

# DONNÉES RÉCENTES SUR LES NEUROTOXINES DU SCORPION *Androctonus australis* (★)

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

Des recherches antérieures (1-3) ont montré que les venins de deux espèces de scorpions nord-africains contenaient chacun deux neurotoxines dont la purification a été réalisée par rétention réversible sur Sephadex G-25 et par chromatographie d'échange d'ions sur Amberlite IRC-50.

Les protéines basiques obtenues étaient homogènes en ultracentrifugation, en électrophorèse de zone sur gel d'amidon et en chromatographie d'équilibre sur Amberlite IRC-50. Un poids moléculaire de 11.000 à 18.000 avait été obtenu par ultracentrifugation. Des travaux ultérieurs ont montré que le traitement des toxines à des pH éloignés de la neutralité conduisait à leur dissociation en monomères.

Une nouvelle méthode de purification a été mise au point, permettant d'obtenir les toxines monomères avec un rendement élevé. Le matériel de départ était le venin brut provenant d'animaux collectés à Tozeur (Tunisie), recueilli par stimulation électrique et desséché sous vide. La purification a comporté essentiellement une extraction par l'eau accompagnée d'une dialyse contre ce solvant, une filtration moléculaire sur Sephadex G-50 suivie de deux chromatographies successives sur Amberlite IRC-50 à pH 6,70 et sur DEAE-Sephadex A-50 à pH 8,50. Une dernière chromatographie d'équilibre sur Amberlite IRC-50 à pH 6,30 pour la toxine I et à pH 6,70 pour la toxine II a conduit à l'obtention des toxines pures.

Comme dans la méthode précédente, les différentes séparations chromatographiques ont été réalisées en utilisant des tampons acétate d'ammonium dont le sel peut être complètement éliminé par une *double* lyophilisation. Il a été ainsi possible d'éviter des opérations de dialyse-concentration, sources de pertes appréciables de toxines. Un exposé détaillé de la procédure de purification pourra être trouvé dans un article qui vient de paraître (4).

\* Résumé d'une communication présentée au Symposium international sur les animaux venimeux (São Paulo, Brésil, 17 au 23 juillet 1966).

Le tableau I résume les étapes de la purification. 53 mg de toxine I soit 1,7% et 86 mg de toxine II, soit 2,7% du poids du venin brut de départ ont été obtenus. La toxicité retrouvée dans les toxines pures correspond à 65% de celle du venin brut. Des résultats parfaitement reproductibles ont été obtenus au cours d'opérations répétées de purification portant sur 20 g de venin.

La DL<sub>50</sub> des toxines pures déterminée sur la souris de 20 g. en présence d'albumine et par voie intraveineuse est de 19 µg/kg (toxine I) et de 10 µg/kg (toxine II). Les toxines pures sont donc respectivement 10 et 19 fois plus neurotoxiques que le venin brut. La composition en acides aminés des toxines pures est rapportée dans le tableau II.

On notera l'absence de méthionine dans les deux toxines et celle d'acide glutamique dans la toxine I. L'absence de cystéine a été constatée par titrage par le p-chloromercuribenzoate (9). Ce résultat a été confirmé par l'hydrolyse (HCl 6N à 110° pendant 20 et 70 heures) des toxines alkylées par l'acide monoiodoacétique ou l'iodoacétamide qui ont fourni 7,33 résidus (toxine I) et 7,60 résidus (toxine II) de demi-cystine et aucun résidu de S-carboxyméthylcystéine.

Le poids moléculaire déterminé par équilibre de sédimentation selon SVEDBERG était de 7.370 pour la toxine I et de 7.770 pour la toxine II. Ces déterminations ont été réalisées dans une ultracentrifugeuse Spinco E à 13.410 rev./min. pendant 88,5 h. à 20° pour la toxine I et à 15.220 rev./min. pendant 116 h. à 20° pour la toxine II. Les toxines étaient dissoutes dans l'acétate d'ammonium 0,20 M pH 6,90 à une concentration de 0,8 %. Les valeurs obtenues sont très proches du poids moléculaire minimum calculé d'après la composition en acides aminés (6.822 et 7.249 respectivement pour les toxines I et II).

Dans l'acide acétique 0,5 N, les toxines I et II présentent des maximum d'absorption à 275 et à 276 mµ respectivement. Pour ces longueurs d'onde, les coefficients d'extinction moléculaire sont  $10,71 \times 10^3$  (toxine I) et  $18,08 \times 10^3$  (toxine II).

Les acides aminés N-terminaux ont été déterminés par dinitro-phénylation selon FRAENKEL CONRAT *et al.* (10). Pour les deux toxines, une seule tache a été observée sur les chromatogrammes. Elle correspondait à la di-DNP-lysine dans plusieurs solvants chromatographiques et, après élution du papier, elle en présentait le spectre caractéristique.

La recherche des acides aminés C-terminaux a été réalisée par hydrazinolyse selon AKABORI *et al.* (11). Après analyse chromatographique sur colonne, on a trouvé la thréonine pour la toxine I et le glycolle pour la toxine II. *Aucun* autre acide aminé n'a été décelé.

