

**PROBLÈMES POSÉS PAR LA PURIFICATION  
DES NEUROTOXINES ANIMALES  
(NEUROTOXINES DES VENINS DE SCORPIONS) \***

**F. MIRANDA, H. ROCHAT, C. ROCHAT et S. LISSITZKY**

*Laboratoire de Biochimie Médicale,  
Faculté de Médecine et de Pharmacie,  
Marseille. France*

\* Les résultats rapportés dans ce mémoire sont publiés, par ailleurs, sous une forme condensée dans la Revue internationale « TOXICON » (Pergamon Press) sous le titre : « *Complexes moléculaires présentés par les neurotoxines animales. I. — Neurotoxines des venins de scorpions (Androctonus australis Hector et Buthus occitanus tunetanus)* ».

## ENGLISH SUMMARY

Previous studies have led to the isolation of two neurotoxins (I and II) from the venom of each of two North-African Scorpions. The purity of the toxins obtained has been confirmed by several criteria of protein homogeneity and this knowledge has permitted the study of their behaviour in the presence of other proteins usually found in the glands.

The resulting aberrant forms of the toxins have been studied by ion-exchange chromatography on Amberlite CG-50 or DEAE-Sephadex and by disc electrophoresis on polyacrylamide gels in the presence of 8M urea.

Multiple examples of aberrant forms of the toxins were noted during the purification of gland extracts and toxin II disappeared completely no matter which technique was used in the attempted isolation.

Chromatography of gland extracts on DEAE-Sephadex A-50 in 0,1 M ammonium acetate pH 8,47 gives a better yield of toxin than chromatography on Amberlite. The first fraction eluted from DEAE-Sephadex, fraction A, contains the aberrant forms of the toxins. A toxin could be obtained readily from the second fraction (fraction B). This substance is similar in specific toxicity and homogeneity to the toxin I previously isolated from venom.

The same chromatographic techniques applied directly to crude venom produce similar results.

The aberrant forms observed are probably the consequence of non specific association of the toxins with contaminating proteins. This association with other proteins might be related to the high content of ionizable groups in the toxins.

## ABSTRACT

Après avoir, dans des travaux antérieurs, isolé à partir des venins de scorpions, deux entités chimiques bien définies : les toxines I et II, nous avons entrepris l'étude de certaines formes aberrantes de toxines existant dans les extraits riches en protéines étrangères : broyats de telsons, extraits totaux de venins, à l'aide de méthodes chromatographiques et électrophorétiques. A partir de cet ype d'extraits, il est très difficile d'isoler la toxine II : seul l'extrait total du venin d'*Androctonus* permet d'en récupérer une très faible quantité (1 %).

Corrélativement se manifestent des formes aberrantes de toxines dont la purification et l'identification s'avèrent très difficiles. Une méthode intéressante pour obtenir ces formes dans un état de purification avancée est la chromatographie sur DEAE-Sephadex en tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH : 8,47 qui permet d'isoler deux fractions toxiques : la fraction A qui contient les formes aberrantes et la fraction B qui conduit rapidement à l'obtention de toxine I dans un état homogène.

Les formes aberrantes de toxines semblent être constituées par l'association de ces dernières avec des protéines étrangères par des liaisons de type polaire donnant des complexes moléculaires plus ou moins bien définis.

## INTRODUCTION

*La pluralité des formes actives semble être la règle chez les neurotoxines animales, car il est peu d'exemples où l'application aux venins animaux des techniques modernes de purification des protéines n'ait pas conduit à l'isolement de plusieurs principes manifestant la même activité biologique [1].*

*Nos travaux sur deux espèces de scorpions d'Afrique du Nord : *Androctonus australis* (L.) Hector (Koch) et *Buthus occitanus* (Am.) tunctanus (Herbst) nous ont permis d'isoler, à partir des venins, avec un rendement en toxicité voisin de 40 %, deux principes actifs pour chacune de ces espèces, appelés toxine I et toxine II suivant leur ordre d'apparition dans l'éluat de la chromatographie d'équilibre sur Amberlite [2, 3].*

*Ces principes actifs, obtenus par des méthodes très douces (c'est ainsi, par exemple, que les conditions de pH sont toujours très voisines de la neutralité), doivent être considérés, en toute vraisemblance, comme les principes actifs naturels des venins. Ils satisfont à différents critères d'homogénéité des protéines [3].*

*Leurs compositions centésimales en amino-acides sont totalement différentes, aussi bien pour les deux toxines d'une même espèce que pour les toxines homologues des deux espèces [4].*

*Un autre type de matériel venimeux est constitué par le telson (dernier article du post-abdomen du scorpion) contenant les glandes à venin. La purification des toxines à partir de ce matériel, d'activité spécifique beaucoup plus faible que celle du venin, est plus fastidieuse et conduit à l'isolement d'une seule toxine présentant l'activité spécifique et les caractéristiques chromatographiques de la toxine I des venins, avec un rendement en toxicité de 7 % par rapport à l'extrait toxique initial [3].*

*La perte de la toxine II pouvait être attribuée à l'introduction, dans la purification à partir des telsons, d'une chromatographie à pH trop bas [6, 7].*

*Une autre explication consistait à supposer que, dans le broyat de telsons, les toxines (et, en particulier, la toxine II) existaient sous des formes aberrantes ayant un comportement analytique totalement différent de celui des toxines natives présentes dans les venins et tout spécialement dans le venin physiologique ou venin « manuel » vrai [5]. Différentes anomalies observées au cours de la purification à partir des glandes suggéraient déjà l'existence de telles formes aberrantes [6, 7].*

*Le but de ce travail a été de rechercher et de caractériser les formes actives des toxines existant dans le broyat de telsons.*

*Par ailleurs, en utilisant un venin « électrique » [5], moins pur que le venin « manuel », et en le soumettant directement à la chromatographie sur Amberlite, nous avons pu faire apparaître des formes aberrantes dont le comportement chromatographique est très voisin de celui des entités trouvées dans le broyat de telsons.*

# MATÉRIEL

## MATERIEL TOXIQUE :

Il était de trois sortes (venin « manuel », venin « électrique », telsons) obtenues selon des méthodes décrites par ailleurs [3] et provenant de deux espèces de scorpions : *Androctonus australis Hector* (venin « manuel »\*, venin « électrique »), *Buthus occitanus tunetenus* (venin « électrique », telsons).

## MATERIEL CHIMIQUE :

Les solutions et les tampons à l'acétate d'ammonium étaient préparés à partir de produits Merck « pro analysi ». Tous les autres produits chimiques employés étaient également de qualité analytique. L'eau a toujours été désionisée sur résines, puis bi-distillée dans un appareil en quartz.

L'Amberlite CG-50, type 2, était fournie par ROHM et HAAS Co, Philadelphie (U.S.A.), les Sephadex G-25 et G-50, grain fin ou en perles, gros grain, le DEAE-Sephadex A-50, grain moyen, provenaient de PHARMACIA, Uppsala (Suède).

# MÉTHODES

## 1 — METHODES BIOLOGIQUES :

L'unité d'activité choisie a été la dose létale 50 % ( $DL_{50}$ ) déterminée selon la méthode de BEHRENS et KARBEL [9], l'animal réactif étant la souris Swiss mâle de 20 gr provenant d'élevages contrôlés par le Centre de Sélection des Animaux de Laboratoire (C.N.R.S.) \*\*.

Des détails concernant l'application de cette technique de dosage biologique ont été fournis par ailleurs [3, 7].

L'activité spécifique a été exprimée de deux manières :

1°) généralement sous forme d'activité spécifique rapportée à la densité optique ou  $AS_{50}$  : c'est le rapport du nombre de  $DL_{50}$  pour

---

\* Le venin « manuel » peut être lui-même de deux types :

— venin « manuel » vrai ou venin physiologique obtenu par simple excitation de l'animal à la main nue (la  $DL_{50}$  du venin d'*Androctonus* obtenu par cette méthode est de 0,225 mg/kg-souris).

— venin « manuel » obtenu selon ROCHAT en exerçant une pression douce et continue sur les glandes [8] (la  $DL_{50}$  du venin d'*Androctonus* fourni par cette méthode est de 0,490 mg/kg-souris).

\*\* La précision de cette méthode, avec les animaux que nous utilisons et telle qu'elle nous apparaît après les centaines d'essais biologiques que nous avons réalisés, est supérieure à  $\pm 5\%$ . Dans les tableaux, nous avons transcrit les chiffres expérimentaux bruts qu'il faut évidemment assortir de cette donnée.

la souris de 20 gr à la quantité de protéine, l'unité de quantité de protéine étant définie arbitrairement comme la quantité de protéine qui, dissoute dans 1 ml, présente une densité optique à 280 m $\mu$  et sous 1 cm d'épaisseur — DO $\frac{280}{60}$  — de 1 unité ;

2°) plus rarement sous forme d'activité spécifique rapportée au poids ou ASp : c'est le rapport du nombre de DL $\frac{60}{60}$  pour la souris de 20 gr au nombre de mg de poids sec de la préparation.

## 2 — METHODES CHIMIQUES :

### A/ — Techniques d'extraction\*

#### a) *cas des telsons*

De nombreux solvants ont été utilisés : eau bidistillée, solutions salines (NaCl 0,15 M, acétate d'ammonium — AcNH $_4$  — 0,1 M ou tampon 0,1 M de pH : 8,47), solutions acides (acide acétique — AcOH — 0,1 N et 0,5 N ; HCl 0,5 N ; H $_2$ SO $_4$  0,3 N).

Généralement, les telsons sont extraits par 25 volumes de solvant. On procède de la façon suivante : 5 gr de telsons (conservés congelés à — 15°) sont broyés pendant une dizaine de minutes dans un mortier jusqu'à obtention d'une pâte homogène, les débris chitineux des téguments de la glande facilitant l'homogénéisation. On ajoute alors 50 ml de solvant et on triture le mélange obtenu. Après une macération de deux heures\*\*, l'extrait est centrifugé et le surnageant recueilli. On répète l'opération avec 50 ml puis 25 ml de solvant. Les surnageants sont rassemblés et, éventuellement, lyophilisés.

Dans le cas des extractions par l'acide acétique, on ajoute au surnageant, sous pH-mètre, une solution d'ammoniaque de même normalité jusqu'à obtention d'un pH de 7,2\*\*\*. On laisse reposer à la température de +4° pendant 18 heures, période au cours de laquelle il se forme un précipité floconneux, très important, que l'on élimine par centrifugation.

L'extraction par HCl 0,5 N est réalisée de la même manière ; la neutralisation par NaOH 0,5N est poursuivie jusqu'à obtention d'un pH voisin de 7, mais légèrement supérieur (environ 7,3). L'extraction par H $_2$ SO $_4$  a été conduite, non pas sur un broyat de telsons, mais sur un extrait aqueux lyophilisé de telsons. La neutralisation de l'extrait sulfurique a été obtenue à l'aide d'une solution d'ammoniaque de même normalité (0,3N).

---

\* Toutes les opérations d'extraction sont conduites à la température de + 4°.

\*\* Dans le cas des extractions par AcOH, le temps de macération est ramené à 30 minutes.

\*\*\* Cette valeur a été retenue à la suite d'une étude systématique au cours de laquelle nous avons suivi, en fonction du pH de neutralisation, l'évolution des activités totales et des activités spécifiques des solutions toxiques.

b) *cas des venins* :

L'extraction dans l'eau pure est réalisée par épuisement du venin à l'eau en cinq macérations et centrifugations successives, le dernier surnageant devant présenter une absorption à 280 m $\mu$  de 0,5 unité de DO par ml au maximum. Le volume final des surnageants rassemblés est de l'ordre de 100 ml pour 1 g de venin. Ensuite, les surnageants sont, suivant les cas, ou bien immédiatement lyophilisés, ou bien soumis à une dialyse préalable.

Certaines expériences ont enfin été réalisées en dissolvant directement le venin dans le tampon de la première chromatographie sur Amberlite (acétate d'ammonium 0,2 M de pH 6,70) et en éliminant la fraction insoluble, non toxique, par centrifugation. Le volume final de l'extrait (après rinçage du culot de centrifugation) était compris entre 25 et 30 ml. Ce type d'extrait a été appelé, dans la suite du texte, extrait total.

**B/ — Fractionnement acétonique**

L'extrait de telsons par NaCl 0,15 M ou par HCl 0,5 N (avec neutralisation par NaOH 0,5 N) a été soumis à la précipitation fractionnée par l'acétone à basse température [6, 7]. On obtient deux fractions : 0 — 60 % en acétone et 60 — 80 %, cette dernière renfermant environ 80 % de la toxicité.

Des expériences de récupération des toxines à partir de la fraction 0 — 60 % ont été effectuées en mettant en suspension cette fraction dans NaCl 0,15 M, le volume de solution étant tel que la concentration en protéines soit du même ordre que dans l'extrait de telsons d'origine.

**C/ — Dialyse**

La dialyse contre l'eau pure des extraits aqueux de venins et des précipités du fractionnement acétonique des broyats de telsons mis en suspension dans l'eau a été réalisée à la température de + 4° dans des tubes de cellulose (Visking Cellulose Co Chicago, III. — U.S.A.) d'un diamètre de 8/32 in. et de 23/32 in. suivant l'importance des volumes à dialyser. L'opération durait entre 24 et 48 heures, l'eau bidistillée étant renouvelée très souvent.

**D/ — Filtration sur tamis moléculaires**

Les gels de dextrane (Sephadex G-25 et G-50) ont été utilisés de deux manières : en filtration moléculaire vraie selon GELOTTE [10] et FLODIN [11] l'éluant étant constitué par une solution d'acétate, et en rétention réversible sans gradient [12] avec, comme éluants successifs, l'eau et une solution d'acétate d'ammonium 0,1 M. Les colonnes employées avaient un diamètre de 2 à 5 cm et une hauteur comprise entre 10 et 95 cm.

## E/ — Chromatographie sur échangeurs d'ions

Les échangeurs d'ions ont été utilisés en colonnes (diamètres : 1,2 à 5 cm ; hauteurs : 18 à 146 cm) ou en suspensions. Dans l'utilisation en colonne, les débits, choisis en fonction du diamètre des colonnes, étaient généralement maintenus constants grâce à l'emploi de pompes Miniflow, type 4501 (LKB, Stockholm - Suède).

Les tampons phosphates ont été préparés d'après GOMORI [13]. Les tampons acétate d'ammonium sont obtenus à partir de solutions d'acétate d'ammonium 0,1 M et 0,2 M auxquelles on ajoute la quantité nécessaire d'acide acétique ou d'ammoniaque concentrés (acide acétique ~ 17,5 N ; ammoniaque ~ 13,5 N) suivant le cas.

Dans ces conditions, on peut considérer que, pour les tampons acides, la normalité en ions ammonium a très peu changé par rapport à celle de la solution d'origine ; pour les tampons alcalins, c'est la normalité en ions acétiques qui a très peu varié. Pour simplifier l'écriture, nous avons, par convention, désigné les tampons par la molarité de la solution d'origine, cette molarité correspondant toujours très sensiblement à la normalité de l'un des deux ions :  $\text{NH}_4^+$  pour les tampons de pH inférieur à 7,  $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$  — pour les tampons de pH supérieur à 7.

Nous avons fait appel à deux types d'échangeurs de polarité opposée : un échangeur de cations, l'Amberlite IRC-50 et un échangeur d'anions, le DEAE-Sephadex.

### a) Chromatographie sur Amberlite CG-50 — type 2 :

Elle a été réalisée de deux manières :

#### 1°) En chromatographie d'équilibre :

Le détail de la technique a été exposé par ailleurs [7]. Les tampons utilisés étaient l'acétate d'ammonium 0,2 M de pH : 6,30, 6,70, 7,14, 7,50, 8,00, 9,00 et les phosphates sodiques 0,2 M de pH : 6,82.

#### 2°) En chromatographie avec gradient de molarité :

— en milieu acétate d'ammonium :

La résine est équilibrée dans un tampon acétate d'ammonium 0,2 M de pH : 6,70. La colonne a 1,2 cm de diamètre et 21 cm de hauteur. Le dispositif de gradient utilisé est celui de GRÉGOIRE et coll. [14], le récipient mélangeur ayant un volume de 150 ou 250 ml. Le gradient est établi à l'aide d'un tampon acétate d'ammonium de pH : 6,70 dont la molarité est de 0,5 ou 1.

— en milieu phosphates de sodium :

La résine est équilibrée dans un tampon 0,1 M de pH : 6,80. La colonne a 2 cm de diamètre et 146 cm de hauteur. Le récipient mélangeur du dispositif de gradient a un volume de 150 ml. Le gradient est établi avec une solution de NaCl 2 M dans le tampon phosphate précédent.

b) *Chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 medium* :

Dans une étape préliminaire, nous avons étudié, en fonction du pH d'éluion de la chromatographie d'équilibre, le rendement en activité toxique de l'opération et l'activité spécifique de la fraction toxique. La solution tampon était constituée par de l'acétate d'ammonium 0,1 M dont on faisait varier le pH d'une opération à l'autre, les valeurs limites étant 7,99 et 9,38.

Les colonnes employées avaient 2 cm de diamètre et 18 cm de hauteur. On les chargeait avec des quantités de protéines allant de 60 à 100 mg. Le matériel de départ était constitué par le lyophilisat d'une extraction de telsons dans l'acide acétique 0,5 N. Le lyophilisat était dissous dans 5 ml du tampon d'équilibrage de la colonne ; le pH de la solution du lyophilisat était ramené à celui du tampon de chromatographie par addition de quelques gouttes d'ammoniaque concentrée.

Le débit de la colonne était de 3 ml/h. Les protéines éluées étaient estimées par mesure de la densité optique à 280 m $\mu$ . Le tableau I donne les principaux résultats de cette étude ; la figure 1 représente l'allure de la courbe d'éluion des protéines pour le pH que nous avons retenu comme le plus favorable 8,47.

