

DONNÉES RÉCENTES SUR LES NEUROTOXINES DE SCORPTIONS

H. ROCHAT

Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine,
Secteur Nord, Boulevard Pierre Dramard, 13326
Marseille Cedex 3.

1. INTRODUCTION

Les premières études sur les venins de scorpions ont été essentiellement motivées par l'importance médicale des piqûres de ces animaux dans plusieurs régions du monde telles l'Afrique du Nord et du Nord-Est, le Moyen Orient et le Mexique. Il était normal que les premiers venins analysés aient été ceux de quelques espèces pouvant être mortelles pour l'homme. Considérant, d'une part, la quantité limitée de venin qu'un scorpion peut injecter et, d'autre part, le tableau clinique dramatique qui peut résulter d'une seule piqûre de l'animal, on en vint rapidement à penser que cette sécrétion devait contenir des principes d'une très grande activité biologique dont la purification était hautement souhaitable afin que l'on pût déterminer leur structure chimique et élucider leur mode d'action. C'est ainsi qu'une nouvelle famille de protéines neurotoxiques allait être caractérisée (41). Plus le nombre de données sur ces substances va s'accumulant, meilleur est l'usage que l'on peut en faire en tant qu'outils spécifiques en neurobiologie.

2. PURIFICATION ET STRUCTURE

Après les premiers essais infructueux (2, 34, 53) en vue d'isoler, à partir d'homogénats de telsons, les principes actifs des venins de scorpions, des améliorations successives, basées principalement sur la mise en œuvre de la chromatographie sur colonne d'échangeurs d'ions ou de tamis moléculaires, nous ont permis finalement de mettre au point une méthode générale de purification des protéines neurotoxiques de faible masse molaire (28, 29, 31). Tôt dans le cours de nos études, nous avons trouvé que les composés responsables de la mortalité de la souris (qui seront appelés dans la suite toxines anti-mammifères, par comparaison avec les toxines anti-insectes et les toxines anti-crustacés) étaient en effet des substances basiques situées, du point de vue de leur structure, à la frontière entre les peptides et les protéines (26, 30, 31, 32, 33). L'isolement, à partir du venin d'*Androctonus australis Hector*, de deux toxines anti-mammifères (37) allait nous permettre de déterminer, dans un premier temps, leur masse molaire par ultracentrifugation (toxine I : 7300, toxine II : 7700) et de confronter les valeurs obtenues avec celles correspondant aux masses molaires minimum calculées à partir des compositions en acides aminés (toxine I : 6922, toxine II : 7249).

La méthode générale de purification des toxines de scorpion comporte principalement les étapes suivantes :

- extraction par l'eau distillée en vue d'éliminer les mucoprotéines qui pourraient gêner la suite des opérations d'isolement et empêcher ainsi l'obtention de toxines pures avec un bon rendement; lorsque les mucoprotéines sont présentes en très grande quantité, l'extraction par l'acétone ou la filtration sur gel en présence d'acide acétique 0,5 N sont recommandées en vue de leur élimination (27, 28) ;

- la filtration moléculaire, avec recyclage, sur gel de Sephadex G-50 (tampon à l'acétate d'ammonium 0,1 M, pH 8,6) qui permet la séparation d'un grand nombre de fractions; le tampon acétate d'ammonium a été choisi du fait de sa volatilité qui permet la concentration des fractions par lyophilisation (30). Par ailleurs, il constitue un milieu défavorable à la croissance des micro-organismes, spécialement à pH alcalin.

- la chromatographie par échange d'ions dans les conditions d'équilibre (c'est-à-dire avec utilisation de la même solution tampon du début à la fin de l'expérience), successivement avec des échangeurs d'anions et des échangeurs de cations, conduisant à l'isolement et à la purification finale de nombreuses protéines neurotoxiques actives soit contre les mammifères, soit contre les insectes, soit contre les crustacés. Une seule fois, nous avons dû utiliser une élution avec gradient pour obtenir à l'état pur, à partir du venin d'*Androctonus australis* Hector, une toxine anti-crustacés (55).

La méthode, habituellement appliquée aux venins, a été aussi employée avec succès en vue de la purification, à partir d'homogénats de telsons desséchés, des composés toxiques principaux de *Buthus occitanus tunetanus* et de *Centruroides suffusus suffusus* (16).

Les venins de cinq scorpions dangereux de la sous-famille des *Buthinae* (famille des *Buthidae*) ont été soumis à la procédure de purification : *Androctonus australis* Hector (AaH), *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Amm), *Buthus occitanus parisi* (Bop), *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) et *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Lqq). A partir de ces venins, trente et une toxines anti-mammifères, deux toxines anti-insectes et une toxine anti-crustacés ont été purifiées et caractérisées au moins par leur toxicité spécifique et leur composition en amino-acides. On peut trouver les données correspondantes, pour vingt et une de ces protéines, dans une revue récente (56). Dans un autre laboratoire (54) une toxine anti-insectes a été isolée à partir du venin de *Buthus epeus* (Be). Les venins de deux scorpions du genre *Centruroides* (espèces d'Amérique du Nord et d'Amérique Centrale, sous famille des *Centrurinae*, famille des *Buthidae*) ont été bien étudiés :

- le venin de *Centruroides suffusus suffusus* (Css) qui a été purifié dans notre laboratoire et a fourni deux toxines anti-mammifères (16) ;

- le venin de *Centruroides sculpturatus* Ewing (CsE) à partir duquel une toxine active contre les poulets et trois toxines actives contre les insectes ont été isolées (3,4). Enfin, le venin de *Tityus serrulatus* (Ts), un scorpion d'Amérique du Sud appartenant à la sous famille des *Tityinae* (famille des *Buthidae*) a fait l'objet des travaux de deux groupes indépendants. Diniz (15), collectant le venin d'animaux vivant dans une aire très délimitée de l'Etat de Minas Gerais, au Brésil, a purifié une toxine anti-mammifères connue dans la littérature de langue anglaise comme étant la "Tityus toxin" (TsTx). Possani et coll. (36), travaillant sur lot de venin de l'Institut Butantan (Sao Paulo, Brésil) ont isolé une toxine anti-mammifère appelée toxine γ . Compte tenu des compositions en amino-acides publiées, la TsTx et la toxine γ sont des protéines différentes. La toxine γ contient un résidu de méthionine : cet amino-acide est absent de toutes les autres toxines anti-mammifères purifiées à ce jour.