Les preuves de l'homogénéité des toxines sont les suivantes :

1) par électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 3,6 et en présence d'urée 8M (12), chacune des toxines migre sous forme d'une bande unique. Il en est de même en gel d'amidon à pH 8,6 où les bandes des toxines se déplacent du côté cathodique, indiquant leur caractère fortement électropositif ;

Tableau I. — Purification des neurotoxines du venin d'*Androctonus australis*.

ETAPES	DL <sub>50</sub> * (nombre)	Toxicité spécifique**	Rendement en toxicité *** (%)	
Venin électrique (3,224 g) .....	844.383	283	100,0	
Extraction par l'eau et dialyse (48 heures) .....	837.628	310	99,2	
Filtration moléculaire sur Sephadex G-50 .....	775.988	622	91,9	
Chromatographie d'équilibre sur Amberlite CC 50 à pH 6,70 (tampon AcNH <sub>4</sub> 0,1 M)	Fraction toxique I .....	157.900	1.240	18,7
	Fraction toxique II .....	441.612	1.675	52,3
		599.512		71,0
Chromatographie d'équilibre sur DEAE-Sephadex à pH 8,50 (tampon AcNH <sub>4</sub> 0,1 M)	Fraction toxique I .....	146.923	1.602	17,4
	Fraction toxique II .....	423.036	1.800	50,1
		569.959		67,5
Chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50 (tampon AcNH <sub>4</sub> 0,2 M)	à pH 6,30 Toxine I .....	137.634	1.680	16,3
	à pH 6,70 Toxine II .....	416.281	2.100	49,3
		553.915		65,6

\* Déterminée selon BEHRENS et KARBBER (5) par injection intraveineuse à la souris Swiss mâle de 20 g de solutions toxiques supplémentées avec de la sérumalbumine humaine 5 × crist. (2 mg/ml)

\*\* DL<sub>50</sub>/unité DO à 280 m $\mu$ .

\*\*\* Par rapport à l'étape initiale.  
AcNH<sub>4</sub> = acétate d'ammonium.

Tableau II. — Composition en acides aminés des neurotoxines  
d'*Androctonus australis*.

Acide aminé	Toxine I		Toxine II	
	(rapport molaire*)		(rapport molaire*)	
a. aspartique .....	9,04	(9)	8,13	(8)
thréonine .....	2,00	(2)	3,07	(3)
sérine .....	5,76	(6)	2,12	(2)
a. glutamique .....	0,0	(0)	4,13	(4)
proline .....	5,96	(6)	2,86	(3)
glycine .....	6,04	(6)	7,02	(7)
alanine .....	1,06	(1)	3,12	(3)
cystine (1/2) .....	7,55	(8)	7,92	(8)
valine .....	4,29**	(4)	4,08	(4)
méthionine .....	0,0	(0)	0,0	(0)
isoleucine .....	2,46**	(3)	0,98	(1)
leucine .....	4,01**	(4)	1,75	(2)
tyrosine .....	2,83	(3)	7,04	(7)
phénylalanine .....	1,01	(1)	0,99	(1)
lysine .....	5,87	(6)	5,00	(5)
histidine .....	0,99	(1)	1,96	(2)
arginine .....	2,03	(2)	2,99	(3)
NH <sub>2</sub> amidé .....	.	(6)		(9)
tryptophane *** .....	1,38	(1)	1,34	(1)
total .....		63		64
poids moléculaire minimum .....		6.822		7.249

\* En prenant, comme base du calcul, les amino-acides stables à l'hydrolyse. Entre parenthèses, l'entier le plus proche.

\*\* Valeur obtenue après 200 h d'hydrolyse.

\*\*\* Détermination spectrophotométrique selon BEAVEN et HOLIDAY (6).

Des quantités de l'ordre de 0,5 mg de toxine pure ont été hydrolysées pendant 20 et 70 h. dans HCl 6N à 110° selon MOORE et STEIN (7) et analysées par chromatographie sur colonne selon PIEZ et MORRIS (8) avec un Autoanalyzer Technicon. Chaque valeur représente la moyenne de deux analyses pour chacun des temps d'hydrolyse. Les valeurs de la sérine, de la thréonine et de la tyrosine ont été calculées par extrapolation au temps d'hydrolyse 0.

2) le fait que chacune des toxines sédimente dans l'ultracentrifugeuse analytique en donnant une frontière unique et symétrique ne peut être considéré que comme une présomption d'homogénéité en raison de l'existence dans le venin brut d'autres protéines non toxiques de faible poids moléculaire ;

3) après rechromatographie d'équilibre sur Amberlite IRC-50, les fractions constituant le pic toxique symétrique obtenu ont une toxicité spécifique constante et maximum ;

4) l'absence de méthionine dans les deux toxines et d'acide glutamique dans la toxine I constitue un critère très sensible de la pureté des fractions obtenues ;

5) un seul acide aminé N- ou C-terminal a été mis en évidence pour chacune des toxines.

