants et antiépileptiques
- 2012 (1 mois)** Laboratoire de Physiologie Végétale et Biotechnologie, Institut National de Recherche Agronomique, Agadir : Maitrise des techniques d'extractions de plantes médicinales.
- 2011 (6 mois)** Centre des Sciences Cardiovasculaires, Albany Medical College, New York, USA. Régulation de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires par la Cytoglobine en condition d'hypoxie.
- 2010 (2 mois)** Laboratoire de Bactériologie Moléculaire, Département de recherche, Institut Pasteur de Maroc, Casablanca, Maroc. Caractérisation des bêta-lactamases à spectre étendu chez *Klebsiella pneumoniae* d'origine communautaire.
- 2009 (1 mois)** Laboratoire des Maladies Vectorielles, Département de recherche, Institut Pasteur de Maroc, Casablanca, Maroc: Détermination du repas de sang chez les moustiques par techniques Immuno-enzymatiques et biomoléculaires.
- 2007 (1 mois)** Laboratoire de contrôle de qualité, COLAINORD: Chargée des analyses physico-chimiques et microbiologiques du lait et dérivés.

## Travaux scientifiques

---

### Communications orales

1. 2ème édition du Workshop "Health and ion channel signaling mechanisms". Du 25 au 26 Novembre, à La FST Mohammedia. T-type calcium channels are inhibited by *Peganum harmala* and its  $\beta$ -carboline alkaloid harmaline: **Chaymae El Alaoui**, Jean Chemin, Taoufiq Fechtali, Philippe Lory.
2. 1ère Edition des Journées Doctoriales de La FST Mohammedia 16 Juin 2015 : Le Jeune Chercheur : Source de Capital immatériel et Acteur de Développement. T-type Ca<sup>2+</sup> Channels modulation by Lavender and Rosemary extracts": **Chaymae El Alaoui**, Jean Chemin, Taoufiq Fechtali, Philippe Lory.
3. Colloque internationale de Santé, environnement et entreprise, Mohammedia, Maroc, 21 et 22 Novembre 2015. Study of the modulation of T-type calcium channels by medicinal plant extracts and evaluation of their anticonvulsant activity in zebrafish model: **Chaymae El Alaoui**, Jean Chemin, Adèle Faucherre, Christian Jopling, Taoufiq Fechtali, Philippe Lory

4. Journée des Neurosciences, Montferrier sur Lez, France, 29 Novembre 2013. Study of the anticonvulsant and antiepileptic activities of medicinal plant extracts in a zebrafish model and their effect on T-type calcium channel activity: **Chaymae El Alaoui**, Jean Chemin, Adèle Faucherre, Christian Jopling, Taoufiq Fechtali, Philippe Lory

### Communication affichées

1. Journées de l'école doctorale CBS2 de Montpellier du 15 au 17 Mai 2013 : The effect of Mediterranean plant extracts on the modulation of T type calcium channels and the evaluation of their anticonvulsant and antiepileptic activity **C. El Alaoui**, A Faucherre, C. Jopling, T. Fechtali, P. Lory
2. 8th European Zebrafish Meeting in Barcelona from 9th to 13th July 2013: Evaluation of anticonvulsant activity of Mediterranean plant extracts in Zebrafish seizure model - **C. El Alaoui**, A Faucherre, C. Jopling, T. Fechtali, P. Lory
3. 24th ion channel meeting in Ile d'Oléron from 15th to 18th September 2013: Prix du meilleur Poster: Study of the anticonvulsant and antiepileptic activities of medicinal plant extracts in Zebrafish-seizure Model and their effect on T-type calcium channel activity. **C. El Alaoui**, A Faucherre, C. Jopling, T. Fechtali, P. Lory

### Publications scientifiques

1. Modulation of T-type calcium channels by Lavander and Rosemary Extracts. **Chaymae El Alaoui**<sup>1, 2</sup>, Jean Chemin<sup>1</sup>, Taoufiq Fechtali<sup>2</sup>, Philippe Lory<sup>1</sup>, Plos One, soumis : Avis favorable, ISSN · 1932-6203.
2. Inhibition of Voltage-Gated Calcium Channels by Natural Alkaloids: Pharmacological and Therapeutic Effects: **Chaymae El Alaoui**, Zineb Choukairi, Laila Lamri, Fouad Berrada, Taoufiq Fechtali. I.J. Sci and Res. ISSN (Online): 2319-7064. Index Copernicus Value: 6.14 | Impact Factor: 4.438. Volume 4 Issue 9, September 2015, 1289-1294
3. Parkinson Disease Research: Distinct Animal Models and Therapeutic Approach: Zineb Choukairi , Laila Lamri, **Chaymae El Alaoui**, Tahar Hazzaz , Taoufiq Fechtali. I.J. Sci and Res. ISSN (Online): 2319-7064. Index Copernicus Value: 6.14 | Impact Factor: 4.438, Volume 4 Issue 9, September 2015, 2319-7064.
4. Trois articles en cours de préparation avec Dr. Philippe Lory, Dr. Taoufiq Fechtali et Dr. David Jourdeuil.

### Organisation des manifestations scientifiques

---

- 2ème édition du Workshop "Health and ion channel signaling mechanisms". Du 25 au 26 Novembre 2015, à La FST Mohammedia.

- 1ère Edition des Journées Doctoriales de La FST Mohammedia 16 Juin 2015. Le Jeune Chercheur : Source de Capital immatériel et Acteur de Développement.
- Colloque internationale de Santé, environnement et entreprise, Mohammedia, Maroc, 21 et 22 Novembre 2014
- 1ère édition du Workshop “Health and ion channel signaling mechanisms”. Du 21 au 22 Novembre 2014.
- 1<sup>st</sup> international meeting on Ion Channel Signaling Mechanisms : From basic science to clinical application » Du 31 Octobre au 4 Novembre 2011 à Marrakech, Maroc.
- Journée de la terre “The earth day”, April 22<sup>nd</sup> , 2010, Al Akhawayn University, Ifrane.

## Prix et distinctions

---

<b>11-2013</b>	Prix de la meilleure communication affichée, 24 <sup>ème</sup> colloque des canaux ioniques, Ile D’Oléron, France
<b>05-2013</b>	Prix de la 2 <sup>ème</sup> meilleure communication affichée, Journée de l’école doctorale CBS2 de Montpellier, Montpellier, France.
<b>12-2012</b>	Lauréate du Programme L’Oréal-UNESCO pour la femme et la science
<b>11-2012</b>	Bourse d’excellence Erasmus Mundus Averroès 4 pour le Cycle doctoral
<b>01-2011</b>	Bourse de mérite de l’Albany Medical college, New York, USA (Projet de fin d’étude)
<b>01-2010</b>	Bourse de mérite de l’Université Al Akhawayn (Master en Biotechnologie Médical)
<b>09-2008</b>	Bourse de mérite Erasmus Mundus Averroès (Licence)

## Langues

---

Arabe : Langue maternelle

Anglais : Très bon (TOEFL 591)

Français : Très bon

Espagnol : Bon

## **Autres activités**

---

- Attaché temporaire d'enseignement : Anglais Technique, FSTM, Université Hassan II, Casablanca
- Membre de l'association CBS2 - Ecole doctorale de L'Université de Montpellier.
- Membre de l'association des étudiants Erasmus Mundus
- Membre de la société française de Neurosciences et de la fédération des sociétés européennes des neurosciences (FENS)
- Membre de Al Akhwayn Alumni-Association