**TABLEAU I**

Purification d'un extrait acétique de telsons de *Buthus occitanus* par chromatographie sur DEAE-Sephadex dans des tampons acétate d'ammonium 0,1 M de différents pH (dimensions des colonnes : 2  $\times$  18 cm)

pH du tampon de chromatographie	DO <sub>280</sub> fraction toxique		Rendement en toxicité en %	ASdo de la fraction toxique	Coefficient de purification
	DO <sub>280</sub> extrait	initial (en %)			
7,99	41		67	37	1,7
8,47*	42		97	53	2,3
9,00	48		78	37	1,6
9,38	32		48	33	1,4

★ La courbe d'éluion correspondant à cette expérience est représentée sur la figure 1

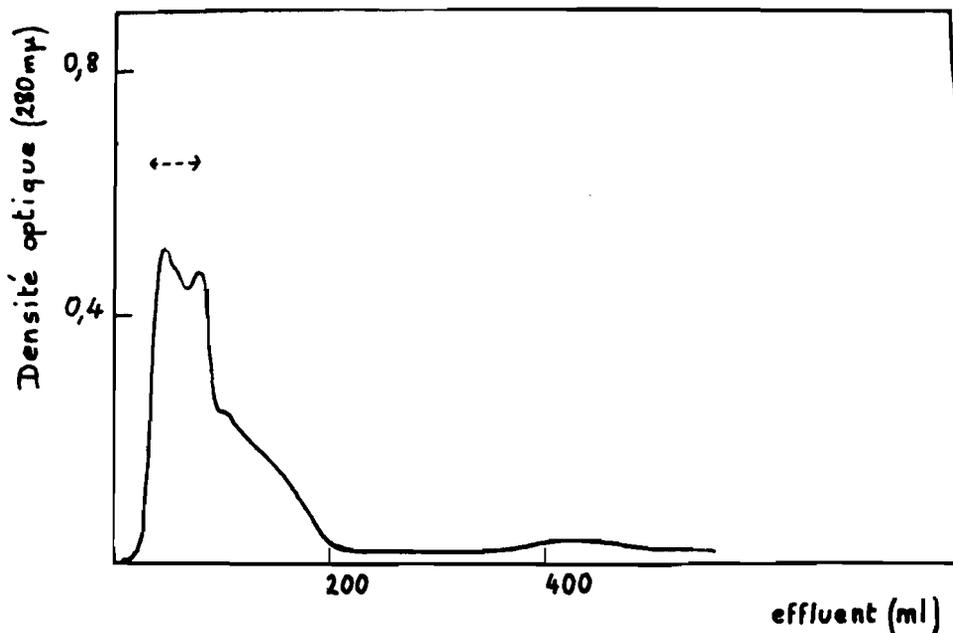


Figure 1

Chromatographie sur DEAE-Sephadex d'un extrait acétique (de telsons de *Buthus occitanus*).

Colonne de  $2 \times 18$  cm. Tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH 8,47.

↔ : position de la fraction toxique.

Dans un but préparatif, nous avons utilisé des colonnes de 5 cm de diamètre et de 95 cm de hauteur. Dans les premiers essais, la colonne était chargée avec une quantité de protéines correspondant environ à 2.200 unités  $DO_{280}^{1\%}$ , provenant de l'extraction par l'acide acétique 0,5 N de 20 g de telsons.

Dans ces conditions, nous avons remarqué que la pénétration de la solution protéique dans le support chromatographique s'accompagnait d'une diminution très importante du débit qui ne pouvait plus être compensée par une élévation de la pression hydrostatique exercée sur la colonne.

Ceci provenait, sans doute, d'un colmatage du sommet de la colonne par des molécules acides fixées irréversiblement sur le gel échangeur. La colonne ne pouvait ainsi servir qu'une fois. Pour pallier cet inconvénient, nous avons fait précéder la chromatographie proprement dite d'un stade préliminaire consistant à utiliser l'échangeur d'ions dans une opération en suspension.

Le lyophilisat correspondant à une extraction de 20 g de telsons est dissous dans 30 ml de tampon de chromatographie. On ajoute à

cette solution 100 ml d'une suspension de DEAE-Sephadex équilibrée dans un égal volume de tampon. Le mélange obtenu est agité et son pH ramené aux environs de 8,5 sous pH-mètre, par addition de quelques gouttes d'ammoniaque concentrée ; puis il est soumis à une agitation douce pendant 1 heure.

La suspension est versée sur un entonnoir à verre fritté et le filtrat est recueilli. Le gel échangeur est lavé par de fréquentes additions de 50 ml de solution tampon jusqu'à ce que le filtrat ait une absorption inférieure à 1 unité DO<sub>290</sub> par ml. Les filtrats rassemblés sont lyophilisés. Le lyophilisat, après dissolution dans 10 ml du tampon de chromatographie, est déposé sur la colonne. Les résultats d'une opération type sont représentés sur le tableau II.

**TABLEAU II**

Utilisation du DEAE-Sephadex « en suspension » (tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH : 8,47) pour la purification d'un extrait acétique de telsons de *Buthus occitanus*

	Quantité de protéines (en DO <sub>290</sub> )	Activité toxique (DL <sub>50</sub> )	ASdo
Extrait initial	3 210	48 144	15
Matériel non échangé	1 690	43 330	26

On en déduit que le rendement en activité toxique est excellent (90 %) ; par ailleurs le coefficient de purification n'est pas négligeable (1,7). Cependant le but recherché est surtout d'éliminer les protéines les moins basiques de l'extrait de telsons, responsables du colmatage irréversible des colonnes de chromatographie.

Ce résultat semble acquis puisque le rendement en protéines totales de l'opération en suspension est de 53 %. Effectivement, grâce à l'introduction de cette étape supplémentaire, le débit des colonnes de DEAE-Sephadex a pu être maintenu rigoureusement constant. De plus, la colonne, après lavage par 3 litres de tampon, peut être utilisée pour une nouvelle chromatographie.

#### F/ — Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Elle a été pratiquée selon la technique de ORNSTEIN [15] et DAVIS [16].

#### G/ — Lyophilisation

La concentration des solutions de protéines dans des milieux volatils a été réalisée par lyophilisation suivant les modalités indiquées par ailleurs [3].

## RÉSULTATS

### A — RAPPEL D'EXPERIENCES CONDUISANT A L'OBTENTION DES TOXINES I ET II.

Les toxines I et II des venins d'*Androctonus australis Hector* et de *Buthus occitanus tunetanus* ont été découvertes dans les venins de ces espèces soumis au traitement suivant : extraction aqueuse, rétention réversible sur Sephadex et chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50 en tampon Ac NH<sub>4</sub> 0,2 M de pH compris entre 6,7 et 6,8. C'est au cours de cette étape qu'apparaissent deux fractions toxiques qui ont été appelées I et II d'après leur ordre d'élu-tion de la colonne de chromatographie. Ces fractions correspondent à des pics de DO<sub>260</sub> bien définis ; leurs volumes d'émergence (très voisins pour les toxines homologues des deux espèces) sont caractéristiques [2, 3, 7]. Leur identification a été poussée plus loin par l'étude des propriétés physiques (comportement en électrophorèse et en ultracentrifugation) et chimiques (composition en amino-acides) [17, 4, 7].

Il existe donc, dans les venins de scorpions, deux toxines que l'on peut très simplement reconnaître par leur comportement chromatographique sur Amberlite qui est défini par deux types de données : a) une donnée qualitative : la confusion entre la courbe d'activité et la courbe de DO<sub>260</sub> ; — b) des données quantitatives : le volume d'émergence, l'activité spécifique et le rendement en toxicité (le rendement pour l'ensemble des deux fractions est au minimum de 50 %) - (figure 2 et tableau III).

### B — FORMES ABERRANTES DES TOXINES EXISTANT DANS LES BROYATS DE TELSONS.

#### I — Expériences préliminaires :

Trois types d'expériences, décrites en détail par ailleurs [7] avaient posé le problème de l'existence possible de formes aberrantes des toxines dans les extraits de telsons :

a) *récupération des toxines contenues dans la fraction 0 — 60 % du fractionnement acétonique* (Cf. paragraphe « Méthodes ») :

La fraction 0 — 60 % de la précipitation acétonique des extraits de telsons représentant généralement entre 20 et 30 % de l'activité initiale, des tentatives de récupération de la toxicité par un nouveau fractionnement entre 60 et 80 % de concentration en solvant ont été entreprises. Elles ont toujours échoué, aussi bien dans le cas d'*Androctonus* que dans celui de *Buthus*. Cette anomalie pourrait s'expliquer par la présence, dans la fraction 0 — 60 %, de formes toxiques distinctes des toxines I et II et résistant au fractionnement par l'acétone.

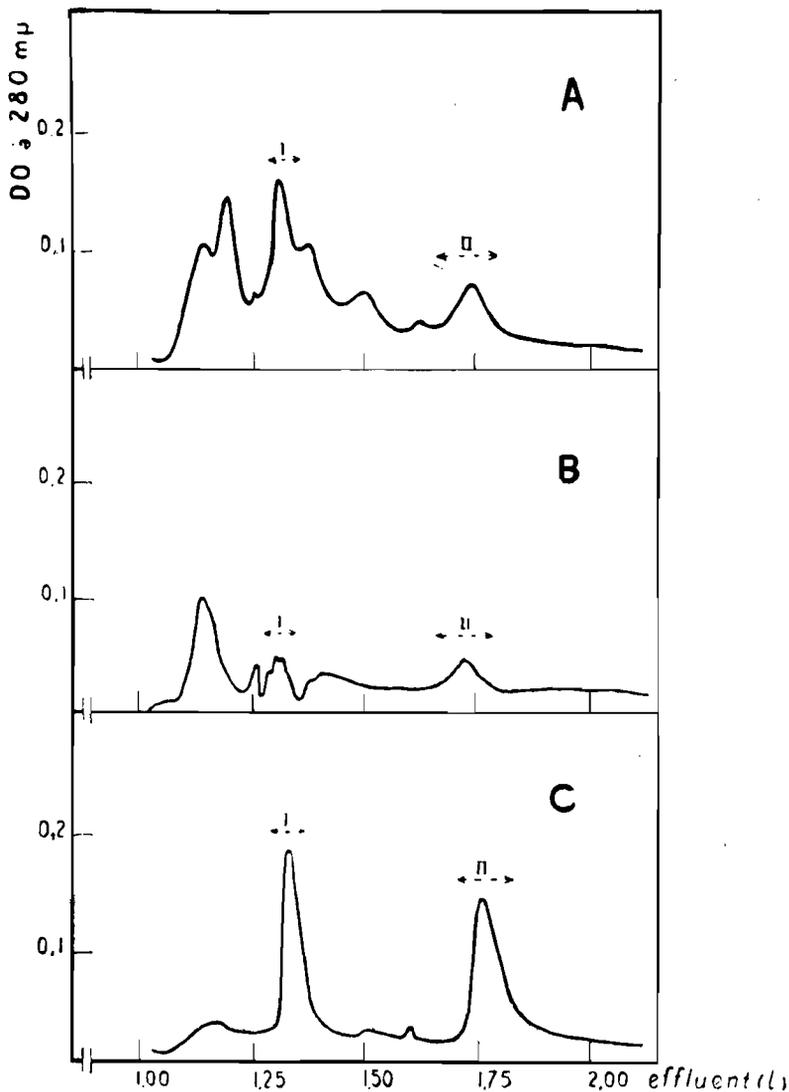


Figure 2 (Cf. Tableau III)

Chromatographie sur Amberlite CG-50 des toxines des venins de scorpions [7].

Colonne de  $4 \times 146$  cm. Tampon acétate d'ammonium 0,2 M, pH 6,78.

↔ : position des fractions toxiques.

Matériels de départ de la purification :

A : venin électrique de *Buthus*.

B : venin électrique d'*Androctonus*.

C : venin manuel d'*Androctonus*.

**TABLEAU III**

Chromatographie des toxines de scorpions sur Amberlite CG-50 en tampon acétate d'ammonium 0,2 M, pH : 6,78 (dimensions des colonnes : 4 × 146 cm) dans une méthode de purification à partir des venins décrite antérieurement [7].

Numéro des expériences	Matériel biologique de départ	Protéines totales (en DO <sub>280</sub> ) au départ	ASdo du matériel de départ	ASdo des fractions toxiques	Coefficient de purification	Toxicité éluee (en %)	Rapport des activités totales des 2 toxines II/I	Protéines totales éluees (en % de DO <sub>280</sub> )
77 (A*)	<u>Buthus</u> venin électrique	96	64	I : 162 II : 192	2,5 3,0	36 } 42 } 78	1,2	39
78 (B*)	<u>Androctonus</u> venin électrique	37	107	I : 506 II : 521	4,7 4,9	34 } 38 } 72	1,1	41
79 (C*)	<u>Androctonus</u> venin manuel	59	370	I : 556 II : 556	1,5 1,5	20 } 29 } 49	1,5	41

\* Référence figure 2.

b) *apparition éventuelle de toxicité sur la fraction de tête de la chromatographie d'équilibre en tampon  $\text{AcNH}_4$  0,5 M, pH : 5,60 :*

La chromatographie en tampon  $\text{AcNH}_4$  0,5 M, pH = 5,60 de la fraction 60 — 80 % de la précipitation acétonique de l'extrait par NaCl 0,15 M du broyat de telsons [3, 7] conduit généralement à la séparation de deux fractions : une fraction de tête inactive et une fraction toxique (figure 3).

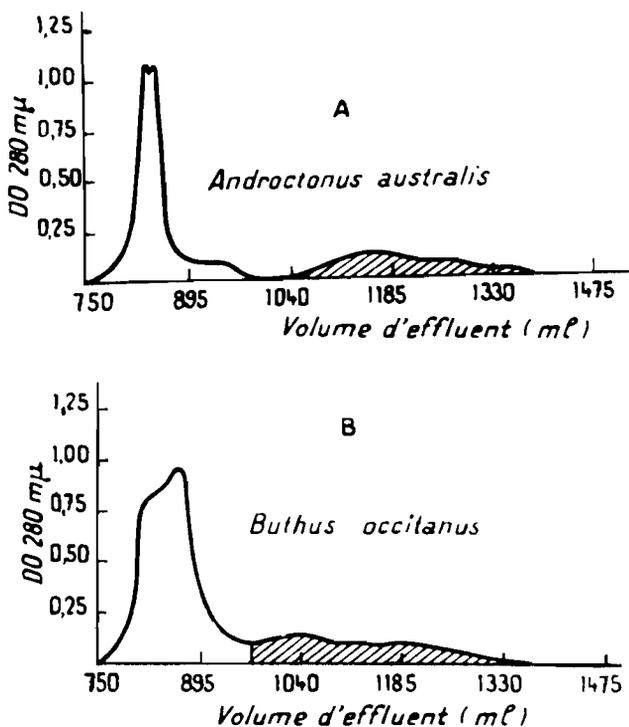


Figure 3

Chromatographie sur Amberlite CG-50 des neurotoxines d'*Androctonus australis* (A) et de *Buthus occitanus* (B). (Purification à partir des telsons).

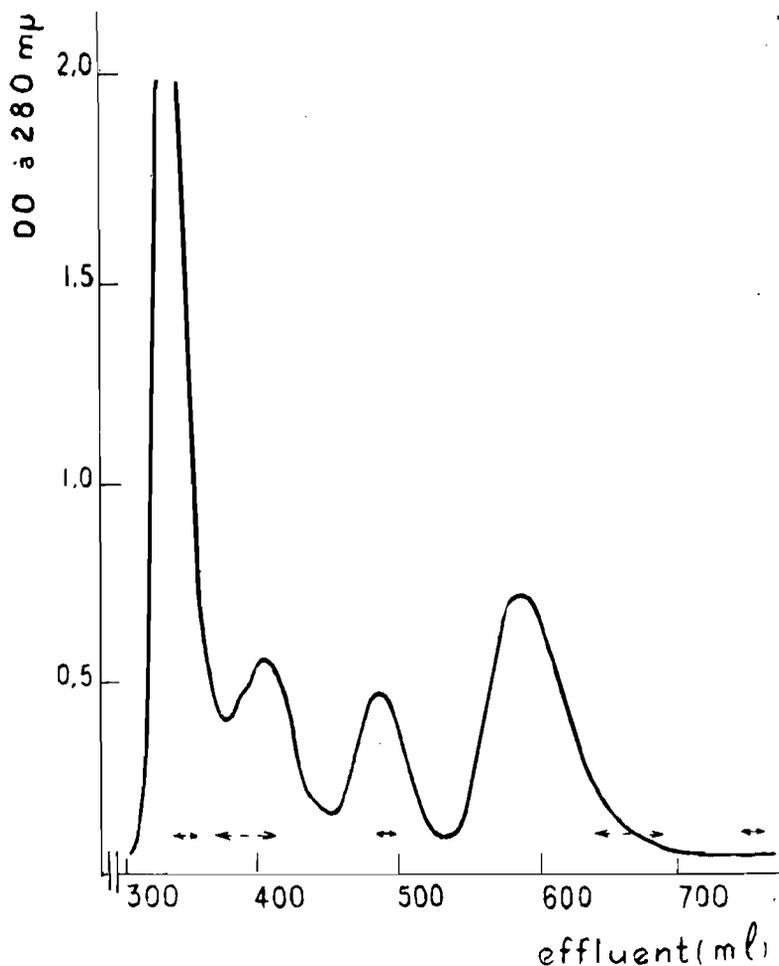
Colonnes de 4 × 110 cm. Tampon acétate d'ammonium 0,5 M, pH 5,60.

Les zones hachurées représentent les fractions toxiques.

Dans certains cas cependant (colonnes de chromatographie utilisées plusieurs fois de suite, colonnes trop chargées en protéines), on voit apparaître, au niveau du pic de tête, une deuxième fraction toxique ne représentant que quelques % de l'activité totale.

c) *chromatographie d'extraits sulfuriques :*

La chromatographie directe sur Amberlite après neutralisation, de solutions dans l'acide sulfurique dilué de lyophilisats d'extraits aqueux de telsons révèle l'existence d'un très grand nombre de fractions toxiques s'échelonnant tout au long de la courbe d'éluion (figure 4).