Un certain nombre d'arguments conduisent à penser que chaque toxine est constituée par une chaîne polypeptidique *unique* :

1) après réduction complète des ponts disulfures et alkylation (acide monoiodoacétique ou iodacétamide), on devrait s'attendre, si les toxines étaient constituées par deux ou plusieurs chaînes polypeptidiques, à ce qu'elles pénètrent dans le Biogel P<sub>6</sub> (qui exclut les molécules d'un poids égal ou supérieur à 4.600) et qu'elles soient plus retardées que les toxines natives sur Sephadex G-50. Tel n'est pas le cas. Les toxines réduites et carboxyméthylées sont exclues du Biogel P<sub>6</sub> et moins retardées que les toxines natives sur Sephadex G-50. De plus, elles dialysent beaucoup moins vite que les toxines natives à travers la même membrane semi-perméable ;

2) un seul acide aminé N-terminal a été trouvé. Bien que la présence éventuelle d'acides aminés terminaux N-acylés n'ait pas été recherchée, leur existence est rendue peu vraisemblable du fait qu'un seul acide C-terminal a été trouvé dans chacune des deux toxines dans des proportions n'excédant pas un résidu par molécule.

L'ensemble des résultats obtenus permet d'assigner aux neurotoxines d'*Androctonus australis* les formules linéaires suivantes :

*Toxine I.* — H-Lys-(Asp<sub>9</sub>, Thr<sub>1</sub>, Ser<sub>6</sub>, Pro<sub>6</sub>, Gly<sub>6</sub>, Ala<sub>1</sub>, CyS-SCy<sub>4</sub>, Val<sub>4</sub>, Ile<sub>3</sub>, Leu<sub>4</sub>, Tyr<sub>3</sub>, Phe<sub>1</sub>, Lys<sub>5</sub>, His<sub>1</sub>, Arg<sub>2</sub>, Try<sub>1</sub>)-Thr-OH.

*Toxine II.* — H-Lys-(Asp<sub>8</sub>, Thr<sub>3</sub>, Ser<sub>2</sub>, Glu<sub>4</sub>, Pro<sub>3</sub>, Gly<sub>6</sub>, Ala<sub>3</sub>, CyS-SCy<sub>4</sub>, Val<sub>4</sub>, Ile<sub>1</sub>, Leu<sub>2</sub>, Tyr<sub>7</sub>, Phe<sub>1</sub>, Lys<sub>4</sub>, His<sub>2</sub>, Arg<sub>3</sub>, Try<sub>1</sub>)-Gly-OH.

Ces formules, qui n'impliquent pas de séquence entre les acides aminés inclus dans la parenthèse, montrent certaines analogies entre les deux toxines : 1) le nombre total d'acides aminés (63 et 64) ; 2) l'absence de méthionine et la présence de quatre ponts disulfures ; 3) la richesse en acides aminés aromatiques (5 et 9 résidus respectivement pour les toxines I et II) ; 4) la présence d'un résidu de lysine à l'extrémité N-terminale.

Des caractéristiques voisines ont été mises en évidence dans la toxine I de *Buthus occitanus* (2), compte tenu de ce que l'on sait maintenant que les analyses précédemment publiées portaient sur le dimère de la protéine.

La symptomatologie de l'envenimement produit par l'injection des toxines est identique pour chacune d'elles et pour le venin brut desséché ou non. Etant donné l'absence pratiquement totale d'activités enzymatiques dans le venin d'*Androctonus australis*, on peut conclure que la symptomatologie de l'envenimement est directement et seulement liée à la présence des neurotoxines dans le venin.

Malgré la différence de composition en acides aminés, les analogies de structure existant entre les deux neurotoxines étudiées et l'identité de leur action pharmacologique permettent d'envisager qu'un motif structural unique dans chacune de ces protéines pourrait être responsable de leur activité neurotoxique.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. — MIRANDA F. et LISSITZKY S. *Nature*, London, 1961, 190, 443.
2. — MIRANDA F., ROCHAT H. et LISSITZKY S. *Toxicon*, 1964, 2, 51.
3. — MIRANDA F., ROCHAT H. et LISSITZKY S. *Toxicon*, 1964, 2, 123.
4. — ROCHAT C., ROCHAT H., MIRANDA F. et LISSITZKY S. *Biochemistry*, 1967, 6, 578.
5. — BEHRENS B. et KARBER C. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 1935, 177, 379.
6. — BEAVEN G.H. et HOLIDAY E.R. *Adv. Protein Chem.*, 1952, 7, 319.
7. — MOORE S. et STEIN W. *Methods in Enzymology*, New-York, Academic Press, 1963, 6, 819.
8. — PIEZ K.A. et MORRIS L. *Analyt. Biochem.* 1960, 1, 187.
9. — BOYER P.D. *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 76, 4331.
10. — FRAENKEL-CONRAT H., HARRIS J.I. et LEVY A.L. *Methods of Biochemical Analysis*, New-York and London, Interscience Publ., 1955, 2, 359.
11. — AKABORI S., OHNO K., IKENAKA T., OKADA Y., HANAFUSA I., ISUGITA S., SUGAL K. et MATSUSHIMA T. *Bull. Chem. Soc.*, Japan, 1956, 29, 507.
12. — DAVIS B.J. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1964, 121, 404.