La détermination des séquences d'acides-amino des toxines de scorpions a suscité beaucoup d'intérêt au cours des dernières années. L'état actuel de nos connaissances dans ce domaine est présenté dans la Figure 1 qui concerne vingt huit des quarante quatre toxines qui ont été isolées à partir des venins de scorpions et caractérisées au niveau chimique (composition en amino-acides). Jusqu'ici

	9 8 7 6 5 4 3 2
AaH I	-KEDGYIVTPN-NCVYECVFP-----CDGLCKIN-GGSSGGSC-FLVPSGLACWC-KDLP-DNVPKDTSRK---CT
AaH II	-KEDGYIVTPN-NCVYECVFP-----CDGLCKIN-GGSSGGSC-FLVPSGLACWC-KDLP-DNVPKDTSRK---CT
AaH III	-KEDGYIVTPN-NCVYECVFP-----CDGLCKIN-GGSSGGSC-FLVPSGLACWC-KDLP-DNVPKDTSRK---CTR
AaH IIIA	-VLDGYIVWTK-NCVYECVFP-----CDGLCKIN-GAKSSC-COPLIPSGLACWC-VALP-DNVPKDPSTYK--CES
AaH IIIB	-GRDGYIVWTK-NCVYECVFP-----CDGLCK....
AaH II	-VKDGYIVDDV-NCVYECVFP-----NAYCNEECTNL-KGESC-YCQWASPYGNACUCYK-LP-DHVRTKGPGR---CH-
Lqq V	-LKDGYIVDDK-NCVYECVFP-----NAYCNEECKNL-KGESC-YCQWASPYGNACUCYK-LP-DRVSIKEKGR---CN
Amm V	-LMDGYIIEBL-NCVYECVFP-----NAYCDECKNK-KGESC-YCQWASPYGNACWCYK-LP-DRVSIKEKGR---CN
Bot III	-VKDGYIVDDR-NCVYECVFP-----NAYCNEEC...
Bot XI	-LKDGYIVDDR-NCVYECVFP-----NAYCNEECKNL-KGE..
Lqq IV	-GRDAYIAADK-NCVYTCGS-----NSYCNEECTNL-GA...
Amm VI	-DARDGYIVQPH-NCVYECVFP-----NAYC...
Bot II	-GRDAYIAQPE-NCVYECVFP-----NSYCNLDLCTKN-GAKSSC-YCQWLGREGNACUCYK-LP-DKVPRIIEGK---CHF
Bot I	-GRDAYIAQPE-NCVYECVFP-----NSYCNLDLCTKN-GAKSSC-YCQWLGREGNACWC-KDLP-DNVPRIIEGK---CHF
Vot VIII	-VRDAYIAQNY-NCVYTCFK-----NSYCNLDLCTKN-GAKSSC-YC...
Lpp III	-VRDAYIAQNY-NCVYECVFP-----NSYCNLDL...
Bop I	-GRGVYIAIHA-NCAY...
Bop II	-GRDAYIAIDX-NCAYXCAL---XXYCN...
Css II	--KEGYLVEKSTGCKYECLKLGDN DYCLRECKQYGGKSSGGYCYAF-----ACQC-THLY-EQAVVWPLPNKT-CN-
Css I	--KEGYLVEKSTGCKYECLKLGDN DYCL...
CsE I	--KDGYLVEK-TGCKKTCYKLGENDFCNRECKVKHIGGSYGYCYAF-----GCYC-EGLP-DSTQTWPLPNK--CT
Ts Y	--KEGYLMDH-EGCKLSCF-IAPSGYCGREGI....
CsE v1	--KEGYLVKSDGCKYDCFWLGKNEHNTCECKAKNQGGSYGYCYAF-----ACWC-EGLP-ESTPTYPLPNK--CS-
CsE v2	--KEGYLVNRSTGCKYKGLKLGNEGNTCECKAKNQGGSYGYCYAF-----ACWC-EGLP-ESTPTYPLPNK--CSS
CsE v3	--KEGYLVKSDGCKYKGLKLGNEGNTCECKAKNQGGSYGYCYAF-----ACWC-EGLP-ESTPTYPLPNK--CS
AaH IT	-KKNGYAVDSS-GKAPECLL---SNYCNNQCTKV-HYADKGYCCLL-----SCYCFGLNDDKKVLEISDTRKSYCDTTIIN
Be IT	MCMPCFTTRPDMAQQCRACCKGRGKCFGPQCLCGYD
Amm IT	-CGPCFTTDPYTESKCATCCGGGRGKCVGPQCLCNRI

figure 1 : Séquences d'acides-amino des toxines de scorpions.

Légende de la Figure 1 : Séquences d'acides-amino des toxines de scorpions.

AaH I, I', I'', II et III : toxines I, I', I'', II et III d'*Androctonus australis Hector* actives contre les mammifères (39, 40, 41, 42, 43, Martin, M.F. et Kopeyan, C., communication personnelle) ; AaH IT : toxine du même scorpion active contre les insectes (57, Martinez, G., communication personnelle).

Amm III, V et VI : toxines III, V et VI d'*Androctonus mauretanicus mauretanicus* actives contre les mammifères ; Amm IT : toxine du même scorpion active contre les insectes (Rosso, J.P., communication personnelle).

Be IT : toxine de *Buthus epeus* active contre les insectes (54).

Bop I et III : toxines I et III de *Buthus occitanus parisi* actives contre les mammifères (39).

Bot I, II, III, VIII et XI : toxines I, II, III, VIII et XI de *Buthus occitanus tunetanus* actives contre les mammifères (39, 41, Grégoire, J., communication personnelle).

CsE I : toxine I de *Centruroides sculpturatus* Ewing active contre le poulet (4) ; CsE v1, v2 et v3 : variants toxiques du même venin actifs contre les insectes (3).

Css I et II : toxines I et II de *Centruroides suffusus suffusus* actives contre les mammifères (16, 39).

Lqg III, IV et V : toxines III, IV et V de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* actives contre les mammifères (21, 39, 41, Kopeyan, C., communication personnelle).

Ts Y : toxine Y de *Fitya serrulatus* active contre les mammifères (36).

Afin d'obtenir le degré maximum d'homologie, les séquences des toxines actives contre les mammifères ont été alignées en considérant comme invariables les résidus de demi-cystine et des délétions (-) ont été arbitrairement introduites. Dans le cas de AaH IT, d'une part, CsE v1, v2 et v3 d'autre part, sept des huit résidus de demi-cystine ont été alignés. Pour finir, Be IT et Amm IT, deux toxines "courtes" actives contre les insectes, ont été comparées.

Les séquences déduites par comparaison sont soulignées.

La notation à une seule lettre pour la représentation des séquences d'acides-amino est utilisée conformément à (1968) : Eur.J. Biochem., 5:151-153:

A : alanine	I : isoleucine	R : arginine
C : demi-cystine	K : lysine	S : sérine
D : acide aspartique	L : leucine	T : thréonine
E : acide glutamique	M : méthionine	V : valine
F : phénylalanine	N : asparagine	W : tryptophane
G : glycine	P : proline	Y : tyrosine
H : histidine	Q : glutamine.	

quinze séquences complètes d'acides-amino ont été déterminées (en outre, on pourra voir, sur la même figure, les résultats partiels concernant treize autres toxines).

Il apparaît que les toxines de scorpions sont des protéines de faible masse molaire, composées d'une seule chaîne polypeptidique réticulée par quatre ponts disulfures. C'est seulement dans les cas des toxines AaH I et AaH II que des valeurs de masses molaires, voisines de 7 000, ont pu être obtenues par ultracentrifugation (37). Pour toutes les autres toxines, qui ont été éluées des colonnes de Sephadex G-50 dans un volume plus grand que le "volume mort" (comme ce fut le cas pour les toxines AaH I et AaH II), la masse molaire chimique minimum, calculée à partir de la composition en acides-amino, était considérée comme la valeur réelle de la masse molaire. Ce raisonnement n'a encore jamais été démenti par les déterminations des séquences d'acides-amino. Dans le cas de la toxine AaH II, la structure covalente complète est connue, étant donné que Kopeyan et coll. (20) ont publié les positions des ponts disulfures (Figure 2). Deux ponts disulfures de la toxine AaH I ont été trouvés dans des positions identiques à celles existant dans la toxine AaH II (40) : 12 et 62, 24 et 46 (les positions 24, 46 et 62 dans la toxine AaH I sont homologues des positions 26, 47 et 63 dans la toxine AaH II : voir Figure 1). On peut, en effet, penser raisonnablement que, dans toutes les toxines anti-mammifères, les résidus de demi cystine sont associés deux à deux de la même façon. La présence de ces quatre ponts disulfures pourrait être responsable de la grande stabilité des toxines de scorpions : dans le cas de la toxine AaH II, on a trouvé que, entre pH 4 et pH 9, l'une des configurations de la molécule (parmi les quatre possibles) était prédominante et très stable vis-à-vis de la dénaturation par la chaleur et du traitement par l'urée 9,5 M. Ceci est dû à son haut degré de structure ordonnée (12).

