



HAL
open science

Caractérisation d'une nouvelle toxine active sur des canaux potassium apamine sensible purifiée à partir du venin de *Buthus occitanus tunetanus*

B Mahjoubi-Boubaker, M El Ayeb, R Kharrat

► **To cite this version:**

B Mahjoubi-Boubaker, M El Ayeb, R Kharrat. Caractérisation d'une nouvelle toxine active sur des canaux potassium apamine sensible purifiée à partir du venin de *Buthus occitanus tunetanus*. Archives de l'Institut Pasteur de Tunis, 2003, 80 (1-4), pp.43-52. hal-01974074

HAL Id: hal-01974074

<https://hal.science/hal-01974074v1>

Submitted on 24 Apr 2019

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

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

CARACTÉRISATION D'UNE NOUVELLE TOXINE ACTIVE SUR DES CANAUX POTASSIUM APAMINE SENSIBLE PURIFIÉE À PARTIR DU VENIN DE *BUTHUS OCCITANUS TUNETANUS*

B. MAHJOUBI-BOUBAKER, M. EL AYEYEB & R. KHARRAT *

Laboratoire des Venins et Toxines, Institut Pasteur de Tunis, B.P. 74, 1002 Tunis - Belvédère, Tunisie.

* Auteur à contacter

RESUME

Un nouveau peptide inhibiteur des canaux potassium, activés par le calcium de faible conductance (SKca) a été purifié à homogénéité à partir du venin du scorpion tunisien *Butbus occitanus tunetanus*.

La masse moléculaire déterminée par SDS-PAGE correspond à une toxine courte de 3300 Da. La séquence primaire de cette toxine montre qu'il s'agit d'un polypeptide composé de 31 résidus, réticulé par trois ponts disulfures, apparenté à la sous-famille 5 des toxines courtes de scorpions.

Cette molécule montre aussi des propriétés pharmacologiques similaires à ce groupe de peptides en induisant une forte activité toxique par injection intracérébro-ventriculaire aux souris, et en déplaçant l'apamine iodée de son site récepteur au niveau des synaptosomes de cerveaux de rats ($K_{0,5} = 4 \text{ nM}$).

Mots clefs : Venin de scorpion, toxines courtes de scorpion, canaux potassium, canaux potassium activés par le calcium.

ABSTRACT

A new peptidyl inhibitor of the small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (SKca) was purified to homogeneity from the venom of the Tunisian scorpion *Butbus occitanus tunetanus*. The molecular mass determined by SDS-PAGE, shows that it's a short peptide (3300 Da).

The primary sequence of this toxin shows that it is a 31-residue polypeptide cross-linked by three disulfide bridges and structurally related to subfamily 5 of short scorpion toxins.

This molecule shows similar pharmacological properties with this group of peptides inducing high toxicity in mice after intracerebro-ventricular injection, and competing with iodinated apamin for binding to its receptor site from rat brain synaptosomes ($K_{0,5} = 4 \text{ nM}$).

Key words: Scorpion venom, short scorpion toxins, potassium channels, calcium, activated potassium channel.

INTRODUCTION

Le venin de scorpion est un mélange complexe de molécules de haute masse moléculaire (mucopolysaccharides, hyaluronidases, enzymes, inhibiteurs de protéases...), de molécules de faible masse moléculaire (tels que les sérotonines et les histamines) ainsi que des peptides.

Les molécules peptiques (8 à 7 kilodalton (kDa))

représentent uniquement 2 à 3% du venin brut et sont responsables de la quasi-totalité des effets toxiques induits chez les animaux. Ces neurotoxines classées en 9 groupes structuraux^{2,3} se sont révélées actives sur des canaux sodium et ont été largement étudiées durant ces trois dernières décennies pour leur caractère structural, pharmacologique et antigénique.

Cependant, des toxines plus courtes, composées de 30 à 40 acides aminés et ayant une masse moléculaire de 3 à 4 kDa, n'ont été décelées qu'au début des années quatre vingt. Ce sont des toxines réticulées par 3 ponts disulfures à quelques exceptions près telles que la Pi1^{5,6} et la Maurotoxine⁷.