**Figure 4**

Chromatographie sur Amberlite CG-50 des toxines de *Buthus occitanus* provenant d'un extrait sulfurique. (Purification à partir des telsons) [7].

Colonne de  $4 \times 45$  cm. Tampon acétate d'ammonium 0,15 M, pH 6,78.

↔ : position des fractions toxiques.

L'échantillon soumis à la chromatographie correspond à l'extrait aqueux lyophilisé de 10 g de telsons — représentant 3500 DL<sub>50</sub> environ — dissous dans 8,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 N puis neutralisé par un volume de NH<sub>4</sub>OH 0,3 N.

## II — Essais systématiques d'isolement des toxines I et II dans les broyats de telsons de *Buthus occitanus*

### a) chromatographie directe sur Amberlite CG-50 :

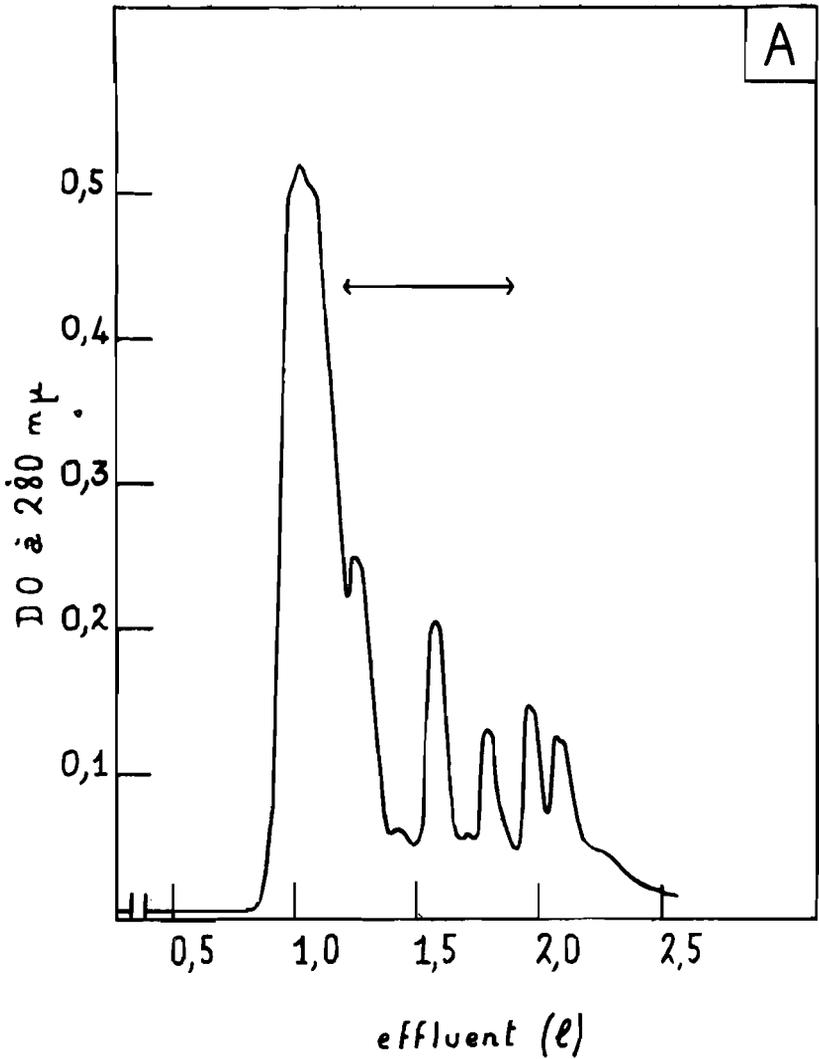
La tableau IV et la figure 5 montrent que la chromatographie directe sur Amberlite dans les conditions requises pour l'identification des toxines I et II possède peu d'analogies avec l'opération de référence représentée sur la figure 2, que l'extrait de telsons soit réalisé en milieu neutre ou en milieu acide.

**TABLEAU IV**

Chromatographie directe sur Amberlite CG-50 des extraits de telsons de *Buthus occitanus* (tampon AcNH<sub>4</sub> 0,2 M, pH. 6,70)

Désignation de l'opération	STADES DE LA PURIFICATION	Dimensions de la colonne de chromatographie (en cm)	Quantité de protéines soumise au fractionnement (en DO <sub>280</sub> )	No du fractionnement	Courbe représentative	Nombre et caractères des fractions obtenues par chromatographie	ASdo	Rendement en activité (en %)	
								par rapp. à l'étape précédente	par rapp. à l'étape initiale
1 a *	1 <sup>er</sup> stade : extraction du broyat de telsons par AcNH <sub>4</sub> 0,1 M						9		100
	2 <sup>e</sup> stade : chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50 en tampon AcNH <sub>4</sub> 0,2 M, pH : 6,70	4 × 146	311	46	Fig. 5-A	1 fraction : (correspondant à plusieurs pics de DO <sub>280</sub> ; toxicité diffuse)	non calculée	non calculés	
2 a *	1 <sup>er</sup> stade : extraction du broyat de telsons par AcNH <sub>4</sub> 0,1 M						7		100
	2 <sup>e</sup> stade : chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50 en tampon AcNH <sub>4</sub> 0,2 M, pH : 6,70	4 × 146	765	54	Fig. 5-B	2 fractions : fraction n° 1 fraction n° 2	13 8	5 3	5 3
3 a	1 <sup>er</sup> stade : extraction du broyat de telsons par AcOH 0,5 N						15		100
	2 <sup>e</sup> stade : chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50 en tampon AcNH <sub>4</sub> 0,2 M, pH : 6,70	4 × 146	154	47	Fig. 5-C	3 fractions : fraction n° 1 fraction n° 2 fraction n° 3	24 non calculées	17	17 non calculés

\* Ces 2 opérations sont rigoureusement identiques, sauf en ce qui concerne la quantité de protéines mise en jeu, ce qui peut expliquer les résultats différents de la chromatographie sur Amberlite (Cf. Discussion).



**Figure 5** (Cf. Tableau IV) :

Chromatographie directe sur Amberlite CG-50 des neurotoxines de *Buthus occitanus* (Purification à partir des telsons).

Colonnes de  $4 \times 146$  cm. Tampon acétate d'ammonium 0,2 M, pH 6,70.

↔ : position des fractions toxiques.

A : Nature du stade précédant l'opération : extraction du broyat de telsons par une solution d'acétate d'ammonium 0,1 M. Quantité de protéines soumise à la chromatographie : 311 unités  $DO_{280}$ .

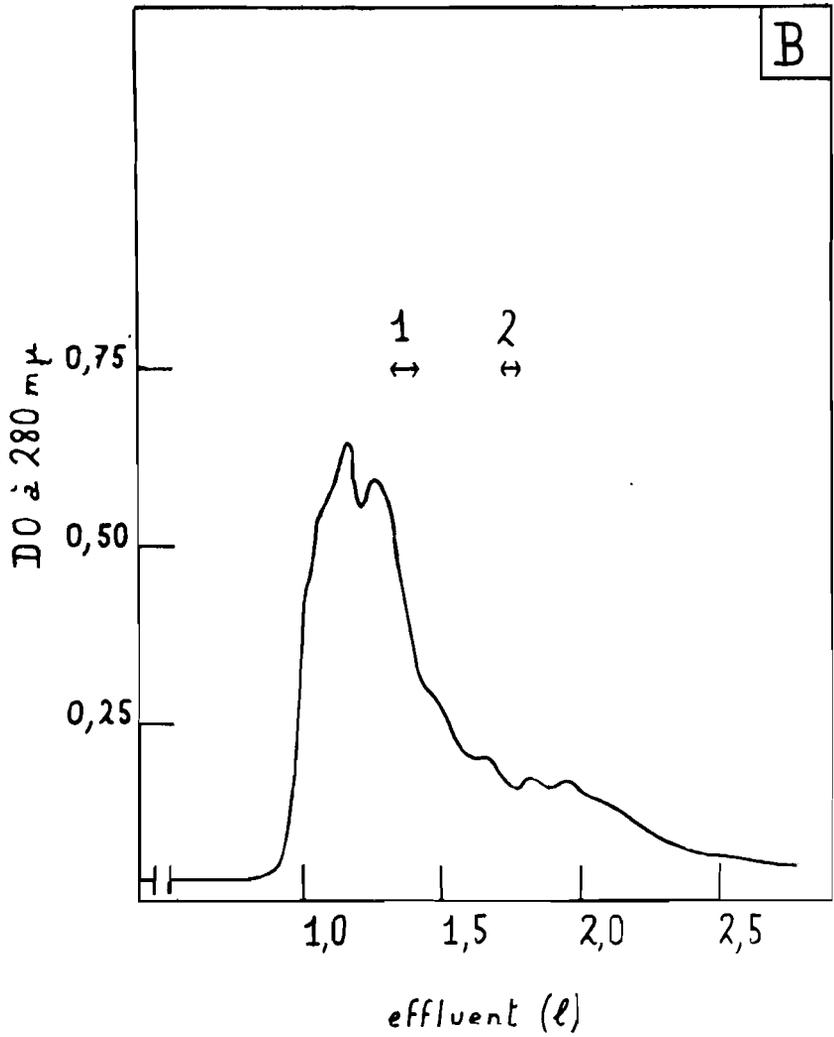


Figure 5

B : Nature du stade précédant l'opération : extraction du broyat de telsons par une solution d'acétate d'ammonium 0,1 M. Quantité de protéines soumise à la chromatographie : 765 unités  $DO_{280}$ .

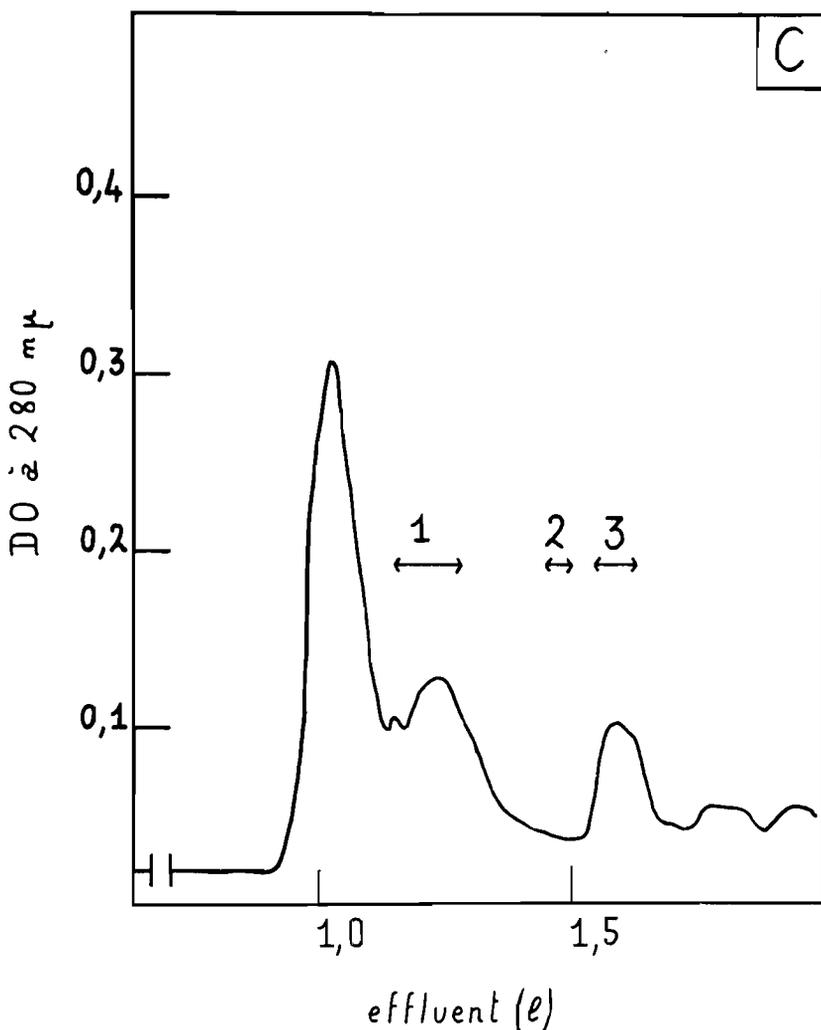


Figure 5

C : Nature du stade précédant l'opération : extraction du broyat de telsons par l'acide acétique 0,5 N. Quantité de protéines soumise à la chromatographie : 154 unités  $DO_{280}$ .

b) *chromatographie sur Amberlite CG-50 après une étape préliminaire de purification :*

Le tableau V et la figure 6 indiquent que l'introduction d'une étape de purification préliminaire n'améliore guère la chromatographie sur Amberlite dans les conditions de référence.

**TABLEAU V**

Chromatographie sur Amberlite CG-50 d'extraits toxiques provenant de telsons de **Buthus occitanus** après une étape préliminaire de purification (tampon de chromatographie : AcNH<sub>4</sub> 0,2 M, pH : 6,70)

STADES DE LA PURIFICATION	Dimen- sions de la colonne de chroma- togra- phie (en cm)	Quantité de protéi- nes sou- mise au fraction- nement (en DO <sub>280</sub> )	No du fraction- nement	Courbe représen- tative	Nombre et caractères des fractions obtenues par chromatographie	ASdo	Rendement en activité (en %)	
							par rapp. à l'étape précédente	par rapp. à l'étape initiale
<b>1<sup>er</sup> stade :</b>  extraction du broyat de telsons par un tampon AcNH <sub>4</sub> 0,1 M, pH : 8,37						7		100
<b>2<sup>e</sup> stade :</b>  suspension avec DEAE-Sephadex A-50 medium en tampon AcNH <sub>4</sub> 0,1 M, pH : 8,57						8	96	96
<b>3<sup>e</sup> stade :</b>  chromatographie d'équilibre sur Am- berlite CG-50 en tampon AcNH <sub>4</sub> 0,2 M, pH : 6,70	4 × 146	154	40	Fig. 6	1 fraction : (ne correspondant pas à un pic de DO <sub>280</sub> défini).	17	20	19

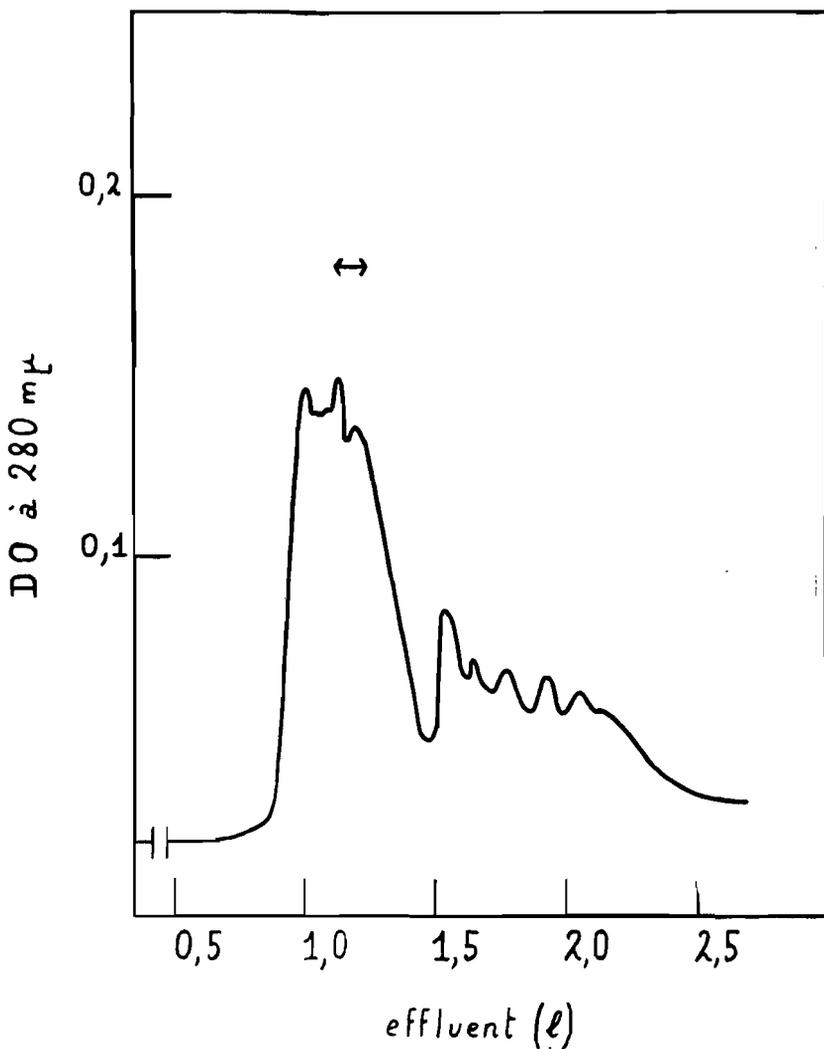


Figure 6 (Cf. Tableau V) :

Chromatographie sur Amberlite CG-50 des neurotoxines de *Buthus occitanus* après une étape préliminaire de purification (Purification à partir des telsons).

Colonne de  $2 \times 146$  cm. Tampon acétate d'ammonium 0,2 M, pH 6,70.

↔ : position de la fraction toxique.

c) purification jusqu'au stade de la chromatographie sur DEAE-Sephadex :

Le tableau VI concerne l'utilisation du DEAE-Sephadex en milieu alcalin successivement en suspension et en colonne. Les résultats sont très concordants, quel que soit le pH du milieu d'extraction (neutre, acide ou basique). Cette méthode conduit à l'obtention de deux fractions chromatographiquement distinctes (figure 7) totalisant entre 60 et 80 % de la toxicité mise en jeu au départ.

**TABLEAU VI**

Purification d'extraits toxiques provenant de telsons de *Buthus occitanus* jusqu'au stade de la chromatographie d'équilibre sur DEAE-Sephadex (tampon  $\text{AcNH}_4$  0,1 M, pH : 8,5).