Lorsqu'on considère les toxines anti-mammifères, le pourcentage maximum d'homologies entre les structures primaires est obtenu lorsque les résidus d'acides-amino sont alignés en respectant la position des ponts disulfures (Figure 1). Il a été montré précédemment que cette nouvelle famille de protéines pouvait être divisée en plusieurs groupes en tenant compte de certaines ressemblances de structure (41, 56), mais au fur et à mesure que le nombre des séquences connues augmente, celui des groupes augmente également. A l'heure actuelle, il est possible de définir cinq groupes : 1 - le groupe de la toxine AaH I qui comprendrait, outre cette dernière considérée comme référence, les toxines AaH I', AaH I'', AaH III et Amm III, avec une séquence typique -proline-proline- dans les positions 20 et 21 et une extrémité C- terminale avec un carboxyle libre ; 2 - le groupe de la toxine AaH II qui comprendrait, outre la toxine de référence, les toxines Lqq V, Amm V, Bot III et Bot XI, dont l'extrémité C- terminale est amidée ; 3 - le groupe de la toxine Bot I qui comprendrait, outre la toxine de référence, les toxines Bot II, Bot VIII, Lqq III, Bop I et Bop II, dont l'extrémité C-terminale est amidée, comme c'est le cas pour le groupe précédent ; 4 - les toxines Lqq IV et Amm VI constitueraient un groupe dont la caractéristique principale, pour le moment, serait la présence d'un résidu N- terminal supplémentaire ; 5 - le groupe de la toxine Csa II qui, outre la toxine de référence, comprendrait les toxines Csa I, Cse I et Ts Y ; les toxines de ce groupe présentent, à leur extrémité N- terminale, un résidu de moins que les toxines des groupes 1, 2 et 3 ci-dessus ; par ailleurs, leur extrémité C- terminale est libre. Cette tentative de classification des toxines anti-mammifères en cinq groupes est en accord complet avec les résultats des expériences d'immunologie (P. Delori, communication personnelle) : ainsi, chaque toxine du groupe AaH réagit avec

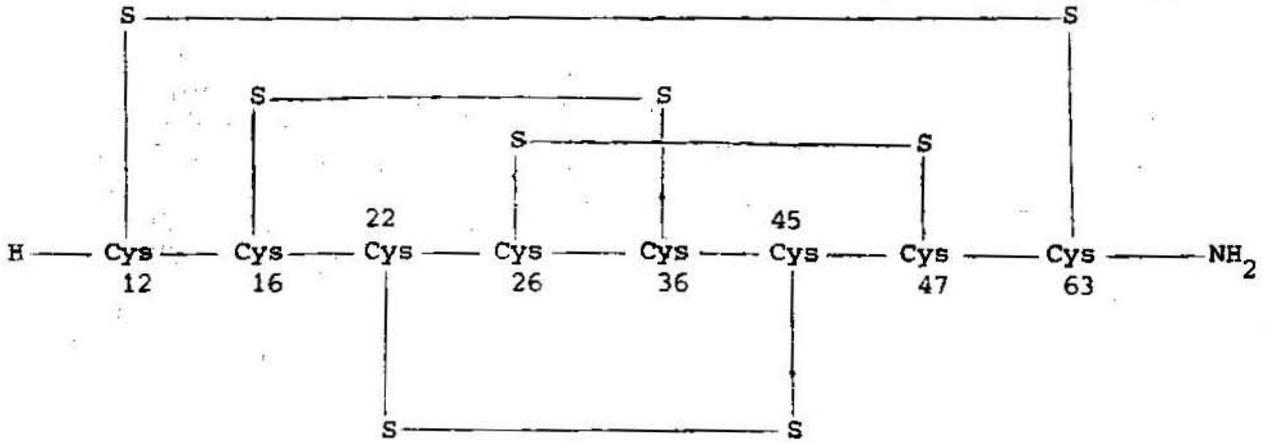


Figure 2 : Représentation schématique de la position des ponts disulfures de la toxine II d'*Androctonus australis* Hector active contre les mammifères (20).

l'antisérum préparé contre la toxine AaH I ; la même corrélation est obtenue entre les toxines du groupe AaH II et l'antisérum préparé contre cette dernière, entre les toxines du groupe Bot I et l'antisérum préparé contre cette toxine de référence ; il en est de même pour les toxines du groupe Csa II et l'antisérum anti-toxine Csa II. Inversement, une toxine appartenant à l'un des groupes ne réagit pas avec les antisérums préparés contre les toxines de référence des autres groupes.

Si l'on considère maintenant les toxines anti-insectes, il est encore possible, dans le cas des toxines AaH II, Csa v1, Csa v2 et Csa v3 d'aligner sept ou huit résidus de demi-cystine avec ceux des toxines anti-mammifères. Par contre, les toxines Be II et Amm II sont complètement différentes de toutes les autres toxines anti-mammifères ou anti-insectes ; bien qu'elles aient des séquences d'acides aminés beaucoup plus courtes, elles possèdent encore quatre ponts disulfures qui sont situés chez ces deux protéines à la même place, le nombre total des homologies étant de vingt et une.

3. MODIFICATIONS CHIMIQUES

Des modifications chimiques des résidus d'acides aminés fonctionnels des toxines de scorpions actives contre les mammifères ont été réalisées avec trois objectifs distincts :

- étudier les relations entre la structure et l'activité de ces molécules ;
- obtenir des dérivés radioactifs ayant conservé leurs propriétés pharmacologiques ;
- préparer, à l'inverse, de puissantes anatoxines.

On a ainsi montré (17) que :

- la réduction sélective et la S- méthylation d'un pont disulfure de la toxine AaH II conduit à la perte de l'activité ;
- le seul résidu de tryptophane de la toxine AaH II ne semble pas être important pour l'activité ;
- une modification des groupements carboxylates conduit à la formation d'un dérivé totalement inactif de la toxine AaH II ;
- une modification des groupements aminés par acétylation ou citraconylation supprime l'activité. La toxine AaH I acétylée se comporte comme une puissante anatoxine, mais le traitement par l'hydroxylamine de la toxine AaH II acétylée (l'hydroxylamine régénère les résidus de tyrosine acétylés) est nécessaire pour que la molécule se comporte comme un toxoïde (P. Delori, communication personnelle) : ainsi, on en a déduit que, dans la toxine AaH II, des résidus de tyrosine devraient faire partie des sites antigéniques ;
- la réaction avec l'acide iodo-acétique affecte, dans le cas de la toxine AaH II, à la fois des groupements aminés et des résidus d'histidine et, dans le cas de la toxine AaH I, un seul groupe $\{-NH_2\}$ d'un résidu de lysine. Pour la toxine AaH I, l'étude cinétique de la modification chimique et de la perte d'activité montre que cette dernière suit rigoureusement la transformation d'un résidu de lysine qui a été récemment identifié (49) comme occupant la position 67. Sur la Figure 1, on remarque que la position 67 est caractérisée, d'une façon générale, dans les toxines anti-mammifères, par la présence d'un résidu basique de lysine ou d'arginine. Toutefois, la valine a été trouvée, en position 67, dans la toxine Bot XI (49), appartenant au groupe AaH II et qui est cent fois moins toxique pour la souris que la toxine de référence de ce groupe (39). On peut conclure de cette étude que, dans le but d'obtenir un dérivé marqué radioactif ayant conservé sa toxicité, il faut éviter l'utilisation de méthodes comportant la modification des

groupements α aminés car ceux-ci sont importants, sinon essentiels, pour l'activité des toxines. Par ailleurs, puisque les toxines AaH II et Bot XI manifestent des propriétés antigéniques communes (P. Delori, communication personnelle), la toxine Bot XI qui est, de loin, la moins active du groupe, peut être considérée, dans une certaine mesure, comme une anatoxine naturelle ;

- la guanidination de la toxine AaH II, au contraire, n'affecte pas, de manière significative, son activité.