Ces toxines sont spécifiques des canaux potassium et selon les homologues structurales observées, elles ont été classées en 12 groupes^{8,4}. Malgré la diversité de leur séquence primaire, la structure tridimensionnelle de ces toxines déterminée par RMN montre une forme dont seules les chaînes latérales enfouies sont celles des résidus de demi-cystines formant les ponts. Toutes ces toxines adoptent un modèle structural conservé avec une hélice α connectée à deux ou trois brins de feuillets β . C'est l'hélice α et/ou les feuillets β qui confèrent à la toxine son spectre de spécificité pharmacologique, grâce à leur richesse en résidus fonctionnels. En effet, la densité, la disposition⁹ ainsi que l'arrangement tridimensionnel des résidus basiques^{10,11} au niveau de ces structures conservées, permet à la toxine d'exprimer ses affinités vis-à-vis de ses sites récepteurs cibles. Les canaux potassium jouent un rôle vital pour le fonctionnement de différents types cellulaires. Ils régulent le potentiel membranaire aussi bien dans les cellules excitables (neurones, muscles...) que les cellules non excitables (cellules β du pancréas, lymphocytes, érythrocytes...)¹². Ces canaux présentent une grande diversité et une ubiquité qui leur permettent d'exprimer des cinétiques et des pharmacologies différentes. En effet, on distingue essentiellement 4 superfamilles de canaux potassium dont la superfamille S4. Celle-ci comprend les canaux potassium dépendant du voltage (Kv) et les canaux potassium dépendant du calcium. La première est formée de six sous-familles et la seconde comprend, en se basant sur le niveau de conductance essentiellement, les canaux de haute (BKca) conductance, de conductance intermédiaire et de faible conductance (SKca)¹³.

Cependant, l'une des conséquences du polymorphisme des canaux K⁺ se répercute sur la spécificité des toxines courtes vis-à-vis de leur cible. En effet, la majorité des neurotoxines courtes identifiées présentent des réactivités croisées. La recherche de toxines présentant une spécificité stricte pour un sous-type de canal, est très intéressante pour la localisation des canaux dans les différents systèmes biologiques, pour

l'étude de leur pharmacologie ainsi que les maladies potentiellement associées (arythmies cardiaques, immunodéficiences, scléroses en plaques, maladies neuromusculaires, etc...). Toutes ces propriétés font d'une toxine spécifique d'un canal un outil pharmacologique et un modèle de médicament prometteur.

Au niveau de ce travail, nous avons purifié et caractérisé une nouvelle toxine du venin de scorpion *Butbus occitanus tunetanus*. Cette toxine est pharmacologiquement active sur les canaux SK apamine sensibles.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1- MATÉRIEL BIOLOGIQUE

1-1- LES ANIMAUX :

Les scorpions: *Butbus occitanus tunetanus* ont été collectés de la région de Beni Khedach (Médénine). Les souris mâles d'haplotype C57 bl/6 (20 ± 3g) sont fournis par le Service des Unités Animalières de l'Institut Pasteur de Tunis. Ces souris ont servi au test d'activité *in vivo*.

1-2- LE VENIN :

Le venin est obtenu par stimulation électrique (courant alternatif 55 Volts) du Post - Abdomen (Service des Unités Animalières de l'Institut Pasteur de Tunis). Le venin collecté est conservé à - 20° C.

2- MÉTHODES

2-1- PURIFICATION DES TOXINES

* **Extraction du venin** : L'extraction du venin brut de *Butbus occitanus tunetanus* se fait par l'eau bidistillée refroidie à 4°C (1V/4V)¹⁴. L'extrait de venin est ensuite centrifugé pour récupérer un surnageant net de toute substance risquant de colmater les colonnes de chromatographie. Ce surnageant est par la suite repris dans l'eau bidistillée et conservé à - 80°C.

* Filtration moléculaire du venin sur séphadex G50 :

Le dispositif de chromatographie liquide basse pression consiste en deux colonnes (2,6 x 100 cm) montées en série, occupées par du séphadex G50 (Pharmacia) et équilibrées dans du tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH 8,5. La filtration moléculaire de 1248 UDO d'extrait de venin a été réalisée avec un débit de 40 ml/h et un temps de collecte de 6mn/tube.

* Chromatographie liquide à haute performance

(CLHP) : La fraction Bot G50 est purifiée en CLHP^{15,16,17}. Une colonne C18 (250 x 4,6mm, 5 μ m, 300 Å, Beckman), formée d'un support en silice greffé de chaînes à 18 carbones, permet ensuite de séparer les

protéines selon leur hydrophobicité. Le décèlement des peptides élués est finalement réalisé grâce à un système: détecteur à deux longueurs d'ondes variables, enregistreur-intégrateur. Les différentes fractions collectées sont lyophilisées puis caractérisées.

2- CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES PROTÉINES

2-1- QUANTIFICATIONS

• **Spectrophotométrie:** Les absorptions à 280 nm des différentes fractions collectées (en CLHP et colonne basse pression) (Beer lambert) sont obtenues grâce à un appareil de spectrophotométrie: (Shimadzu UV240). Une Unité de Densité Optique de Bot G50 à 280 nm correspond à 0,6 mg de protéines¹⁸. Les spectres d'absorption des toxines ont été réalisés entre 230 nm et 340 nm.