Désignation de l'opération	STADES DE LA PURIFICATION	Dimensions de la colonne de chromatographie (en cm)	Quantité de protéines soumises au fractionnement (en $\text{DO}_{290}$ )	No du fractionnement	Courbe représentative	Nombre et caractères des fractions obtenues par chromatographie	ASdo	Rendement en activité (en %)	
								par rapp. à l'étape précédente	par rapp. à l'étape initiale
1 c	1 <sup>er</sup> stade : extraction du broyat de telsons par $\text{AcNH}_4$ 0,1 M						9		100
	2 <sup>e</sup> stade : suspension avec DEAE-Sephadex A-50 medium en tampon $\text{AcNH}_4$ 0,1 M, pH : 8,57						11	89	89
	3 <sup>e</sup> stade : chromatographie d'équilibre sur DEAE-Sephadex A-50 medium en tampon $\text{AcNH}_4$ 0,1 M, pH : 8,55	5 x 92	1.411	43		2 fractions : <u>fraction A</u> <u>fraction B</u>	49 27	56 23	50 20
3 c	1 <sup>er</sup> stade : extraction du broyat de telsons par $\text{AcOH}$ 0,5 N						11		100
	2 <sup>e</sup> stade : suspension avec DAEEA-Sephadex A-50 medium en tampon $\text{AcNH}_4$ 0,1 M, pH : 8,47						16	93	93
	3 <sup>e</sup> stade : chromatographie d'équilibre sur DEAE-Sephadex A-50 medium en tampon $\text{AcNH}_4$ 0,1 M, pH : 8,47	5 x 92	684	33	Fig. 7	2 fractions : <u>fraction A</u> <u>fraction B</u>	46 43	59 8	55 7

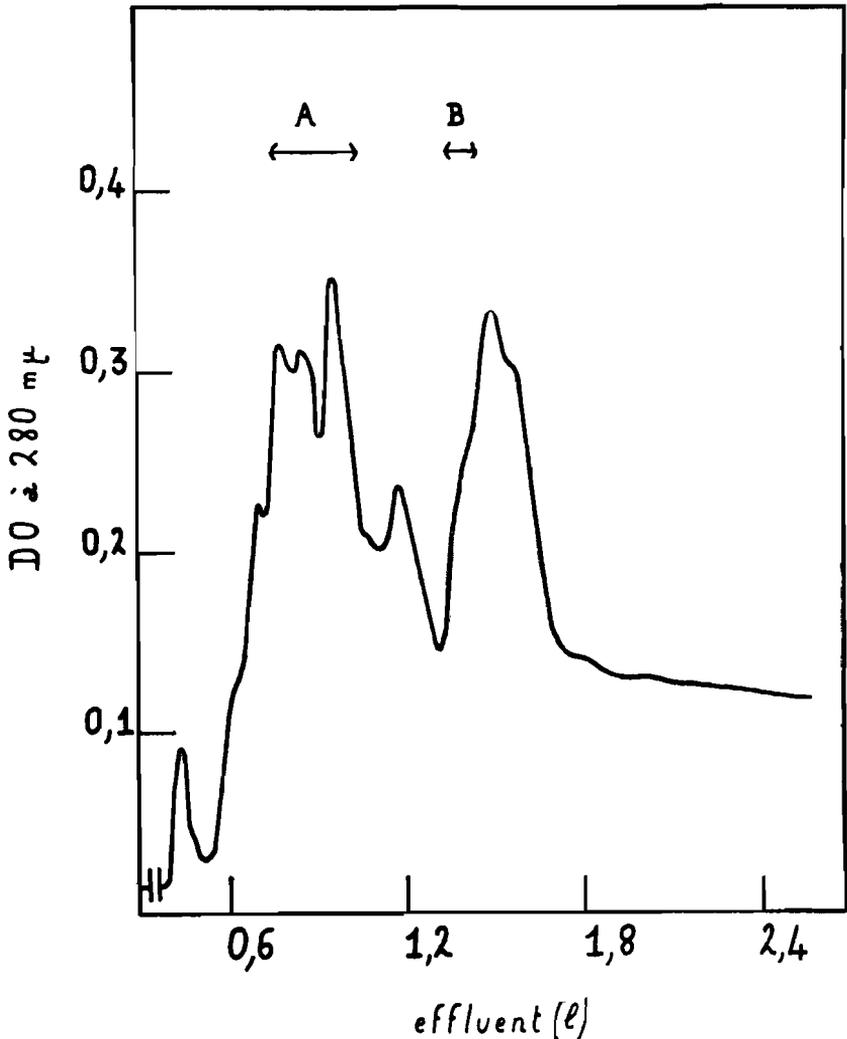


Figure 7 (Cf. Tableau VI) :

Chromatographie sur DEAE-Sephadex des neurotoxines de *Buthus occitanus*. (Purification à partir des telsons).

Colonne de 5 × 92 cm. Tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH 8,47.

↔ : position des fractions toxiques.

d) essais de purification des fractions A et B de la chromatographie sur DEAE-Sephadex :

Le tableau VII et la figure 8 ont trait à l'étude des deux fractions fournies par la chromatographie sur DEAE-Sephadex et appelées A et B d'après leur ordre d'éluion de la colonne. La fraction A, quelle que soit la méthode de purification utilisée, ne fournit jamais avec un rendement élevé une fraction de haute activité spécifique pour laquelle la courbe d'activité et la courbe de  $DO_{280}^{m\mu}$  soient confondues.

**TABEAU VII**

Essais de purification des fractions A et B de la chromatographie d'équilibre sur DEAE-Sephadex en tampon  $\text{AcNH}_4$  0,1 M, pH : 8,5.

STADES DE LA PURIFICATION	Dimen- sions de la colonne de chro- matogra- phie (en cm)	Quantité de protéi- nes sou- mise au fraction- nement (en $\text{DO}_{280}$ )	No du fraction- nement	Courbe repré- sentative	Nombre et caractères des fractions obtenues par chromatographie	ASdo	Rendement en activité (en %)		
							par rapp. à l'étape précédente	par rapp. à l'étape initiale	
<p>1<sup>er</sup> stade</p> <p>2<sup>e</sup> stade</p> <p>3<sup>e</sup> stade</p>									
Opération 1c (tableau VI)									
4 <sup>e</sup> stade									
<p>(sur la fraction A du frac. 43) : chromatographie d'équilibre sur Am- berlite CG-50 en tampon <math>\text{AcNH}_4</math> 0,2 M, pH : 6,70</p>	2 × 146	205	44	Fig. 8-A	3 fractions : (ne correspondant pas à des pics de $\text{DO}_{280}$ définis) : fraction n° 1 fraction n° 2 fraction n° 3	105 117 126	16 12 12	8 6 6	
<p>4<sup>e</sup> stade</p> <p>(sur la fraction B du frac. 43) : chromatographie d'équilibre sur Am- berlite CG-50 en tampon <math>\text{AcNH}_4</math> 0,2 M, pH : 6,70</p>	2 × 146	154	45	Fig. 8-B	1 fraction	90*	34	7	

\* Cette fraction, rechromatographiée dans les mêmes conditions, donne, avec un rendement proche de 100 %, un produit chromatographiquement homogène d'ASdo supérieure à 150, alors qu'aucune amélioration n'est réalisée par rechromatographie des fractions dérivées de la fraction A de la chromatographie sur DEAE-Sephadex (des résultats très comparables sont obtenus dans la purification des extraits totaux de venins — Cf. Tableau IX).

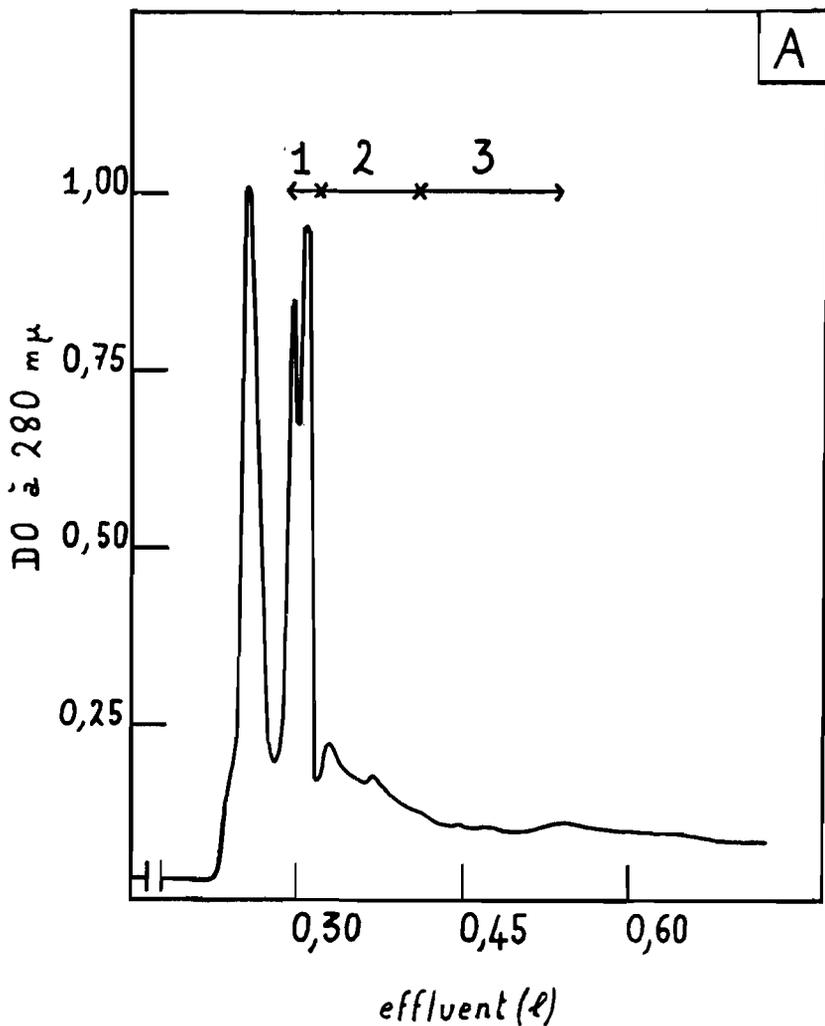


Figure 8 (Cf. Tableau VII) :

Chromatographie sur Amberlite CG-50 des fractions A et B provenant du traitement des neurotoxines de *Buthus occitanus* sur DEAE-Sephadex. (Purification à partir des telsons.

Colonnes de  $2 \times 146$  cm. Tampon acétate d'ammonium 0,2 M, pH 6,70.

$\leftrightarrow$  : position des fractions toxiques.

A : chromatographie de la fraction A.

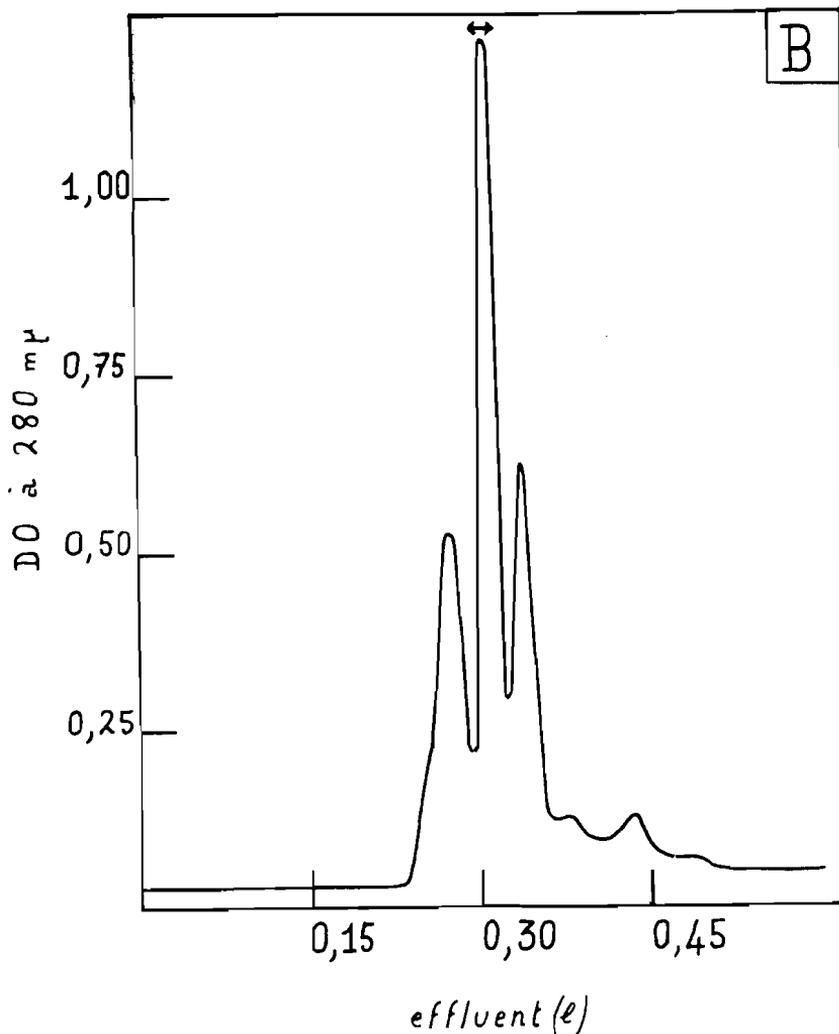


Figure 8

B : chromatographie de la fraction B.

Par contre, la fraction B qui s'identifie d'emblée à un pic de protéines en chromatographie sur Amberlite dans les conditions de référence (figure 8 — B) donne, par rechromatographie, une fraction homogène d'ASdo comprise entre 150 et 200 [8]. D'autres résultats détaillés concernant la purification de la fraction A de l'opération sur DEAE-Sephadex ont été décrits également dans le travail cité [8].

e) *chromatographie sur Amberlite CG-50 en tampons phosphates de sodium :*

Enfin, le tableau VIII et la figure 9 indiquent que l'emploi de solutions de force ionique élevés comme les tampons phosphates ne semble pas devoir résoudre ce problème.

**TABLEAU VIII**

Chromatographie sur Amberlite CG-50 d'extraits toxiques provenant de telsons de *Buthus occitanus* en tampon phosphates de sodium.

STADES DE LA PURIFICATION	Dimen- sions de la colonne de chroma- togra- phie (en cm)	Quantité de protéi- nes sou- mise au fraction- nement (en DO <sub>280</sub> )	No du fraction- nement	Courbe repré- sentative	Nature et caractères des fractions obtenues par chromatographie	ASdo	Rendement en activité (en %)	
							par rapp. à l'étape précédente	par rapp. à l'étape initiale
<u>1<sup>er</sup> stade :</u>  extraction du broyat de telsons par NaCl 0,15 M						4		100
<u>2<sup>e</sup> stade :</u>  fractionnement acétonique entre 60 et 80 % de concentration en acétone						17	46	46
<u>3<sup>e</sup> stade :</u>  chromatographie d'équilibre sur Am- berlite CG-50 en tampon phosphates de sodium 0,1 M, pH : 6,80	2 x 146	63	63	Fig. 9	1 fraction (ne correspondant pas à un pic de DO <sub>280</sub> défini)	47	45	21

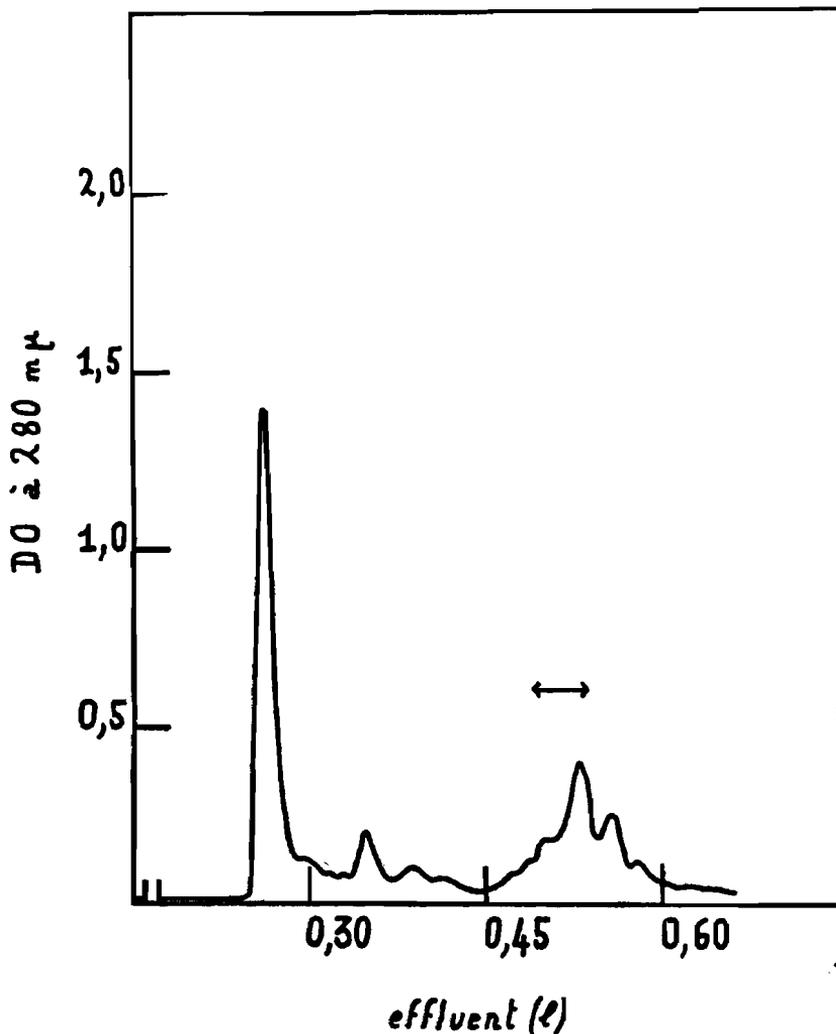


Figure 9 (Cf. Tableau VIII) :

Chromatographie sur Amberlite CG-50 des neurotoxines de *Buthus occitanus*.  
(Purification à partir des telsons).

Colonne de  $2 \times 146$  cm. Tampon phosphates de sodium 0,1 M, pH 6,80.

↔ : position de la fraction toxique.