L'iodation des toxines de scorpions a été réalisée dans le but d'obtenir des dérivés radioactifs. En utilisant de l'iodure de potassium à pH 8,0, on avait d'abord pu préparer les toxines anti-mammifères AaH I et AaH II iodées et parfaitement actives avec des radioactivités spécifiques d'environ 40 Ci/mmole (38). Plus récemment, la méthode d'oxydation de l'iodure (^{125}I) par la lactoperoxydase a été appliquée et les toxines AaH I et AaH II ont été iodées avec des radioactivités spécifiques atteignant 2 000 Ci/mmole, tout en conservant intacte leur toxicité (44, 45). Les avantages de ce procédé sont les suivants :

- un temps court (moins de 4 heures) est nécessaire pour achever l'expérience ;

- la purification de la protéine à partir du mélange réactionnel est obtenue par précipitation avec un antisérum spécifique et la dissociation du précipité antigène-anticorps réalisée à l'aide d'acide acétique : la protéine native puis le dérivé marqué restent ainsi dans le même tube évitant les possibilités de pertes et de contaminations. Grâce à cette méthode, il a été possible de connaître la quantité de protéine récupérée et donc de calculer les valeurs des concentrations et des radioactivités spécifiques ;

- le rendement de la protéine marquée après purification est bon (50 à 80%) ; la protéine modifiée peut être obtenue dans un petit volume (1 ml), ce qui n'est pas le cas lorsque la filtration sur gel ou la chromatographie d'échange d'ions est utilisée pour la purification. Les protéines marquées ont été soumises à des analyses très poussées. Dans le cas de la toxine AaH I, il a été possible de suivre, par dégradation automatique d'Edman, la vitesse d'iodation de ses trois résidus de tyrosine en fonction de ^{125}I total incorporé dans la protéine : les trois résidus réagissent mais avec des vitesses relatives différentes. Dans le cas de la toxine AaH II qui contient sept résidus de tyrosine, l'hétérogénéité de la préparation marquée avec ^{125}I est encore plus probable. La toxine AaH I marquée par ^{125}I a été utilisée pour mettre au point un radioimmuno-essai permettant la détection spécifique de 10^{-15} mole (7,2 picogrammes) de toxine AaH I (51). Trois autres toxines pures : AaH III, qui appartient au même groupe que la précédente, AaH II et Bot I, qui sont les toxines de référence des deux autres groupes (Figure 1), ont été testées vis-à-vis de leur compétition avec la toxine AaH I marquée avec ^{125}I . Les demi-effets maximums étaient obtenus avec 30 fois plus de toxine AaH III et avec 4 300 fois plus de toxine AaH II. Dans le cas de la toxine Bot I, aucun effet ne se manifestait avec un excès de 4 300 fois. Si l'on considère que l'effet observé avec la toxine AaH II peut très bien s'expliquer par une contamination de 0,02% de toxine AaH I dans la préparation utilisée, on peut conclure que les toxines anti-mammifères des différents groupes n'ont pas de propriétés antigéniques communes. Au contraire, la toxine AaH III, qui appartient au même groupe que la toxine AaH I, peut entrer en compétition, de façon significative, avec la toxine AaH I marquée par ^{125}I .

4. MODE D'ACTION

Le mode d'action des toxines de scorpions a été étudié de façon approfondie en utilisant soit les venins bruts soit les toxines purifiées : une revue concernant ce domaine a été récemment publiée (56). Presque tous les effets décrits à ce jour peuvent être expliqués par une libération des neurotransmetteurs au niveau des synapses, résultant d'un effet excitateur primaire des toxines sur les membranes axonales.

quinquestriatus

Ainsi Adam et coll. (1) ont montré que le venin de *Leiurus/quinquestriatus*, mis au contact de la fibre nerveuse de grenouille, avait un effet dépolarisant qui était aboli en l'absence d'ions sodium dans le milieu. Koppenhöfer et Schmidt (22-24), faisant agir le venin de la même espèce sur le noeud de Ranvier d'une fibre nerveuse isolée de grenouille et Narahashi (35), qui a étudié l'effet du venin de *Buthus tamulus* sur une préparation d'axone géant de calmar, ont montré, dans des conditions de voltage imposé, que les venins de scorpions provoquaient une inhibition de l'inactivation du courant sodium et une suppression du courant potassium. Les ions calcium s'opposent aux changements dans les propriétés de la membrane causés par le venin de scorpion (50). Plus récemment, le mode d'action des toxines anti-mammifères AaH I et AaH II a été étudié. On a trouvé que la toxine AaH I, au contact des axones géants d'écrevisse et des nerfs de homards, dans les conditions de voltage imposé, affectait à la fois la fermeture du canal sodium (prolongation du potentiel d'action avec apparition d'un plateau typique, retard et blocage partiel de l'inactivation du courant d'entrée du sodium) et l'ouverture du canal potassium (décroissance du courant potassium de l'état stationnaire). La toxine semble réagir avec un seul type de site récepteur dans les membranes axonales. Les constantes de dissociation des complexes toxine-récepteur sont $0,25 \mu\text{M}$ pour l'écrevisse et $0,70 \mu\text{M}$ pour le homard (48). La toxine AaH I modifie considérablement le potentiel d'action du clone NIE-115 de cellules de neuroblastome de souris en augmentant son amplitude et sa durée, le demi-effet maximum étant obtenu pour des concentrations $0,4 \text{ nM}$ et $2,5 \text{ nM}$ respectivement. La tétrodotoxine, qui bloque sélectivement l'augmentation de la conductance au sodium de la membrane, inhibe complètement l'effet de la toxine AaH II, tandis que la vératridine, alcaloïde qui cause la dépolarisation des nerfs, potentialise son action. La fixation quasi-irréversible de la toxine AaH II ne se produit pas sur les mêmes sites que celle de la tétrodotoxine et de la vératridine, mais sur des sites régulateurs spécifiques impliqués dans l'inactivation de l'ionophore sodium (6). Cette propriété de la toxine AaH II d'inhiber sélectivement l'inactivation de l'ionophore sodium lié au potentiel d'action a été utilisée pour mettre en évidence la présence de canaux sodium rapides quiescents dans des cellules de coeur embryonnaires manifestant un potentiel d'action de type lent (7).