• **Quantification des toxines:** Généralement, les toxines courtes n'absorbent pas à 280 nm d'où la détermination de leur coefficient d'extinction molaire (ϵ) par spectrophotométrie, se trouve très difficile voir impossible. Ceci nous a conduit à la quantification de ces molécules en se référant à une solution standard de maurotoxine (MTX): c'est une toxine courte de 34 acides aminés, active sur les canaux potassium dont la concentration a déjà été déterminée par analyse d'acides.

La standardisation s'est effectuée par la détermination de la surface du pic de la MTX en fonction de son absorbance à 230 nm. Le coefficient retenu est 100 Unités de Surface à 230 nm et correspond à 20 μ g de peptide.

• **Séquençage automatique de la protéine selon Edman:** Le séquençage a été effectué sur 1 nanomole de toxine grâce à un micro-séquenceur (Applied Biosystems 476 A) selon la méthode d'Edman.

2-2- ELECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLY-ACRYLAMIDE 16,5% EN CONDITIONS DÉNATURANTES SDS-PAGE :

Dans le but de déterminer la masse moléculaire relative de la toxine purifiée, une électrophorèse en conditions dénaturantes a été réalisée. La masse moléculaire est déterminée par comparaison des mobilités électrophorétiques avec celles des protéines marqueurs déposées en même temps sur le gel¹⁹.

3- CARACTÉRISATION PHARMACOLOGIQUE ET ANTIGÉNIQUE DES PROTÉINES

3-1 MESURE DE LA TOXICITÉ *IN VIVO* :

La toxine est diluée dans une solution de sérum albumine bovine (SAB) 0,1% et est injectée aux souris à

raison de 5 μ l par voie intracérébro-ventriculaire (I.C.V.), la voie la plus sensible pour détecter l'activité toxique. La dose létale 50 (DL50) définie comme la dose nécessaire pour l'obtention de 50% de mortalité dans un lot de 6 souris est ainsi déterminée en utilisant une gamme concentration de toxines²⁰.

3-2 TITRAGE ELISA

Ce test consiste en premier lieu à fixer les antigènes sur une plaque ELISA à 96 puits. Les toxines sont diluées dans un tampon carbonate (5 mM, pH 9,6) avec une concentration de 5 μ g/ml à raison de 100 ml/ puits, puis incubées pendant 1h30 à 37°C et 30 min à 4°C. Après saturation des sites de fixations restés libres avec du BSA (0,5%), pendant 1h à 37°C et 30 min à 4°C, on dépose 100 μ l d'une dilution d'immun. Sérum spécifique dans chaque puits et on incube (1h30 à 37°C suivi de 30 min à 4°C). La révélation des anticorps fixés est réalisée grâce à des anti-immunoglobulines couplées à la peroxydase: le conjugué dilué 1000 fois est déposé et est incubé 1h30 à 37°C, puis 30 min à 4°C. Après chaque incubation, un lavage se fait avec du Tween 20 mélangé avec du tampon Phosphate Salin (P.B.S) (chlorure de sodium + Na₂HPO₄ + NaH₂PO₄). Le substrat de l'enzyme est ajouté (o-phenylenediamine (OPD) 0,04% + acide citrique Na₂HPO₄ + H₂O₂). La réaction enzymatique est finalement arrêtée par une solution d'acide sulfurique (H₂SO₄ 2N) et la plaque placée dans le lecteur Elisa permet d'avoir les absorptions de chaque puits aux 2 longueurs d'ondes 492 et 620 nm.

3-3 IODATION DE L'APAMINE ET TESTS DE DÉPLACEMENTS SUR SYNAPTOSOMES DE CERVEAUX DE RAT:

L'iodation de l'apamine a été effectuée en utilisant de l'iodo-GEN²¹. Pour les tests de déplacements²², brièvement, 50 μ l de [¹²⁵I]apamine à 0.1 nM est incubée pendant 1h à 0°C avec différentes concentrations d'apamine ou de toxine purifiée avec les synaptosomes (0.3 mg/ml), dans un tampon d'incubation composé de d'hydroxyméthyl amino-méthane (Tris-HCl) 10 mM (pH 7.5), contenant 5.4 mM de chlorure de potassium (KCl) et 0.1% de BSA. Après 10 min de centrifugation, le culot obtenu est lavé deux fois avec 2ml de tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), contenant 0.1% de BSA à 0°C, et la radioactivité associée au culot est finalement mesurée avec un compteur γ .