### C — FORMES ABERRANTES DES TOXINES POUVANT SE RENCONTRER DANS DES EXTRAITS DE VENINS :

#### I — Reconstitution de conditions voisines de celles existant dans des extraits de telsons :

La différence essentielle entre les venins et les broyats de telsons consiste dans l'abondance relative des protéines non toxiques chez ces

derniers. Nous avons essayé de reproduire, avec les venins, des conditions comparables en nous adressant au venin électrique, d'activité spécifique inférieure à celle du venin manuel. Nous avons réalisé, à partir du venin électrique, un extrait protéique total grâce à l'emploi, comme solvant du venin, non pas de l'eau pure qui n'en dissout qu'une partie (dont les toxines) mais du tampon de la chromatographie sur Amberlite (tampon  $\text{AcNH}_4$  0,2 M, pH 6,70) dans lequel il est presque entièrement soluble.

Les résultats sont légèrement différents suivant l'espèce dont on utilise le venin :

a) *venin de Buthus* :

Les résultats d'une expérience complète de purification conduite sur l'extrait total de venin électrique de *Buthus* dans le tampon  $\text{AcNH}_4$  0,2 M, pH 6,70 sont représentés sur le tableau IX et la figure 10.

La première chromatographie sur Amberlite réalisée dans les conditions de référence (tampon  $\text{AcNH}_4$  0,2 M, pH 6,70) ne donne qu'une seule fraction toxique et un mauvais rendement en toxicité (33 %). En fin de purification, on retrouve très peu de toxine I (1 %) et aucune trace de toxine II : en effet la fraction A de la chromatographie sur DEAE-Sephadex a un volume d'émergence qui correspond à celui de la fraction A fournie par les broyats de telsons ; il est très différent de celui de la toxine II qui, sur DEAE-Sephadex, sort après la toxine I dont le volume d'émergence est le même que celui de la fraction B (voir plus loin au paragraphe C — III). La fraction A, élue du DEAE--Sephadex et soumise à la chromatographie sur Amberlite dans les mêmes conditions que la fraction B, donne une fraction toxique représentant 1 % de la toxicité totale mise en jeu au départ. Cette fraction recouvre deux pics de  $\text{DO}_{260}$  dont les sommets sont situés en arrière du sommet de la toxine I (volumes d'émergence 348 et 335 ml) mais nettement en avant de celui de la Toxine II qui, dans un tampon  $\text{AcNH}_4$  0,2 M, pH 6,70 (où l'échange est moins bon qu'à pH 6,30) a un volume d'émergence, pour le sommet du pic, qui se situe aux environs de 440 ml. Par conséquent, la fraction A obtenue à partir des venins est très comparable à la fraction A fournie par les broyats de telsons et dont il a été impossible d'extraire la toxine II, quelle que soit la méthode utilisée (voir plus haut paragraphe B — II).

b) *venin d'Androctonus* :

La première chromatographie sur Amberlite d'un extrait total de venin dans le tampon  $\text{AcNH}_4$  (fig. 11) quoique ressemblant fort peu à la chromatographie de référence représentée sur la fig. 2, permet toutefois, dès ce stade, d'obtenir la séparation de deux fractions toxiques I et II, ce qui n'avait pu être réalisé avec le venin de *Buthus* (fig. 10 — A). De même, le rendement en toxicité de l'opération est nettement meilleur (44 % contre 33 %).

**TABEAU IX**

Purification d'un extrait total de venin électrique de *Buthus occitanus*.

STADES DE LA PURIFICATION	Dimen- sions de la colonne de chro- matogra- phie (en cm)	Quantité de protéi- nes sou- mise au fraction- nement (en DO <sub>280</sub> )	No du fraction- nement	Courbe repré- sen- tative	Nombre et caractères des fractions obtenues par chromatographie	ASdo	Rendement en activité (en %)	
							par rapp. à l'étape précédente	par rapp. à l'étape initiale
1 <sup>er</sup> stade. — dissolution du venin dans le tampon AcNH <sub>4</sub> 0,2 M, pH : 6,70						40		100
2 <sup>e</sup> stade. — chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50 en tampon AcNH <sub>4</sub> 0,2 M, pH : 6,70	4 × 146	946	I - b	Fig. 10-A	1 fraction (ne correspondant pas à un pic de DO <sub>280</sub> défini)	68	33	33
3 <sup>e</sup> stade. — rétention réversible sur Sephadex G-25 en perles, gros grain (éluants : H <sub>2</sub> O puis AcNH <sub>4</sub> 0,1 M)	5 × 95	188	II - b	Fig. 10-B	1 fraction	86	47	16
4 <sup>e</sup> stade. — chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50 en tampon AcNH <sub>4</sub> 0,2 M, pH : 6,70	2 × 146	70	III - b	Fig. 10-C	1 fraction	117	71	11
5 <sup>e</sup> stade. — chromatographie d'équilibre sur DEAE-Sephadex A-50 medium en tampon AcNH <sub>4</sub> 0,1 M, pH : 8,50	3 × 78	37	IV - b	Fig. 10-D	2 fractions <b>fraction A</b> <b>fraction B</b>	114 140	53 17	6 2
6 <sup>e</sup> stade (sur la fraction B du fractionnement IV-b). — chromatographie d'équilibre sur Am- berlite CG-50 en tampon AcNH <sub>4</sub> 0,2 M, pH : 6,30.	2 × 146	5	V - b	Fig. 10-E	1 fraction	196	45	1
6 <sup>e</sup> stade (sur la fraction A du fractionnement IV-b). — chromatographie d'équilibre sur Am- berlite CG-50 en tampon AcNH <sub>4</sub> 0,2 M, pH : 6,30.	2 × 146	20	VI - b	Fig. 10-F	1 fraction (ne correspondant pas à un pic de DO <sub>280</sub> défini)	110	17	1

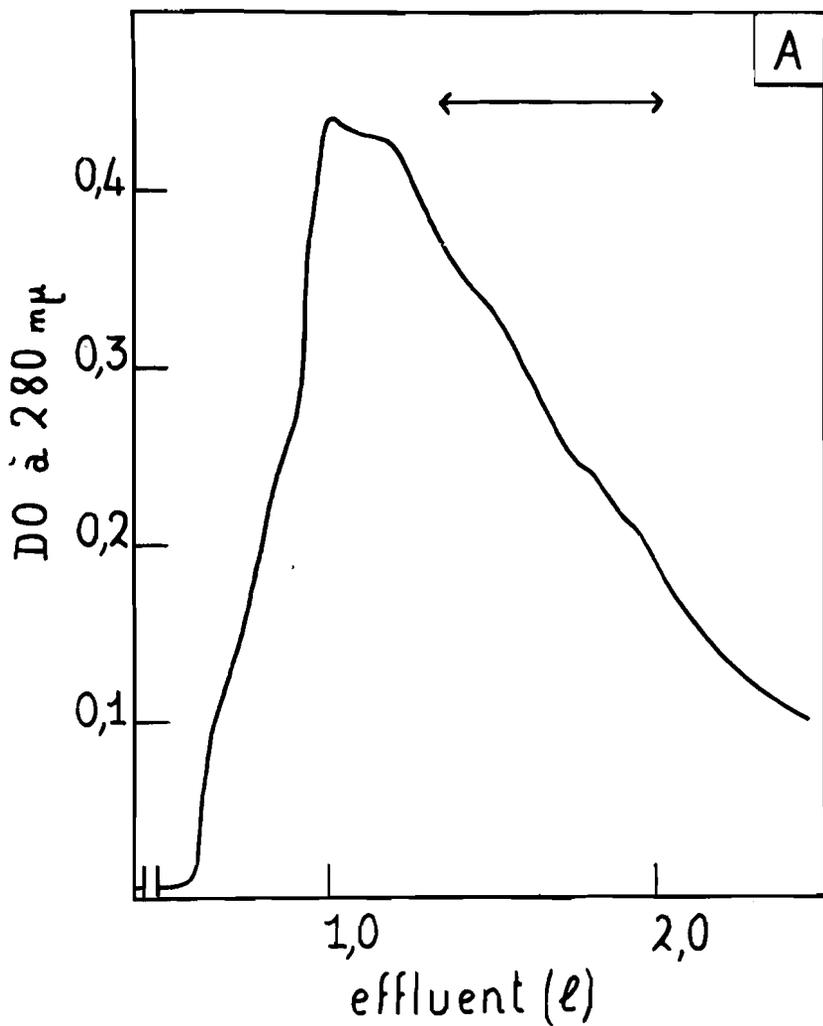


Figure 10 (Cf. Tableau IX) :

Purification d'un extrait total de venin électrique de *Buthus occitanus*.

A : chromatographie sur Amberlite CG-50.

Colonne de  $4 \times 146$  cm. Tampon acétate d'ammonium 0,2 M, pH 6,70.

↔ : position de la fraction toxique.

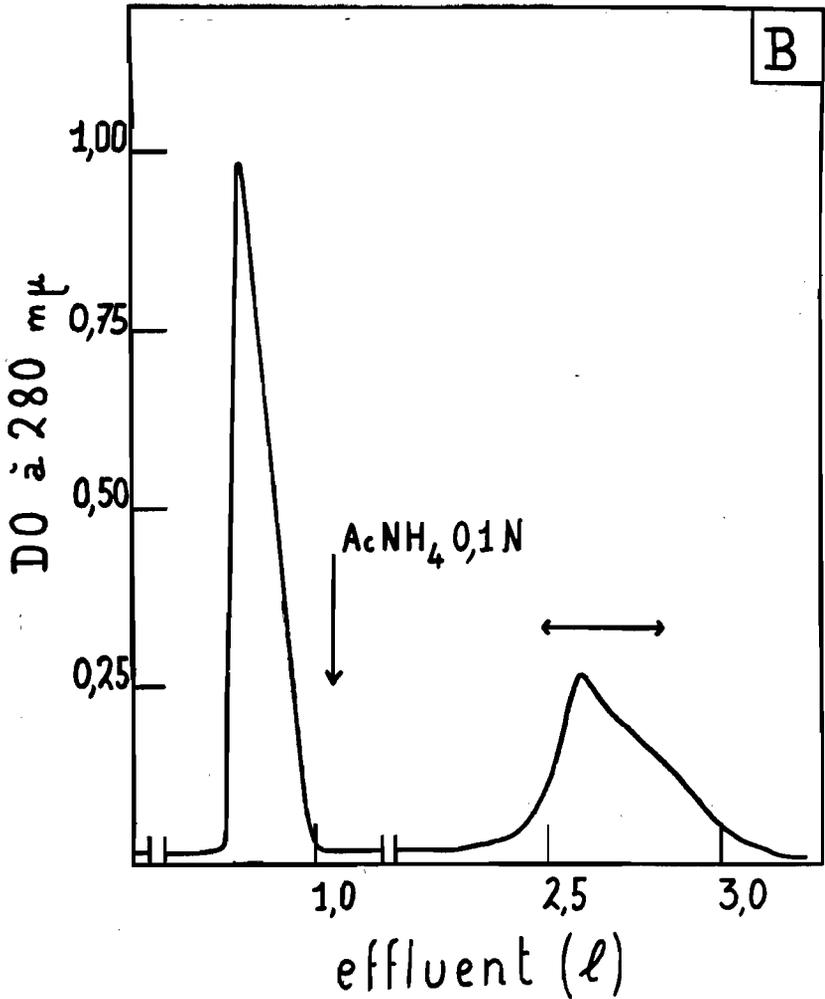
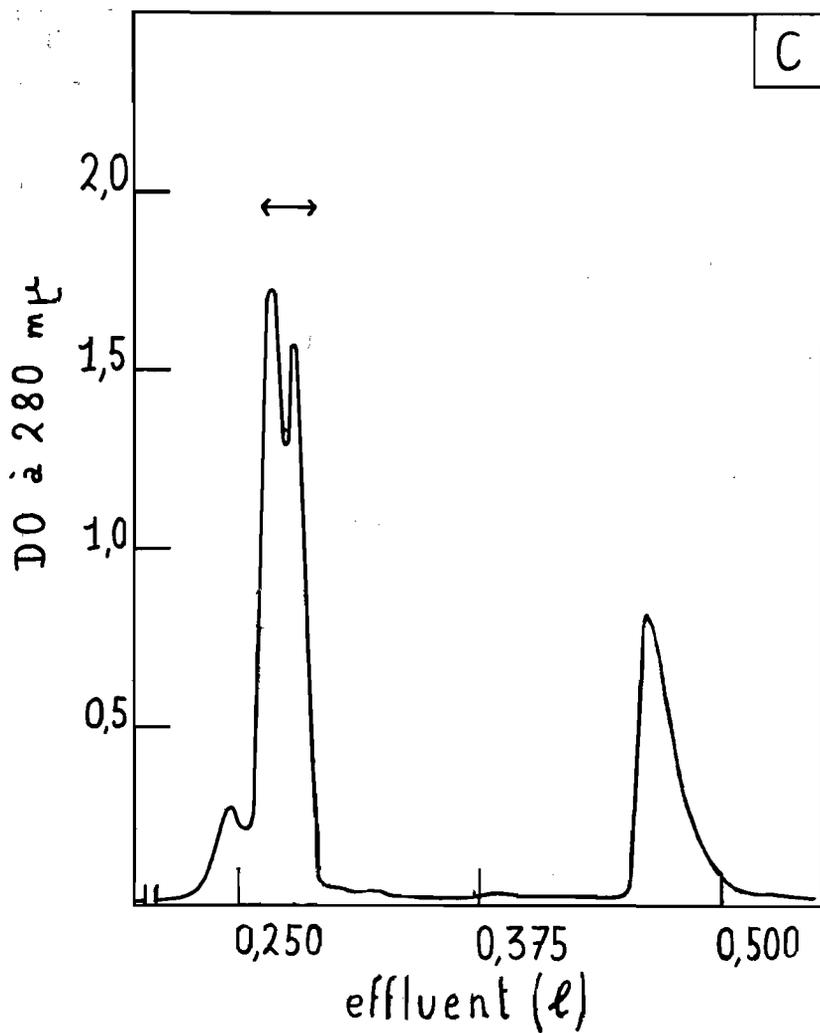


Figure 10

B : rétention réversible sur Sephadex G-25 de la fraction toxique obtenue dans l'opération précédente (figure 10 — A).

Colonne de  $5 \times 95$  cm. Eluants : eau puis solution d'acétate d'ammonium 0,1 M (la flèche verticale indique l'instant où la solution saline est appliquée au sommet de la colonne).

↔ : position de la fraction toxique.

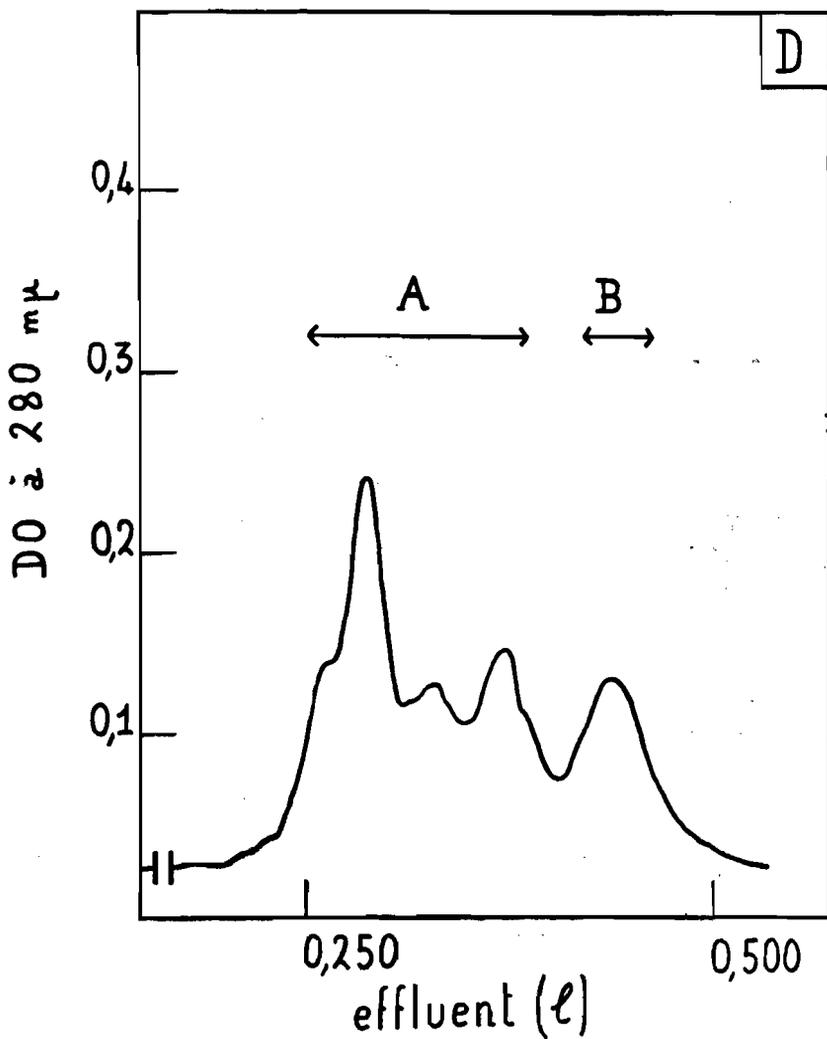


**Figure 10**

C : chromatographie sur Amberlite CG-50 de la fraction toxique obtenue dans l'opération précédente (figure 10-B).

Colonne de  $2 \times 146$  cm. Tampon acétate d'ammonium 0,2 M, pH 6,70.

↔ : position de la fraction toxique.