Des travaux récents utilisant les méthodes du transport ionique ont montré que les cellules de neuroblastomes, électriquement excitables, cultivées *in vitro*, étaient très utiles dans l'étude de l'ionophore sodium lié au potentiel d'action (8, 10, 11). Une protéine neurotoxique, purifiée à partir du venin de *Leiurus quinquestriatus*, a présenté une fixation potentiel de membrane - dépendante sur l'ionophore sodium lié au potentiel d'action de ces cellules de neuroblastomes (9, 11). Parmi les toxines anti-mammifères isolées dans notre laboratoire, la toxine AaH II est la plus toxique contre l'animal entier ($\text{DL}_{50} 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ souris) et la plus active sur les cellules de coeur d'embryon de poulet en culture chez lesquelles elle provoque des effets chronotropes et inotropes positifs et stimule l'entrée passive du sodium et du calcium à des concentrations aussi basses que 10 nM (13). En utilisant de la toxine AaH II marquée avec ^{125}I , on a pu montrer une fixation saturable, non seulement sur les cellules de neuroblastomes électriquement excitables (14) et sur les synaptosomes préparés à partir

du striatum de cerveau de rat (19) (Figures 3a et 3c), mais aussi sur les cellules de coeur d'embryon de poulet en culture. La représentation de Scatchard des données (Figures 3b et 3d) révèle, à la fois pour les neuroblastomes et les synaptosomes, une seule classe de sites sans interaction mutuelle, de haute affinité, avec un coefficient de Hill de 1,0. Dans dix expériences sur les cellules de neuroblastomes, la valeur du K_D est comprise entre 0,3 et 0,6 nM et le nombre de sites par cellule entre 4000 et 8000 (14). Les expériences sur les synaptosomes donnent des valeurs du K_D situées entre 0,1 et 0,3 nM et des capacités de fixation allant de 30 à 60 fmoles/mg de protéine (19). Dans le cas des cellules de neuroblastome, la valeur du K_D est presque égale à la concentration de toxine produisant le demi-effet maximum sur le potentiel d'action comme cela a été montré par les méthodes de l'électrophysiologie (6). La fixation sur les synaptosomes de la toxine AaH II marquée par ^{125}I confirme les résultats antérieurs qui montraient un effet stimulant de la toxine AaH I sur la libération des neurotransmetteurs par les synaptosomes (46). La fixation de la toxine AaH II marquée par ^{125}I apparaît comme voltage-dépendante du fait qu'elle peut être inhibée ou bien par augmentation de la concentration extracellulaire de potassium jusqu'à obtenir la dépolarisation des cellules ou bien (Figure 4a) par traitement avec la gramicidine D, ionophore artificiel (18, 25). Des résultats similaires ont été obtenus sur les synaptosomes. La représentation de Scatchard (Figure 4b) de la fixation de la toxine AaH II marquée par ^{125}I en présence et en absence de gramicidine D met en évidence l'augmentation de la constante de dissociation apparente, sans changement du nombre des sites de fixation.

Les polypeptides neurotoxiques purifiés à partir de l'anémone de mer *Anemonia sulcata* ont manifesté, comme les toxines de scorpions, des effets spécifiques sur la fermeture du canal sodium dans les axones myélinisés et non myélinisés (5, 47). La toxine II d'*Anemonia sulcata* et la toxine AaH II présentent des interactions compétitives vis-à-vis d'un site commun de fixation impliqué dans l'inactivation de l'ionophore sodium des cellules de neuroblastome. La démonstration peut être résumée sur trois figures : figure 5a - la toxine II d'*Anemonia sulcata* inhibe la fixation de la toxine AaH II marquée par ^{125}I , le demi-effet maximum étant obtenu pour une concentration 160 nM ; figure 5b - une relation linéaire est observée entre, d'une part, le $K_{0,5}$ de l'inhibition de la fixation par la toxine II d'*Anemonia sulcata* et, d'autre part, la concentration de la toxine AaH II marquée par ^{125}I ; figure 5c - la représentation de Scatchard de la fixation de la toxine AaH II marquée par ^{125}I en présence et en absence de la toxine II d'*Anemonia sulcata* montre un accroissement de la constante apparente de dissociation sans changement dans le nombre des sites de fixation (14). On aboutit à des résultats similaires quand l'inhibition de la fixation de la toxine AaH II marquée par ^{125}I sous l'influence de la toxine II d'*Anemonia sulcata* est testée sur les synaptosomes (19).

Dans le tableau I sont rassemblées les constantes de dissociation obtenues quand différentes toxines anti-mammifères appartenant à divers groupes (voir Figure 1) sont étudiées pour leur capacité à inhiber la fixation spécifique de la toxine AaH II marquée par ^{125}I . La toxine AaH II est la plus puissante des toxines anti-mammifères vis-à-vis des trois systèmes biologiques utilisés. La toxine Iqq V, qui fait partie du groupe de la toxine AaH II, est aussi très puissante. La toxine Iqq V a été trouvée 2 à 3 fois moins active que la toxine AaH II pour stimuler la pénétration passive du sodium et du calcium dans les cellules de coeur d'embryon de poulet en culture. L'activité des toxines AaH I et Bot I est encore plus faible et, par ailleurs, fortement dépendante du système biologique employé.

Figure 3 : Fixation de la toxine AaH II marquée par ^{125}I (appelée ^{125}I ScTx sur la figure) sur les cellules de neuroblastome (a) et sur les synaptosomes (c).

Des quantités croissantes de toxine marquée ont été incubées avec des cellules ou des synaptosomes en l'absence (Δ) ou en la présence (O ou \triangle) de toxine AaH II non marquée à une concentration 200 nM. La fixation spécifique (\ominus) est la différence entre la fixation totale et la fixation non spécifique. A droite, représentation de Scatchard de la fixation spécifique sur les cellules de neuroblastome (b) et sur les synaptosomes (d)

Traduction des coordonnées :

a : abscisses : ^{125}I ScTx (= toxine AaH II marquée par ^{125}I), nM (nM = nanomolaire = 10^{-9} molaire)
 ordonnées : ^{125}I ScTx liée, fmoles/ 10^6 cellules (fmoles = femtomole = 10^{-15} mole)

c : abscisses : voir a
 ordonnées : ^{125}I ScTx liée, fmoles/mg de protéine

b : abscisses : ^{125}I ScTx liée, fmoles/essai
 ordonnées : ^{125}I ScTx liée / ^{125}I ScTx libre

d : abscisses : ^{125}I ScTx liée, fmoles/mg de protéine
 ordonnées : voir b.