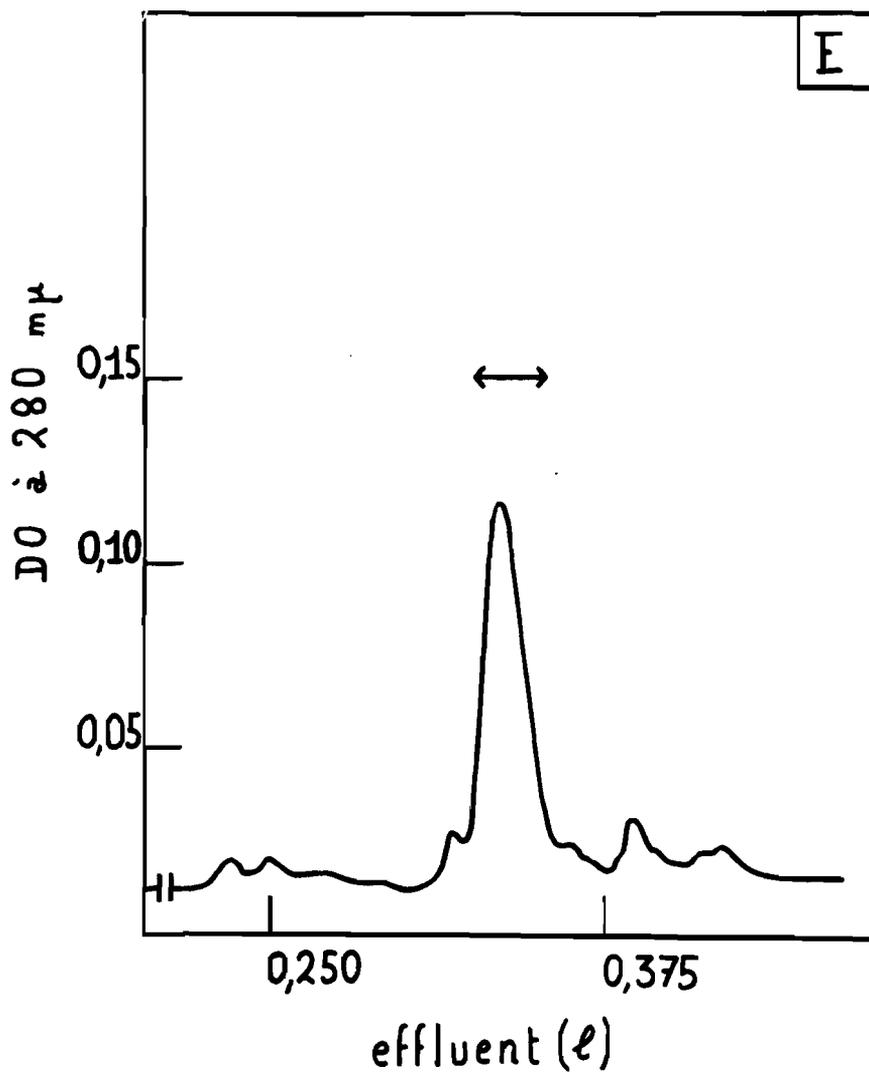


**Figure 10**

D : chromatographie sur DEAE-Sephadex de la fraction toxique obtenue dans l'opération précédente (figure 10-C).

Colonne de  $3 \times 78$  cm. Tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH 8,50.

↔ : position des fractions toxiques.

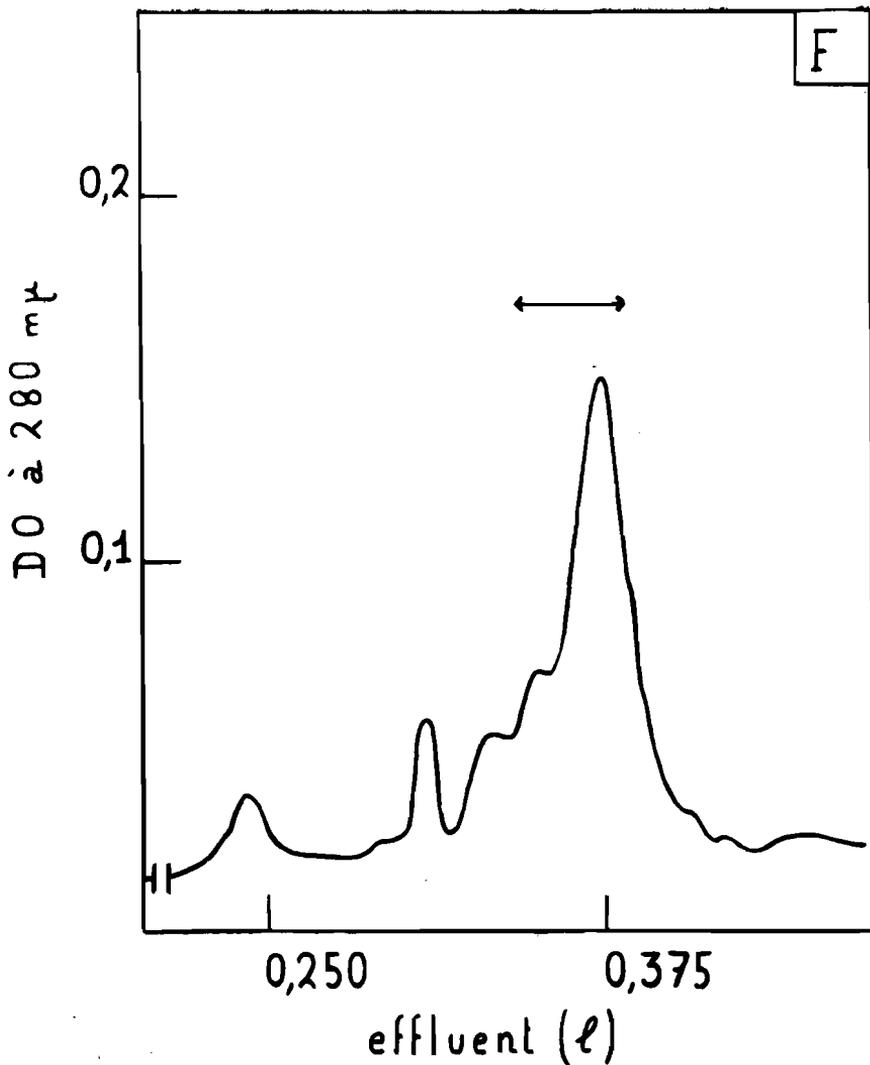


**Figure 10**

E : chromatographie sur Amberlite CG-50 de la fraction B de l'opération précédente (figure 10-D).

Colonne de  $2 \times 146$  cm. Tampon acétate d'ammonium 0,2 M, pH 6,30.

$\leftrightarrow$  : position de la fraction toxique.

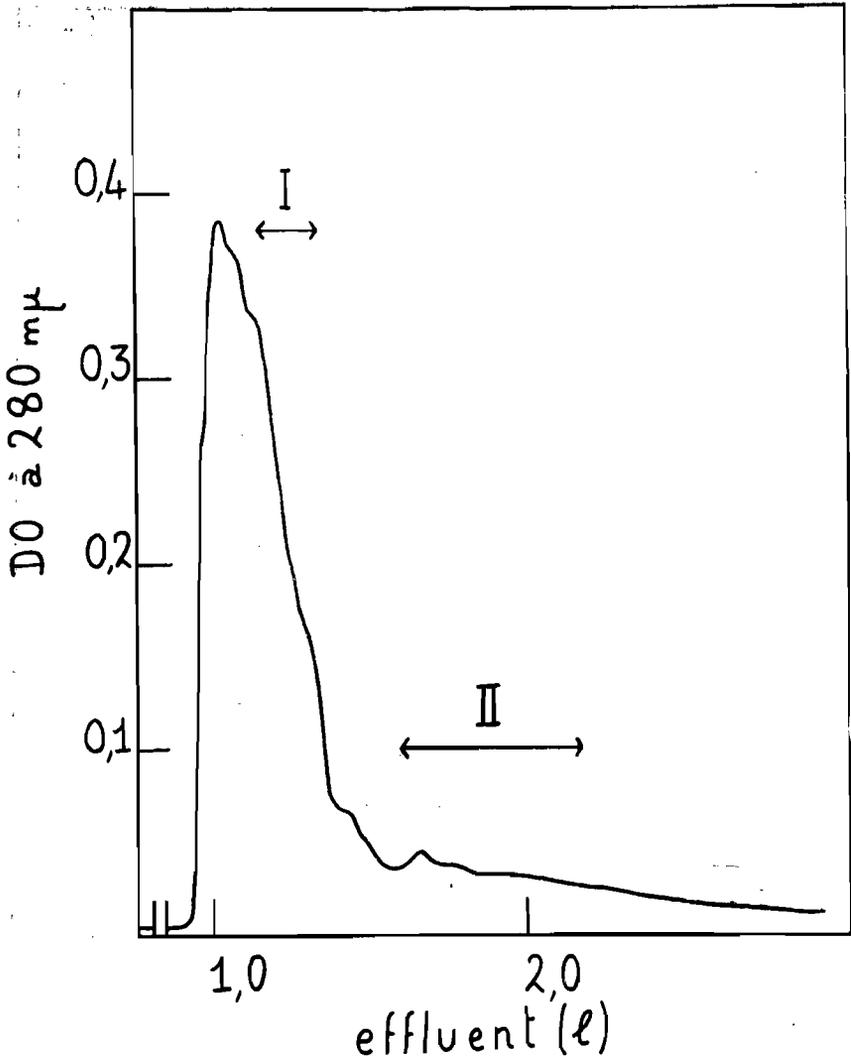


**Figure 10**

F : chromatographie sur Amberlite CG-50 de la fraction A de l'éluion sur DEAE-Sephadex (figure 10-D).

Colonne de  $2 \times 146$  cm. Tampon acétate d'ammonium 0,2 M, pH 6,30.

↔ : position de la fraction toxique.



**Figure 11**

Chromatographie sur Amberlite CG-50 d'un extrait total de venin électrique d'*Androctonus australis*.

Colonne de  $4 \times 146$  cm. Tampon acétate d'ammonium 0,2 M, pH 6,70.

↔ : position des fractions toxiques.

En fin de purification, on obtient davantage de toxine I (3 % contre 1 %) et un peu de toxine II (1 % contre 0 %).

**II — Apparition d'une troisième fraction toxique en chromatographie sur Amberlite dans les conditions de référence (tampon  $\text{AcNH}_4$  0,2 M, pH 6,70) :**

Le tableau X et la figure 12 montrent qu'il peut apparaître une fraction toxique supplémentaire dans la chromatographie sur Amberlite pratiquée dans les conditions de référence qui permettent l'individualisation des toxines I et II.

**TABLEAU X**

Conditions d'apparition, dans la purification du venin d'*Androctonus australis*, d'une fraction toxique supplémentaire située au niveau du pic frontal d'éluion de la chromatographie sur Amberlite CG-50 en tampon  $\text{AcNH}_4$  0,2 M, pH : 6,70 (colonnes de  $4 \times 146$  cm).

N° du fractionnement	Poids de venin sec correspondant (en mg)	Nature de l'opération précédant la chromatographie sur Amberlite	Courbe représentative	FRACTION TOXIQUE SUPPLEMENTAIRE			
				Présence	Importance (en ml d'éluant)	ASdo	Activité totale de cette fraction (en % de la toxicité mise en jeu au départ)
XXVII - a	800	rétention réversible sur Sephadex	fig. 12-A	0			
XXXII - a	1.000	rétention réversible sur Sephadex		+	84	31	1
6 - a	1.000	filtration moléculaire sur Sephadex	fig. 12-B	+	79	29	2
8 - a	500	filtration moléculaire sur Sephadex		+	11	non calculées	

\* Dimensions des colonnes :  $5 \times 95$  cm ; éluants pour la rétention réversible, eau puis acétate d'ammonium ; pour la filtration moléculaire, acétate d'ammonium 0,1 M.

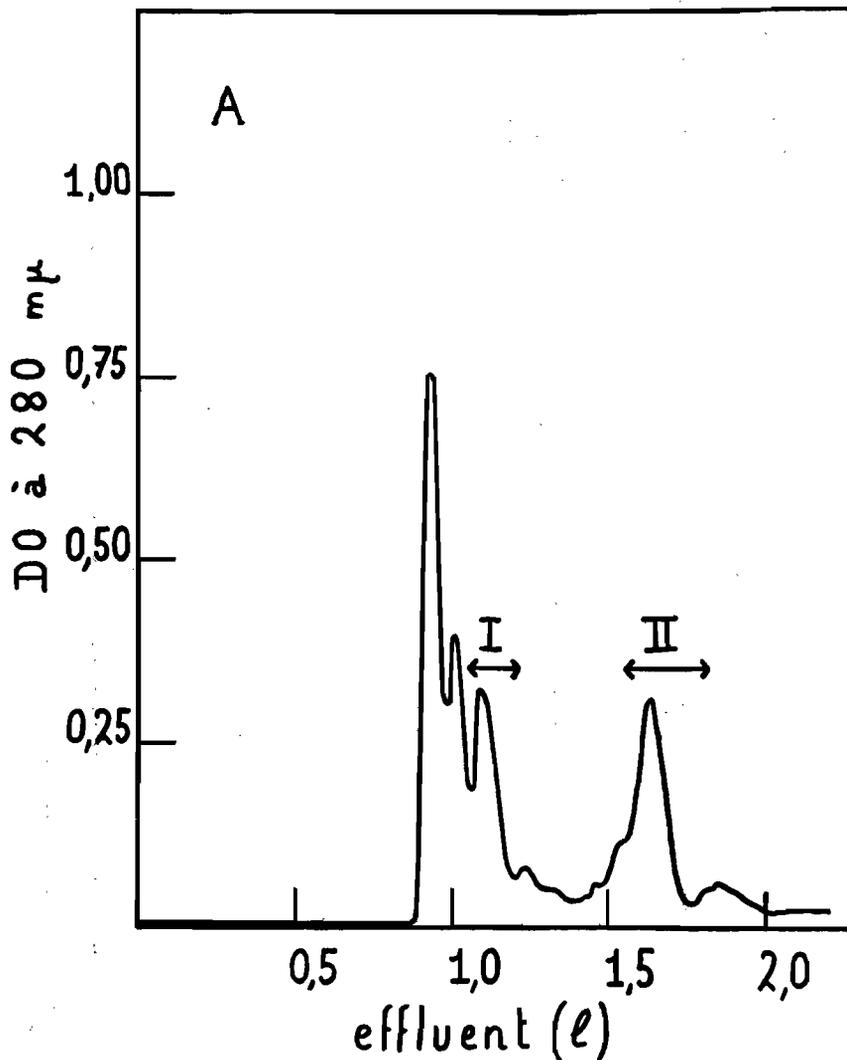


Figure 12 (Cf. Tableau X) :

Chromatographie sur Amberlite CG-50 des neurotoxines d'*Androctonus australis*.  
(Purification à partir du venin électrique).

Colonne de  $4 \times 146$  cm. Tampon acétate d'ammonium 0,2 M, pH 6,70.

A : opération réalisée à partir de 800 mg de venin soumis au préalable à une rétention réversible sur Sephadex.

↔ : positions des fractions toxiques I et II.

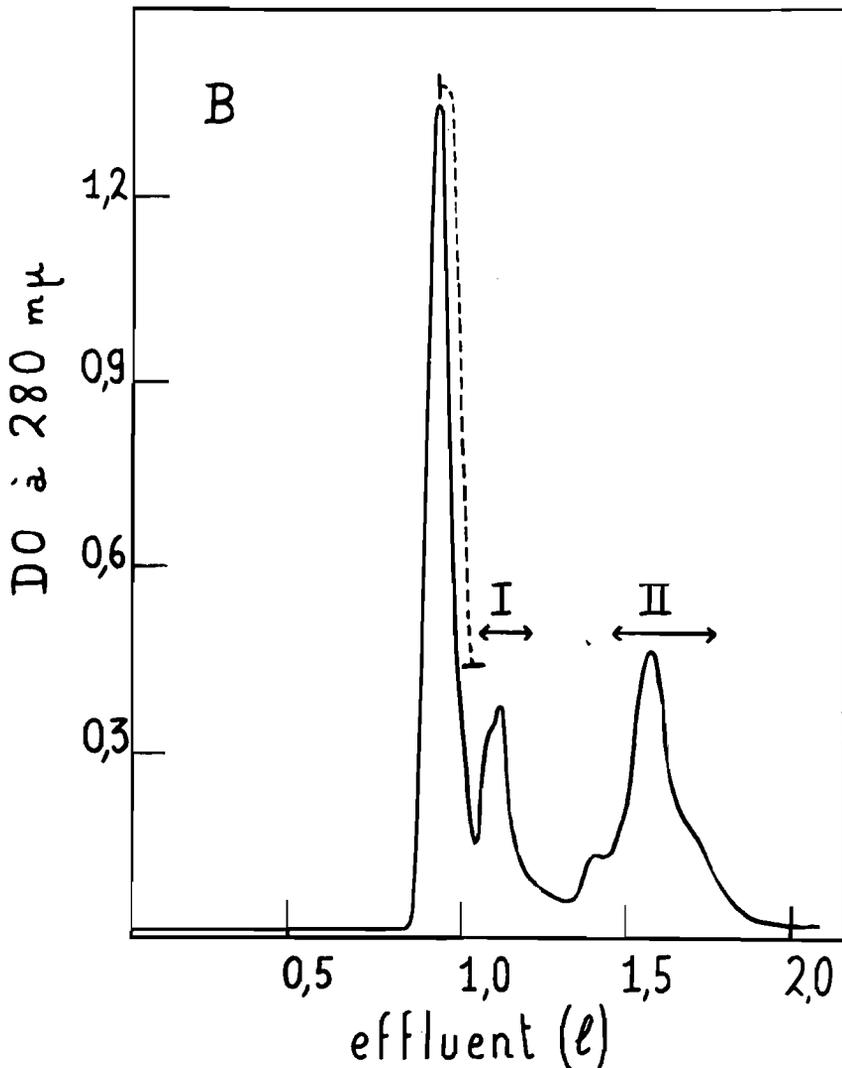


Figure 12

B : opération réalisée à partir de 1 g de venin soumis au préalable à une filtration moléculaire sur Sephadex.

↔ : positions des fractions toxiques I et II.

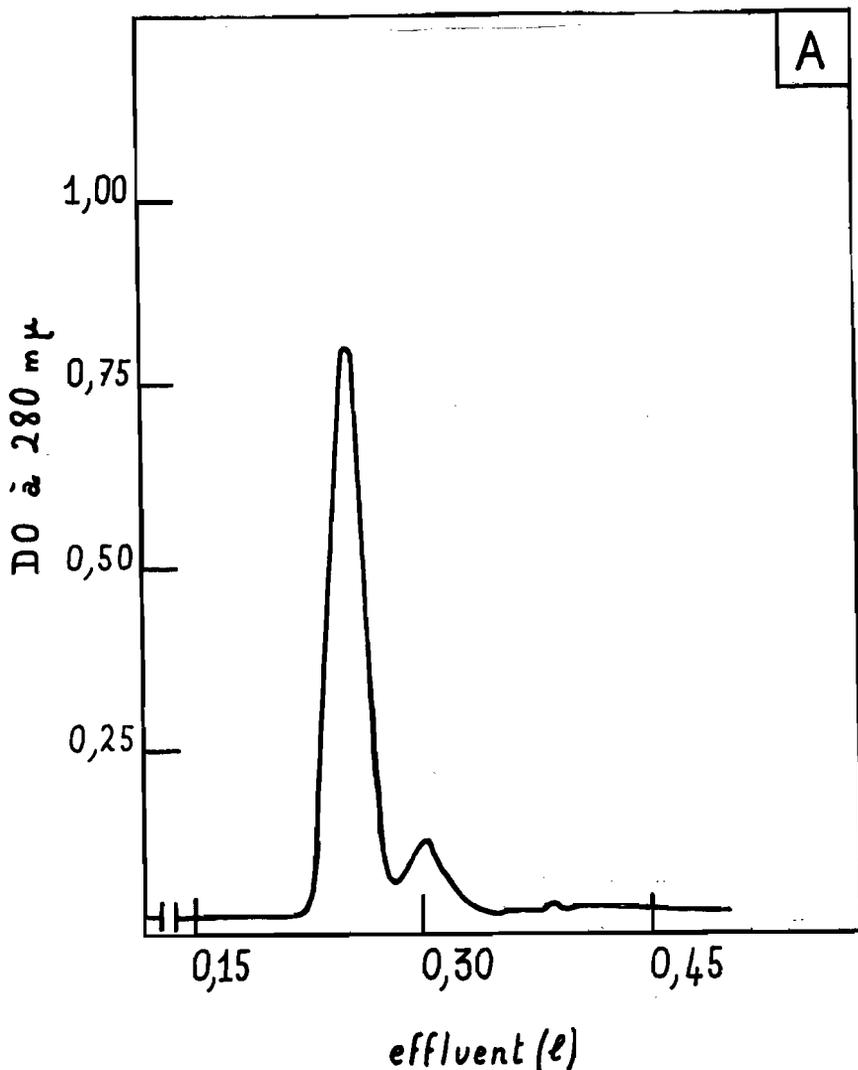
..... : position de la fraction toxique supplémentaire.

Cette fraction toxique, contrairement aux deux précédentes, ne se confond pas avec un pic de  $DO_{280}$  mais s'étend plus ou moins largement sur le flanc du premier pic des protéines. Deux facteurs interviennent dans l'apparition et l'importance de cette fraction supplémentaire qui ne représente jamais plus de 2 % de la toxicité mise en jeu au départ de l'opération : la nature de l'extrait soumis à la chromatographie (le fractionnement XXVII-a provient d'une rétention réversible sur Sephadex, tandis que le fractionnement 8-a provient d'une filtration moléculaire sur le même support) ; la quantité de protéines soumises à la

chromatographie (le fractionnement 6-a met en jeu deux fois plus de protéines que le fractionnement 8-a).

### III — Associations moléculaires rencontrées en chromatographie d'équilibre sur DEAE-Sephadex :

La figure 13 montre la courbe d'éluion des protéines au cours de la chromatographie des fractions toxiques I et II provenant elles-mêmes d'une chromatographie d'équilibre sur Amberlite réalisée dans les conditions de référence.



**Figure 13**

Chromatographie sur DEAE-Sephadex des fractions toxiques I et II provenant de la chromatographie sur Amberlite CG-50 des neurotoxines d'*Androctonus australis* — Cf. figure 12-A. (Purification à partir du venin électrique).

Colonnes de 3 × 78 cm. Tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH 8,50.

A : chromatographie de la toxine I.

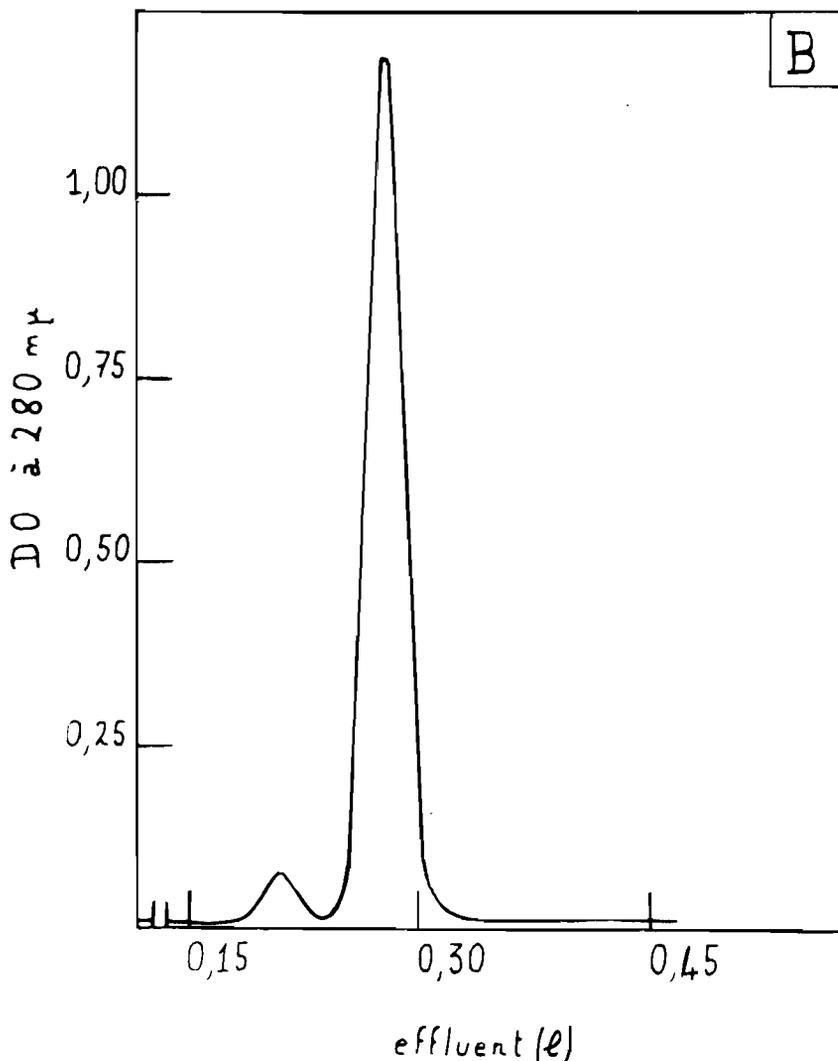
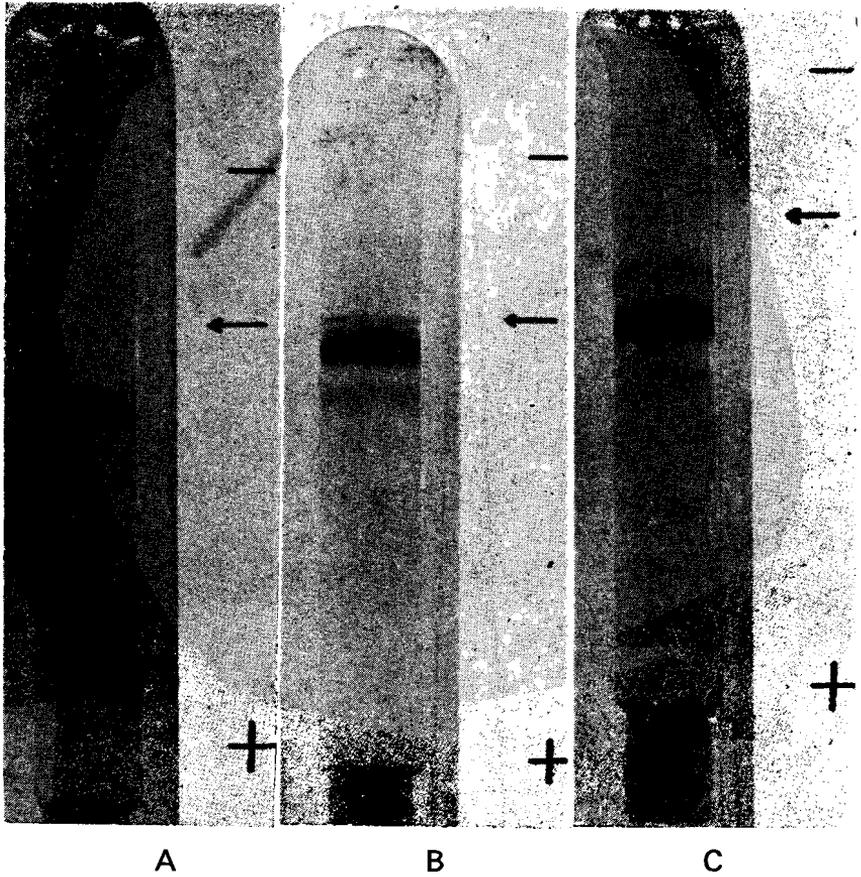


Figure 13

B : chromatographie de la toxine II.

Il apparaît, dans les deux cas, deux fractions toxiques : une fraction principale et une fraction secondaire d'activité spécifique environ deux fois moins élevée que celle de la précédente et ne représentant que quelques % de l'activité totale élue. Ces fractions secondaires qui accompagnent les toxines I et II ayant des volumes d'élution se rapprochant respectivement de ceux des toxines II et I, des expériences d'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée 8M ont été réalisées en vue d'élucider la question. La figure 14 montre le résultat d'expériences qui concernent l'identification de la fraction secondaire accompagnant la toxine I sur DEAE-Sephadex.



**Figure 14**

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de différentes fractions toxiques obtenues par chromatographie des neurotoxines d'*Androctonus australis* sur DEAE-Sephadex — Cf. figure 13 — (Purification à partir du venin électrique).

Tampon formiate pH 3,5 en présence d'urée 8 M

← = front de l'électrophorèse.

- A : Fraction majoritaire de la chromatographie de la fraction toxique I (figure 13-A).
- B : Fraction majoritaire de la chromatographie de la fraction toxique II (figure 13-B).
- C : Fraction minoritaire de la chromatographie de la fraction toxique I (figure 13-A).

Si l'on identifie les toxines aux fractions principales comme il est, à priori, judicieux de le faire, étant donné la très haute activité spécifique des produits soumis à l'électrophorèse, on conclut de ces expériences réalisées dans un milieu de pouvoir dispersant élevé que la fraction secondaire accompagnant la toxine I renferme comme principe toxique de la toxine I et non de la toxine II, contrairement aux rapprochements que suggéraient les valeurs des volumes d'émergence. Mais, alors que dans la fraction principale la toxine I n'est accompagnée que de traces d'un contaminant, la fraction secondaire contient deux contaminants en quantités non négligeables.

## DISCUSSION

Il ressort de l'ensemble de ces faits que la présence de protéines étrangères dans les extraits toxiques amène des perturbations considérables dans la purification des principes actifs contenus dans ces extraits, l'importance de ces perturbations étant fonction de la quantité et sans doute aussi, en partie, de la nature des protéines étrangères.

Les perturbations sont appréciées en fonction d'un état de référence constitué par la chromatographie sur Amberlite en tampon  $\text{AcNH}_4$  0,2 M, pH 6,70 des venins d'*Androctonus* et de *Buthus* soumis au préalable à une extraction aqueuse et à une rétention réversible sur Sephadex. Les caractéristiques de cette chromatographie de référence sont les suivantes : 1°) présence de deux fractions toxiques parfaitement distinctes et de volume d'émergence bien défini ; 2°) confusion entre les courbes d'absorption et de toxicité de ces fractions ; 3°) toxicité spécifique des fractions élevée ; 4°) rendement en toxicité de l'opération très important (supérieur à 50 %). Les perturbations se traduisent par les phénomènes inverses : 1°) fréquente disparition des deux fractions toxiques distinctes au profit d'une seule ou, au contraire, d'une multiplicité de fractions toxiques ; 2°) discordance entre les courbes d'absorption et les courbes d'activité ; 3°) activité spécifique médiocre ; 4°) rendement en toxicité peu élevé.

La quantité de protéines soumise à la chromatographie joue un grand rôle dans l'allure du phénomène car les protéines banales des extraits doivent concurrencer le support de chromatographie, pour l'échange des toxines. C'est ainsi que la chromatographie sur Amberlite a une allure nettement différente dans les opérations 1a et 2a (Cf. tableau IV et figure 5) ; or, la seule différence entre ces opérations réside dans le fait que la deuxième met en jeu deux fois et demie plus de protéines que la première. Les variations observées dans l'importance de la fraction toxique supplémentaire des fractionnements 6-a et 8-a représentés sur le tableau X peuvent avoir une origine analogue bien que le résultat, sur le plan de la chromatographie, soit diamétralement opposé.

Le maximum de perturbations est observé avec le matériel relativement le plus pauvre en toxines : le broyat de telsons ; mais on a pu reconstituer des états analogues ou intermédiaires avec les extraits totaux de venins soumis directement à la chromatographie sur Amberlite.

Quelle est la cause de ces perturbations, si toutefois elle est unique ? La formation d'associations moléculaires mal définies et plus ou moins labiles entre les toxines et certaines protéines banales du milieu pourrait fournir, malgré l'absence de preuves formelles de nature physico-chimique comme des mesures de poids moléculaire, une explication des phénomènes observés et rendre compte à la fois de la non-coïncidence constamment remarquée entre les courbes d'absorption et les courbes d'activité et du mauvais rendement de nombreuses opérations chromatographiques où une grande partie de ces complexes resteraient fixés au sommet de la colonne. Dans ce cas il est possible de récupérer une partie de la toxicité restée fixée au sommet de la colonne, par l'emploi d'éluants de force ionique élevée ; mais l'ASdo de la fraction toxique ainsi obtenue reste faible. La formation éventuelle de complexes moléculaires est aussi tout à fait en accord avec les électrophorèses en milieu dispersant réalisées sur les fractions toxiques de la chromatographie d'équilibre sur DEAE-Sephadex (§ C — III).

Les toxines de scorpions ont, à priori, de grandes aptitudes à former des complexes moléculaires par liaisons polaires, étant donné la très forte proportion des résidus polaires d'acides aminés qu'elles contiennent. Nous inspirant des observations de HATCH [18] qui établit des relations entre la composition globale en acides aminés des protéines et leur comportement *in vitro* et *in vivo*, nous avons adopté sa classification des résidus d'acides aminés en résidus polaires (Asp et Asp-NH<sub>2</sub>, Glu et Glu-NH<sub>2</sub>, Lys, Arg, Ser, Thr) et résidus apolaires (Val, Leu, Ileu, Met, Pro, Phe), les autres résidus d'acides aminés étant considérés comme indifférents. Nous avons pu ainsi, d'après la composition en acides aminés de trois toxines (I et II d'*Androctonus*, I de *Buthus*) établie par ailleurs [4] calculer les rapports : résidus polaires/résidus apolaires correspondants (tableau XI).

Les trois toxines présentent des rapports très nettement supérieurs à 1. Il est intéressant de noter que les valeurs croissantes des rapports s'établissent ainsi : toxine I d'*Androctonus*, toxine I de *Buthus*, toxine II d'*Androctonus* et qu'elles évoluent en sens inverse des coefficients de récupération de la toxicité en fin de purification des extraits totaux de venins (respectivement 3,20 %, 0,93 % et 0,69 %).

Quelle que soit l'explication du phénomène, on constate que, plus les perturbations sont importantes, plus la toxine II disparaît rapidement par rapport à la toxine I. Inversement, plus la valeur du rapport toxine II/toxine I est élevée, plus la purification semble réussie, compte tenu de la qualité du matériel de départ qui est évidemment une donnée essentielle du problème : c'est effectivement ce que suggère le tableau XII où l'on constate que les activités spécifiques des toxines et les rendements en toxicité évoluent généralement de pair avec la valeur du rapport toxine II / toxine I.

**TABEAU XI**

Caractère polaire des toxines de scorpions déterminé selon HATCH [18]

RESIDUS D'AMINO-ACIDES	TOXINE I d' <i>Androctonus</i> nombre de résidus		TOXINE II d' <i>Androctonus</i> nombre de résidus		TOXINE I de <i>Buthus</i> nombre de résidus	
	po- laires	apo- laires	po- laires	apo- laires	po- laires	apo- laires
<b>Résidus polaires</b>						
Asp et Asp-NH <sub>2</sub> .....	20		13		24	
Glu et Glu-NH <sub>2</sub> .....	3		6		10	
Lys .....	15		8		14	
Arg .....	4		5		5	
Ser .....	13		4		7	
Thr .....	4		5		6	
<b>Résidus apolaires</b>						
Val .....		10		5		7
Leu .....		8		3		7
Ileu .....		4		1		6
Met .....		0		0		0
Pro .....		12		5		9
Phe .....		2		2		2
Nombre total de résidus par catégorie .....	59	36	41	16	66	31
Rapport : résidus polaires/résidus apo- apolaires .....	59/36 = 1,64		41/16 = 2,56		66/31 = 2,13	

**TABLEAU XII**

Evolution du rapport Toxine II / Toxine I en fonction de la qualité de la purification du venin de scorpion.

Méthode de purification utilisée (référence bibliographique)	Matériel de départ de la purification			Dernière étape de la purification (chromatographie d'équilibre sur Amberlite) ASdo		Rendement final de la purification (en % de l'activité récupérée par rapport à la toxicité du matériel de départ)		Rapport des activités totales Toxine II / Toxine I
	Nature	Activité spécif.que		Toxine I	Toxine II	Toxine I	Toxine II	
		ASp	ASdo					
[8]	venin manuel selon ROCHAT	149	103	420	420	12	9	0,8
[5]	venin manuel selon LISSITZKY et coll.	222	non calculée *	556	556	13	19	1,5
[19]	venin électrique	159	133	699	802	11	26	2,4

\* L'ASdo de l'extrait aqueux, première étape de la purification, est de 370.