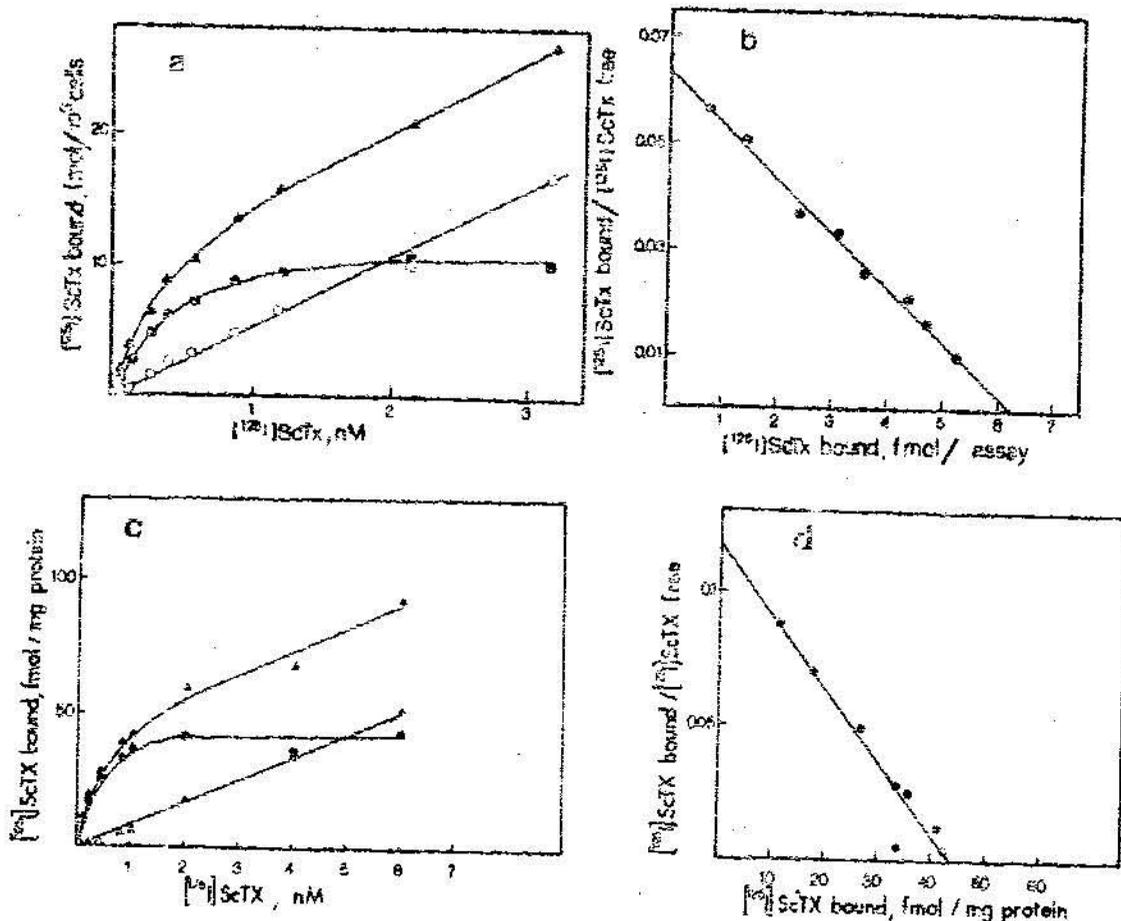


Figure 4 :

a = Effet de la dépolarisation de membrane, induite par la gramicidine D, vis-à-vis de la fixation de la toxine AaH II marquée par ^{125}I (= [^{125}I] ScTx) sur les cellules de neuroblastome. Les cellules étaient incubées, en présence de Na^+ 140 nM, avec [^{125}I] ScTx 0,4 nM et des quantités croissantes de gramicidine D (\blacktriangle). Même expérience en ajoutant au milieu de la toxine AaH II non marquée 200 nM (\triangle).

b = Représentation de Scatchard de la fixation spécifique de [^{125}I] ScTx sur les cellules de neuroblastome en l'absence (\blacktriangle) et en la présence (\triangle) de 2 μg par ml de gramicidine D. Même milieu que dans a. Traduction des coordonnées :

a :

abscisses : gramicidine, $\mu\text{g}/\text{ml}$
ordonnées : abscisses de la Figure 3b

b : mêmes coordonnées que celles de la Figure 3b.

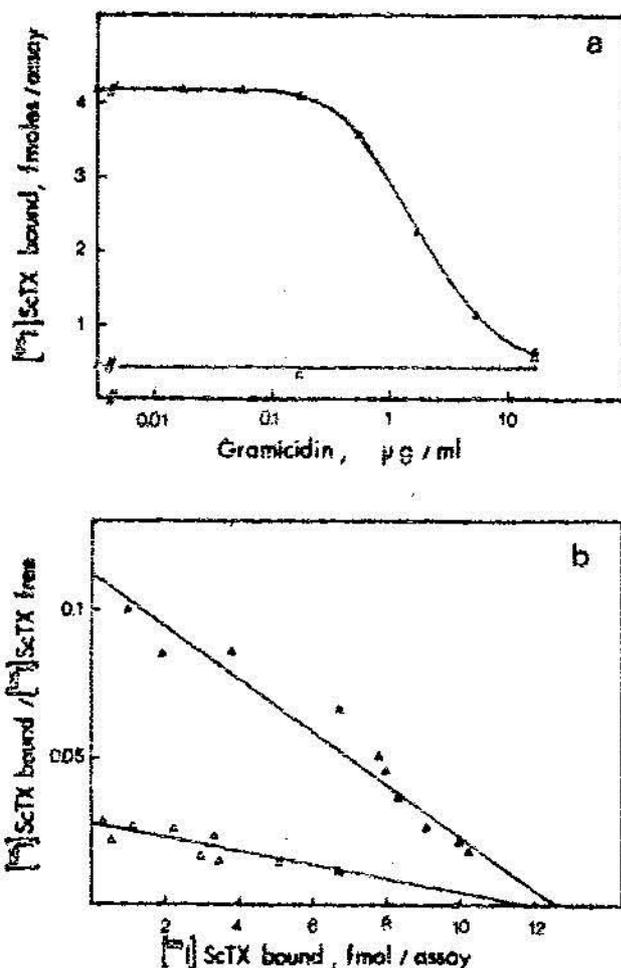


Figure 5 :

a = Déplacement de la fixation sur les cellules de neuroblastome de la toxine AaH II marquée par ^{125}I

(* [^{125}I] ScTx) sous l'effet de la toxine II d'anémone de mer *Anemonia sulcata* non marquée en l'absence (●) et en la présence (○) de toxine AaH II non marquée 200 nM.

b = Relation entre la concentration de la toxine II d'*Anemonia sulcata* réduisant de moitié la fixation de [^{125}I] ScTx sur les cellules de neuroblastome ($K_{0,5}$) et la concentration initiale de [^{125}I] ScTx utilisée.

c = Représentation de Scatchard de la fixation spécifique de [^{125}I] ScTx sur les cellules de neuroblastome en l'absence (▲) et en la présence (●) de toxine II d'*Anemonia sulcata* 0,15 μM . Les cellules étaient incubées avec [^{125}I] ScTx 0,2 nM (14).
Traduction des coordonnées :

a :