Dans la purification à partir des telsons, le rapport toxine II/toxine I est évidemment nul puisque, dans ce cas, on ne retrouve plus de toxine II en fin d'opération. Le tableau XIII rassemble des résultats caractéristiques obtenus avec diverses méthodes de purification des telsons.

On notera, tout d'abord, la remarquable constance des activités spécifiques des produits terminaux. On observera, par ailleurs, que, plus l'activité spécifique de l'extrait de telsons est élevée, plus le rendement en toxicité représenté par la toxine I est faible, bien que le nombre total de DL<sub>50</sub> que représente cette fraction soit plus grand. Cela semble signifier que, lorsqu'on arrive à augmenter la toxicité de l'extrait de telsons par le choix d'un solvant approprié, c'est essentiellement par la solubilisation d'autres formes de toxines que la toxine I : celle-ci ayant moins tendance à donner des complexes s'extrairait beaucoup plus facilement du broyat de telsons que les autres formes.

On peut enfin considérer, si l'on admet que la toxine I est aisément extractible, que tout ou presque tout ce qui n'est pas représenté par la fraction toxique I dans la toxicité totale d'un extrait est constitué théoriquement par de la toxine II que l'on peut récupérer en partie quand l'extrait de départ n'est pas trop riche en protéines étrangères (cas des venins) mais qui est totalement rendue méconnaissable par formation de complexes moléculaires lorsque l'extrait contient beaucoup de protéines étrangères (cas des broyats de telsons).

Le caractère polaire prédominant ne semble pas être l'apanage des neurotoxines de scorpions ; en effet, les neurotoxines de serpents pourraient aussi fort bien le manifester comme cela semble être le cas pour les deux neurotoxines du serpent à sonnette *Crotalus terrificus* : la crotoxine et la crotamine dont la composition centésimale en amino-acides est connue. HATCH donne comme valeur du rapport résidus polaires/résidus apolaires pour la crotoxine 2,00 [18] ; d'après la composition en amino-acides publiée par MOURA GONCALVES et GIGLIO pour la crotamine [21], nous avons trouvé un rapport, calculé par la méthode de HATCH, exceptionnellement élevé : 3,14. Or, nous avons montré, dans un autre travail, la possibilité d'existence de complexes moléculaires formés par les neurotoxines du serpent *Naja haje* [22]. Il se pourrait donc que, chez les serpents également, les neurotoxines présentent simultanément ces deux propriétés.

Le rôle des protéines banales contenues dans les extraits toxiques apparaît a priori peu spécifique par rapport à la nature de ces protéines. Cette opinion semble confirmée par l'étude du phénomène de potentialisation sous l'effet de diverses protéines sériques des solutions diluées de toxines purifiées. Dans ces conditions, les protéines sériques parviennent à doubler l'activité des préparations les plus purifiées. A l'inverse, elles ne modifient pratiquement pas l'activité des extraits toxiques riches en protéines banales. On n'est donc amené à supposer que ces dernières se comportent comme les protéines sériques vis-à-vis des toxines. La plupart des protéines pourraient ainsi « activer » les toxines contenues dans les solutions diluées utilisées en vue des essais biologi-

**TABLEAU XIII**

Purification de la toxine I à partir des broyats de telsons de *Buthus occitanus* par différentes méthodes.

Méthode de purification utilisée (référence bibliographique)	MATÉRIEL DE DÉPART			TOXINE I		Rendement final en toxicité de l'opération (en %)
	Nature	Activité totale* (en nombre de DL <sub>50</sub> )	ASdo	Activité totale* (en nombre de DL <sub>50</sub> )	ASdo	
[3]	extrait dans NaCl 0,15 M.	12.956	3	907	152	7
[8]	extrait dans l'acide acétique 0,5 N	22.289	15	1.181	152	5
[20]	extrait dans l'acide chlorhydrique 0,5 N	19.375	10	1.124	150	6

\* Activités totales rapportées à 5 g de telsons lyophilisés.

ques. S'agit-il d'une activation proprement dite ou bien d'une autre action, comme un transport facilité vers le récepteur biologique, ou bien encore d'une combinaison entre divers effets de cet ordre\* ? Ces problèmes ont été envisagés par ailleurs [23].

Les formes aberrantes de toxines étudiées ici semblent résulter, d'après ce qui vient d'être dit, d'une complication de structure. Peut-on, à l'opposé, imaginer des formes « simplifiées » des toxines ? Si l'on traite les toxines isolées dans les conditions de référence, voisines de la neutralité, par de l'acide acétique dilué, pendant 48 heures, à 4°, et si l'on soumet cette solution acide, après neutralisation, à une nouvelle chromatographie sur Amberlite dans les conditions de référence, on obtient à partir d'une fraction unique, chromatographiquement homogène, une fraction protéique d'activité spécifique beaucoup plus élevée que celle du produit de départ et une fraction glyco-protéique inactive [23]. Contrairement aux complexes évoqués dans le présent travail, l'association de ces deux fractions pouvant aussi être unies entre elles par des liaisons de type polaire conduit à la formation d'entités bien définies et stables vis-à-vis de la chromatographie d'échange d'ions.

Ainsi l'une des propriétés physico-chimiques les plus remarquables des neurotoxines animales pourrait être leur aptitude à former des complexes avec diverses macromolécules, les combinaisons les plus stables étant, semble-t-il, celles qui ont lieu avec des composés de nature glucidique. Ce comportement des neurotoxines *in vitro* n'est peut être pas sans rapport avec le mode d'action de ces substances.

## RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Nous avons décrit précédemment deux formes bien définies des toxines des venins de scorpions : les toxines I et II. Nous avons étudié ici les formes complexes que prennent les toxines dans les broyats de telsons et dans les extraits totaux de venins.

1 — Les méthodes utilisées sont très variées : 1) extraction des telsons par le chlorure de sodium 0,15 M, l'acétate d'ammonium 0,1 M ou en tampon 0,1 M de pH 8,47, l'acide acétique 0,1 N et 0,5 N, l'acide chlorhydrique 0,5 N, l'acide sulfurique 0,3 N ; extraction des venins par l'eau pure ou le tampon acétate d'ammonium 0,2 M de pH 6,70 ; 2) fractionnement acétonique entre 60 et 80 % de concentration en solvant, la solution de départ étant constituée par un extrait toxique dans le chlorure de sodium 0,25 M ou 0,15 M ; 3) dialyse contre l'eau pure ; 4) filtration moléculaire sur gel de dextrane (Sephadex G-50) dans une solution d'acétate d'ammonium 0,1 M ; rétention réversible sans gradient sur Sephadex G-25 avec, comme éluants successifs, l'eau

---

\* Le facteur adsorption des toxines en solution diluée sur le verre des récipients a évidemment été éliminé au préalable.

et la solution d'acétate d'ammonium 0,1 M ; 5) chromatographie d'échange d'ions : — a) sur Amberlite IRC-50 dans des conditions d'équilibre avec des tampons acétate d'ammonium 0,2 M de pH 6,30, 6,70, 7,14, 7,50, 8,00, 9,00 ou des tampons phosphates sodiques 0,2 M, pH 6,82 ; ou bien en chromatographie avec gradient de molarité, soit dans un système de tampons à l'acétate d'ammonium avec, au départ, un tampon 0,2 M de pH 6,70 puis un gradient de molarité par l'acétate d'ammonium 0,5 M ou 1 M au même pH, soit dans un système aux phosphates de sodium avec, au départ, un tampon 0,1 M de pH 6,80, puis un gradient de molarité produit par une solution de chlorure de sodium 2 M dans le tampon précédent ; — b) sur DEAE-Sephadex dans les conditions d'équilibre avec un tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 8,47, la chromatographie sur colonne étant précédée d'une opération « en suspension » utilisant du DEAE-Sephadex équilibré dans les mêmes conditions (cette dernière opération a pour but de débarrasser l'extrait toxique de beaucoup de protéines gênantes qui perturbent la chromatographie sur colonne).

2 — Après avoir défini les conditions expérimentales permettant d'obtenir les toxines I et II à partir des venins et rappelé les expériences préliminaires qui ont montré l'existence de formes aberrantes des toxines dans les broyats de telsons : essais de récupération des toxines à partir de la fraction 0 — 60 % du fractionnement acétonique, apparition éventuelle d'une fraction toxique de tête dans la chromatographie d'équilibre sur Amberlite en tampon acétate d'ammonium 0,5 M de pH 5,60, chromatographie d'équilibre sur Amberlite des extraits sulfuriques, nous avons entrepris l'étude systématique des perturbations se manifestant dans la purification des toxines à partir des broyats de telsons et qui se traduisent, en premier lieu, par la disparition de la toxine II. Quelle que soit la méthode utilisée, il a été impossible de retrouver cette toxine. Par contre, des formes toxiques de caractères analytiques différents peuvent être observées, mais leur purification n'a jamais pu être poussée très loin. La meilleure méthode pour conserver la plus grande partie de la toxicité présente dans les broyats de telsons est la chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Sephadex à pH 8,47 qui possède un rendement en toxicité supérieur à 60 % et fournit deux fractions toxiques : la fraction A contenant les formes aberrantes de toxines et la fraction B qui conduit rapidement à l'obtention de toxine I chromatographiquement pure.

Le cas des venins diffère essentiellement de celui des broyats de telsons par la plus faible concentration, chez les premiers, des protéines étrangères. Il a été possible de reproduire à partir des venins, les perturbations chromatographiques observées avec les broyats de telsons en supprimant les stades précédant la chromatographie sur Amberlite : dans le cas du venin de *Buthus*, la toxine II disparaît totalement, alors qu'elle subsiste encore partiellement dans le cas du venin d'*Androctonus*, ce qui peut être dû soit à la nature même des toxines, soit à une plus forte concentration de celles-ci dans le venin d'*Androctonus*. Enfin, la présence éventuelle d'une fraction toxique supplémentaire apparaissant en tête de l'élution sur Amberlite et l'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée des deux fractions toxiques

obtenues dans la purification de chacune des toxines normales (toxine I ou toxine II) par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Sephadex, plaident en faveur de la grande aptitude des toxines à former des complexes moléculaires.

3 — Quelle est la nature des formes aberrantes des toxines ? Il semble bien qu'il s'agisse d'associations plus ou moins labiles que constituent les toxines avec différentes macromolécules du milieu. C'est peut-être ce type d'association qui se manifeste, également, dans les solutions diluées de toxines purifiées supplémentées en protéines sériques et chez lesquelles on note, après cette addition, une augmentation nette de l'activité toxique. Toutefois, l'affinité des toxines ne serait pas la même pour les divers constituants du milieu susceptibles de se combiner avec elles : lorsque l'affinité est faible, il se formerait des complexes instables du type de ceux qui sont étudiés ici ; par contre, avec des composés de nature glucidique, il pourrait se former des complexes très stables, homogènes en chromatographie, comme ceux qui constituent les « toxines physiologiques » isolées en milieu neutre et que l'on dissocie par macération en milieu acide.

L'explication de l'aptitude des toxines à former des complexes moléculaires pourrait trouver sa source dans leur caractère très fortement polaire, déterminé d'après leur composition en amino-acides. Cette propriété semble appartenir également aux toxines de serpents.

Deux enseignements peuvent être tirés du comportement *in vitro* des toxines : 1°) sur le plan pratique, on luttera contre la tendance des toxines à former des associations qui perturbent la chromatographie d'échange d'ions en essayant d'éliminer le plus possible de protéines étrangères avant le premier stade chromatographique (par l'extraction aqueuse, la dialyse et la filtration sur Sephadex par exemple) et aussi en évitant de trop charger les colonnes en protéines afin que l'échange des toxines se fasse intégralement avec la résine et non avec d'autres molécules de l'extrait ; 2°) sur le plan théorique, il est vraisemblable de penser que le caractère fortement polaire des toxines et la facilité avec laquelle elles forment des complexes moléculaires, sans doute d'origine ionique, puissent jouer un rôle dans le mode d'action de ces substances.

## REMERCIEMENTS

*Nous remercions vivement le Pharmacien-Colonel J. BERGOT qui a effectué les électrophorèses en gel de polyacrylamide. Ce travail a été réalisé en partie grâce à l'aide de la Direction des Recherches et Moyens d'Essais.*

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] MIRANDA F. et ROCHAT H. : *Les neurotoxines animales. II. Deuxième partie : Revue d'ensemble des neurotoxines animales et conclusions générales.*, Bull. Soc. Pharm. Marseille, 13, 179, 1964.
- [2] MIRANDA F. et LISSITZKY S. : *Scorpionins : the toxic proteins of scorpion venoms.*, Nature, 198, 443, 1961.
- [3] MIRANDA F., ROCHAT H. et LISSITZKY S. : *Sur les neurotoxines de deux espèces de scorpions nord-africains. I. Purification des neurotoxines (scorpionamines) d'Androctonus australis (L.) et de Buthus occitanus (Am.)*, Toxicon, 2, 51, 1964.
- [4] MIRANDA F., ROCHAT H. et LISSITZKY S. : *Sur les neurotoxines de deux espèces de scorpions nord-africains. III. Déterminations préliminaires aux études de structure sur les neurotoxines (scorpionamines) d'Androctonus australis (L.) et de Buthus occitanus (Am.)*, Toxicon, 2, 122, 1964.
- [5] LISSITZKY S., MIRANDA F., ETZENSPERGER P. et MERCIER J. : *Sur la toxicité du venin de deux espèces de scorpions nord-africains.*, Compt. Rend. Soc. Biol., 150, 741, 1956.
- [6] MIRANDA F., ROCHAT H. et LISSITZKY S. : *Sur la neurotoxine du venin des scorpions. I. Purification à partir du venin de deux espèces de scorpions nord-africains.*, Bull. Soc. Chim. Biol., 42, 379, 1960.
- [7] MIRANDA F. : *Purification et caractérisation des neurotoxines des venins de scorpions (scorpionamines). Application des méthodes utilisées à l'isolement d'autres neurotoxines de pH basique (neurotoxines des venins de serpents)*, Thèse de doctorat ès-Sciences, Marseille, 1964.
- [8] ROCHAT H. : *Contribution à l'identification de diverses formes actives des neurotoxines de scorpions.*, Thèse de doctorat en Pharmacie (Etat), Marseille, 1964.
- [9] BEHRENS B. et KARBER C. : *Wie sind Reihenversuche für biologische Auswertungen am zweckmässigsten anzuordnen ?* Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 17, 379, 1935.
- [10] GELOTTE B. : *Studies on gel filtration : Sorption properties of the bed material Sephadex.*, J. Chromatog., 3, 330, 1960.
- [11] FLODIN P. : *Dextran gels and their applications in gel filtration.*, Uppsala : Pharmacia, 1962, 85 p.
- [12] MIRANDA F., ROCHAT H. et LISSITZKY S. : *Propriétés échangeuses d'ions du gel ac déxtrane (Sephadex). Application à la mise au point d'une technique de rétention réversible des protéines basiques de faible poids moléculaire.*, J. Chromatog., 7, 142, 1962.
- [13] GOMORI G. : *Preparation of buffers for use in enzyme studies.*, Methods in Enzymology. New York : Academic Press, 1955, Tome I, p. 138.
- [14] GREGOIRE J., GREGOIRE J. et LIMOZIN N. : *Recherches sur les nucléotides libres des bactéries Micrococcus lysodeikticus. I. Bactéries en phase stationnaire.*, Bull. Soc. Chim. Biol. 40, 767, 1958.
- [15] ORNSTEIN L. : *Disc electrophoresis — I. : Background and theory.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 321, 1964.
- [16] DAVIS B.J. : *Disc electrophoresis — II : Methods and application to human serum proteins.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404, 1964.

- [17] MIRANDA F., ROCHAT H. et LISSITZKY S. : *Sur les neurotoxines de deux espèces de scorpions nord-africains. II Propriétés des neurotoxines (scorpamines) d'Androctonus australis (L.) et de Buthus occitanus (Am.)*, Toxicon, 2, 113, 1964.
- [18] HATCH F.T. : *Correlation of amino-acid composition with certain characteristics of proteins.*, Nature, 206, 777, 1965.
- [19] ROCHAT C., ROCHAT H., MIRANDA F. et LISSITZKY S. : *Nouvelle méthode de purification des toxines du venin du scorpion Androctonus australis (L.)*, Biochim. Biophys. Acta, en préparation.
- [20] MIRANDA F., ROCHAT H., ROCHAT C. et LISSITZKY S. : *Nouvelle méthode de purification des toxines contenues dans les broyats de telsons du scorpion Buthus occitanus (Am.)*, Compt. Rend. Soc. Biol. sous presse.
- [21] MOURA GONCALVES J. et GIGLIO J.R. : *Amino-acid composition and terminal group analysis of crotamine.*, Sixth International Congress of Biochemistry. New York : 1964, Tome II, p. 170 (Abstract n° II - 134) .
- [22] MIRANDA F., ROCHAT H., ROCHAT C. et LISSITZKY S. : *Complexes moléculaires présentés par les neurotoxines animales. II. Neurotoxines des venins de serpents (Naja haje L.)*, Bull. Soc. Chim. Biol., sous presse.
- [23] MIRANDA F., ROCHAT H., ROCHAT C. et LISSITZKY S. : *Potentialisation des toxines de scorpions*, Arch. Intern. Pharmacodyn., sous presse.

# RECTIFICATIF

Dans l'article de MIRANDA et ROCHAT paru dans le numéro 8 des « Annales » et intitulé « Les Gangliosides », p. 43, dernière ligne, remplacer : « au tableau » par : « en additif ».

La formule du ganglioside I de Klenk est la suivante :

Ganglioside I (C<sub>67</sub>H<sub>121</sub>N<sub>3</sub>O<sub>28</sub>)