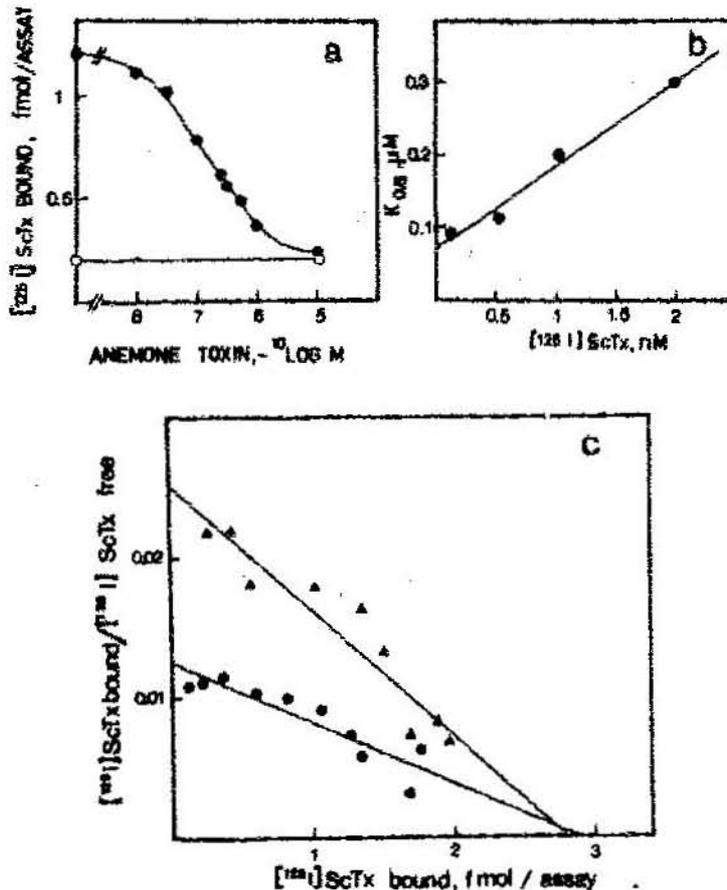
abscisses : toxine d'anémone, $-\log_{10} M$

ordonnées : abscisses de la Figure 3b

b :

abscisses : abscisses de la Figure 3a

c : mêmes coordonnées que celles de la Figure 3b.



Toxines	Cellules de coeur d'embryon de poulet	Cellules de neuroblastome	Synaptosomes de cerveau de rat
AaH II	1 - 3	0.3 - 0.6	0.1 - 0.3
AaH I	400	150	3
Bot I	50	3 800	1 300
Lqg V	-	0.9	0.8.

Tableau 1 : Constantes de dissociation (nM) de différentes
toxines de scorpion.

Une concentration $10\mu\text{M}$ de toxine C_{ss} I n'inhibe pas la fixation spécifique de la toxine AaH II marquée par ^{125}I sur les cellules de coeur d'embryon de poulet et les synaptosomes de cerveau de rat. De plus, nous avons trouvé que cette toxine ne stimulait pas la captation passive du sodium et du calcium par les cellules cardiaques embryonnaires de poulet et ne modifiait pas le potentiel d'action de ces cellules, pas plus que celui des cellules des neuroblastomes. Ainsi, la toxine C_{ss} II ne semble pas avoir d'interactions avec la même classe de sites, en relation avec la fermeture de l'ionophore sodium impliqué dans le potentiel d'action des cellules excitables, que la toxine AaH II. Par conséquent, son mode d'action est nécessairement différent.

Les toxines anti-insectes et les toxines anti-crustacés, purifiées à partir du venin de scorpion compte tenu de leur activité paralysante respectivement pour les larves de mouches et pour les isopodes (55, 57), montrent, lorsqu'elles sont testées sur des préparations nerf-muscle d'un arachnide, d'un crustacé, d'un insecte et d'un mammifère, des effets excitants sur les muscles, dus à une activité dépolarisante sur les nerfs moteurs. Toutefois, seule la toxine AaH IT a été trouvée hautement sélective sur la préparation nerf-muscle d'insecte (52, 56) : de ce fait, cette toxine peut servir d'outil spécifique pour l'étude des neurones d'insectes.

En conclusion, les venins de scorpions peuvent être considérés comme une excellente source en vue de la purification d'outils spécifiques extrêmement précieux pour l'étude de l'ionophore sodium lié au potentiel d'action dans différentes préparations biologiques.

5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - Adam, K.R., Schmidts, H., Stampfli, R. et Weiss, C. (1966) : Brit. J. Pharmacol., 26 : 666-667.
- 2 - Adam, K.R. et Weiss, C. (1959) : Brit. J. Pharmacol., 14 : 334-339.
- 3 - Babin, D.R., Watt, D.D., Goos, S.M. et Mlejnek, R.V. (1974) Arch. Biochem. Biophys., 164 : 694-706.
- 4 - Babin, D.R., Watt, D.D., Goos, S.M. et Mlejnek, R.V. (1975) : Arch. Biochem. Biophys., 166 : 125-134.
- 5 - Bergman, C., Dubois, J.M., Rojas, E. et Rathmayer, W. (1976) : Biochim. Biophys. Acta, 455 : 173-184.
- 6 - Bernard, P., Couraud, F. et Lissitzky, S. (1977) : Biochem. Biophys. Res. Comm., 77 : 782-787.
- 7 - Bernard, P. et Gouraud, F. (1978) : Biochim. Biophys. Acta, accepté pour publication.
- 8 - Catterall, W.A. (1975) : J. Biol. Chem., 250 : 4053-4059.
- 9 - Catterall, W.A. (1977) : J. Biol. Chem., 252 : 8660-8668.
- 10 - Catterall, W.A. et Nirenberg, M. (1973) : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70 : 3759-3763.
- 11 - Catterall, W.A., Ray, R. et Morrow, C.S. (1976) : Proc Natl. Acad. Sci. USA, 73 : 2682-2686.
- 12 - Chicheportiche, R. et Lazdunski, M. (1970) : Eur. J. Biochem., 14:549-555.

- 13 - Couraud, F., Rochat, H. et Lissitzky, S. (1976) :
Biochim. Biophys. Acta, 433:90-100.
- 14 - Couraud, F., Rochat, H. et Lissitzky, S. (1978) :
Biochem. Biophys. Res. Comm., 83 : 1525-1530.
- 15 - Diniz, C.R. (1978) : dans : Arthropod Venoms, S. Bettini
éd., pp. 379-394, Springer Verlag, Berlin.
- 16 - Garcia, L.G. (1976) : Thèse d'Université, Faculté des
Sciences, Nice, 54 pp.
- 17 - Habersetter-Rochat, C. et Sampieri, F. (1976) :
Biochemistry, 15:2254-2261.
- 18 - Hladky, S.B. et Haydon, D.A. (1972) : Biochim. Biophys.
Acta, 274:294-312.
- 19 - Jover, E., Martin-Moutot, N., Couraud, F. et Rochat, H.
(1978) : Biochem. Biophys. Res. Comm., 85:377-382.
- 20 - Kopeyan, C., Martinez, G., Lissitzky, S., Miranda, F.
et Rochat, H. (1974) : Eur. J. Biochem., 47:483-489.
- 21 - Kopeyan, C. Martinez, G. et Rochat, H. (1978) :
FEBS Letters, 89:54-58.
- 22 - Koppenhöfer, E. et Schmidt, H. (1968) : Experientia,
24:41-42.
- 23 - Koppenhöfer, E. et Schmidt, H. (1968) : Pflügers Arch.,
303 : 133-149.
- 24 - Koppenhöfer, E. et Schmidt, H. (1968) : Pflügers Arch.,
303:150-161.
- 25 - Leung, J. et Eisenberg, R.S. (1972) : Biochim. Biophys.
Acta, 298 : 718-723.
- 26 - Lissitzky, S., Miranda, F., Etzensperger, P. et Mercier, J.
(1956) : C.R. Soc. Biol. (Paris), 150:741-743.
- 27 - Martin, M.F. (1974) : Diplôme d'Etudes Approfondies,
Faculté des Sciences, Marseille, 24 pp.
- 28 - Miranda, F., Kopeyan, C., Rochat, H. Rochat, C. et
Lissitzky, S. (1970) : Eur. J. Biochem., 16:514-523.
- 29 - Miranda, F., Kopeyan, C., Rochat, H. Rochat, C. et
Lissitzky, S. (1970) : Eur. J. Biochem., 17:477-484.
- 30 - Miranda, F. et Lissitzky, S. (1958) : Biochim. Biophys. Acta,
30:217-218.
- 31 - Miranda, F. et Lissitzky, S. (1961) : Nature (Lond.),
190:443-444.
- 32 - Miranda, F., Rochat, H. et Lissitzky, S. (1960) :
Bull. Soc. Chim. Biol., 43:379-391.
- 33 - Miranda, F., Rochat, H. et Lissitzky, S. (1961) :
Bull. Soc. Chim. Biol., 43:945-952.
- 34 - Mohammed, A.H. (1942) : Lancet, 2:364-365.

- 35 - Narahashi, T. (1972) : *Federation Proc.*, 31:1124-1132.
- 36 - Possani, L.D., Alagon, A.C., Fletcher, P.L. Jr. et Erickson, B.W. (1977) : *Arch. Biochem. Biophys.*, 180:394-403.
- 37 - Rochat, C., Rochat, H., Miranda, F. et Lissitzky, S. (1967) : *Biochemistry*, 6:578-585.
- 38 - Rochat, C., Sampieri, F., Rochat, H., Miranda, F. et Lissitzky, S. (1972) : *Biochimie*, 54:445-449.
- 39 - Rochat, H., Kopeyan, C., Garcia, L.G., Martinez, G., Rosso, J.P., Pakaris, A., Martin, M.F., Garcia, A., Martin-Moutot, N., Grégoire, J. et Miranda, F. (1976) : Dans : *Animal, Plant and Microbial Toxins*, A. Ohsaka, Kyozo Hayashi et Yoshio Sawai éd., vol. 2, pp. 79-87, Plenum Publishing Corporation, New-York.
- 40 - Rochat, H., Rochat, C., Kopeyan, C., Lissitzky, S., Miranda, F. et Edman, P. (1970) : dans : *Toxins of Animal and Plant Origin*. A. de Vries et E. Kochva éd., pp. 525-528, Gordon et Breach, London.
- 41 - Rochat, H., Rochat, C., Kopeyan, C., Miranda, F., Lissitzky, S. et Edman, P. (1970) : *FEBS Letters*, 10:349-351.
- 42 - Rochat, H., Rochat, C., Miranda, F., Lissitzky, S. et Edman, P. (1970) : *Eur. J. Biochem.*, 17:262-266.
- 43 - Rochat, H., Rochat, C., Sampieri, F., Miranda, F. et Lissitzky, S. (1972) : *Eur. J. Biochem.*, 28:381-388.
- 44 - Rochat, H., Tessier, M., Miranda, F. et Lissitzky, S. (1976) : dans : *Animal, Plant and Microbial Toxins*, Akira Ohsaka, Kyozo Hayashi et Yoshio Sawai éd., vol. 1, pp. 81-88, Plenum Publishing Corporation, New-York.
- 45 - Rochat, H., Tessier, M., Miranda, F. et Lissitzky, S. (1977) : *Anal. Biochem.*, 82:532-548.
- 46 - Romey, G., Abita, J.P., Chicheportiche, R., Rochat, H. et Lazdunsky, M. (1976) : *Biochim. Biophys. Acta*, 448:607-619.
- 47 - Romey, G., Abita, J.P., Schweitz, H., Wunderer, G. et Lazdunski, M. (1976) : *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 73:4055-4059.
- 48 - Romey, G., Chicheportiche, R., Lazdunski, M., Rochat, H., Miranda, F. et Lissitzky, S. (1975) : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 64:115-121.
- 49 - Sampieri, F. et Habersetzer-Rochat, C. (1978) : *Biochim. Biophys. Acta*, 535:100-109.
- 50 - Schmitt, O. et Schmidt, H. (1972) : *Pflügers Arch.*, 333:51-61.
- 51 - Tessier, M., Delori, P., Bechis, G. et Rochat, H. (1978) : *FEBS Letters*, 85:163-166.
- 52 - Walther, C., Zlotkin, E. et Rathmayer, W. (1976) : *J. Insect. Physiol.*, 22:1187-1194.

- 53 - Wilson, W.H. (1904) : J. Physiol. (Lond.), 31:48-49.
- 54 - Zhdavone, L.N., Adamovich, T.B., Nazimov, I.V.,
Grishin, E.V. et Ovchinnikov, Yu. A. (1977) :
Bioorganidreskaya Khim., 3:485-493.
- 55 - Zlotkin, E., Martinez, G., Rochat, H. et Miranda F.
(1975) : Insect. Biochem., 5:243-250.
- 56 - Zlotkin, E., Miranda, F. et Rochat, H. (1978) : dans :
Arthropod Venoms, S. Bettini éd., pp. 317-369, Springer
Verlag, Berlin.
- 57 - Zlotkin, E., Rochat, H. Kopeyan, C., Miranda, F. et
Lissitzky, S. (1971) : Biochimie, 53:1073-1078.

RESUME ET CONCLUSIONS

Des conditions originales de purification ont permis d'isoler, à partir des venins des scorpions de la famille des *Buthidae*, de nombreuses substances toxiques spécifiquement actives sur les mammifères, les insectes et les crustacés.

La détermination de la structure primaire de ces composés a montré qu'il s'agissait de protéines de faible masse molaire, ne comportant guère plus de 70 résidus d'acides aminés, réticulées par 4 ponts disulfures.

L'approche de la connaissance du mode d'action des toxines a mis en jeu des méthodes très variées : utilisation des isotopes radioactifs tant pour la mesure des flux ioniques transmembranaires que pour le marquage par l'iode des protéines ; emploi des cultures de cellules (myocytes de coeur d'embryon de poulet, cellules de neuroblastome de souris), de modèles biologiques divers provenant de vertébrés ou d'invertébrés (préparations nerf-muscle, axones isolés, synaptosomes), de diverses techniques d'électrophysiologie dont la méthode du voltage imposé : dans le cas des toxines actives sur les mammifères qui sont actuellement les mieux connues, on pense que le récepteur de ces protéines est lié au fonctionnement de l'entité physiologique communément appelée "canal sodium".

La comparaison de plusieurs séquences primaires dans ce dernier groupe de composés montre qu'ils constituent une véritable famille de protéines où un résidu particulier de lysine joue un rôle important dans l'activité de la molécule, ce qui est confirmé par l'emploi de différentes méthodes spécifiques de modification chimique des résidus d'acides-amino.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Original methods of purification have proved to be successful in the isolation, from several venoms of scorpions belonging to the family of *Buthidae*, of various toxic substances specifically active against mammals, insects and crustaceans.

The determination of the primary structure of these components has shown that we are dealing with proteins of low molecular weight, possessing at the most 70 residues of amino acids and cross-linked by 4 disulfide bridges.

For the study of the mode of action of the toxins, different methods have been applied, mainly use of : radioactive isotopes for the measurement of transmembral ionic currents as well as for the preparation of radioiodinated proteins ; cell cultures (embryonic chick heart myocytes, mice neuroblastoma cells) ; several biological models from vertebrates and invertebrates (nerve-muscle preparations, isolated axons, synaptosomes) ; various electrophysiological techniques including the voltageclamp method : in the case of the toxins active against mammals, which are the best known at the present time, it appears that the receptor of these proteins is part of the physiological entity so called "sodium channel".

The comparison of many primary sequences in this group of components shows clearly that they form a family of proteins in which a peculiar residue of lysine plays an important role in the activity of these molecules, this assumption being confirmed by the results of several specific chemical modifications of different toxins.