RÉSULTATS :

1- PURIFICATION DES TOXINES :

1-1 GEL FILTRATION : TAMISAGE MOLÉCULAIRE

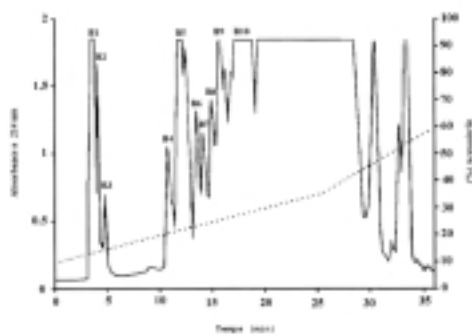
1248 UDO d'extrait de venin ont été purifiés par gel filtration sur des colonnes de séphadex G50, équilibrées dans un tampon acétate d'ammonium 0,1M; pH 8,5. Le rendement obtenu est de l'ordre de 80% et le profil chromatographique permet de distinguer trois fractions essentielles (Fraction I, II et III)²³.

La première fraction éluée est de haute masse moléculaire (96 à 140 KDa); elle est riche en mucoprotéines et représente approximativement 10% (Fraction I). Une fraction majoritaire représentant environ 55% contient la plupart des toxines (MM. de l'ordre de 3 à 7 KDa) responsables de l'activité toxique de ce venin et dénommée fraction Bot G50 (Fraction II). La dernière fraction correspondant aux molécules de masse moléculaire plus faibles (< 2 KDa), représente environ 20 % et est riche en composés nucléotidiques (Fraction III)²³.

1-2 CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE :

La fraction Bot G50 issue du gel filtration est lyophilisée puis reprise dans de l'eau bidistillée. Cette fraction (180 mg de protéines) est purifiée en CLHP grâce à une colonne C18 préalablement équilibrée dans un solvant (A) composé d'eau et de TFA à 0,1% à raison de plusieurs injections.

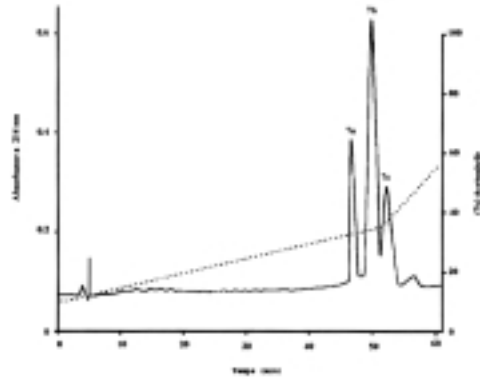
L'élution a été effectuée par un gradient d'acétonitrile TFA 0,1% variant de 10 à 35% en 25 min puis de 35% à 75% en 17 min avec un débit de 1ml/min. La



a: Chromatogramme de la fraction II sur C18 RP-CLHP.

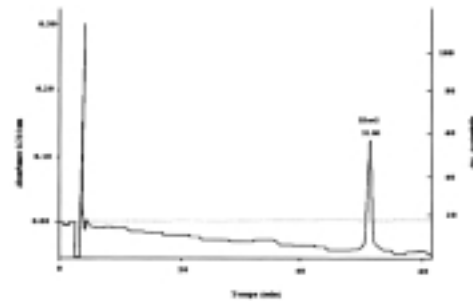
La fraction toxique BotG50 est purifiée en C18 RP-CLHP.

L'élution a été effectuée par un gradient d'acétonitrile TFA 0,1% variant de 10 à 35% en 25 min puis de 35% à 75% en 17 min avec un débit de 1ml/min et une détection à 214 nm.



b: Chromatogramme de la fraction B7 sur C18 RP-CLHP.

La fraction B7, la plus toxique est repassée en C18 RP-CLHP avec un gradient linéaire d'acétonitrile TFA 0,1% variant de 10 à 38% en 50min. Le débit de la colonne est de 1ml/min et le profil chromatographique est détecté à 230 nm.



c: Chromatogramme du pic (7c) sur C18 RP-CLHP.

La vérification de l'homogénéité du pic (7c) élué à 52 min est réalisée avec un gradient plus résolutif d'acétonitrile TFA 0,1% variant de 14 à 20 % en 100min. La détection à 214 nm montre un seul pic symétrique et homogène correspondant à la nouvelle toxine nommée Kbot2.

Figure 1: (a, b, c) Purification de Kbot2 du venin de scorpion *Butbus occitanus tunetanus*.

détection réalisée à 214 nm montre un profil chromatographique complexe (Figure 1a).

Les fractions B1 à B10 les plus hydrophiles sont lyophilisées puis injectées par voies intracérébro-ventriculaire et sous-cutanée aux souris C57 bl/6 (20g).

Du fait que toutes les toxines courtes déjà identifiées et actives sur des canaux potassium sont dénuées de toute activité toxique par voie sous cutanée, contrairement aux toxines longues qui sont actives par les 2 voies (sous cutanée et I.C.V.), la fraction B7, toxique

uniquement par voie I.C.V., a été retenue pour la poursuite des purifications.

Un gradient linéaire plus résolutif 10 à 38% d'acétonitrile - TFA(0,1%) en 50 min, a permis de refractionner B7. Le profil chromatographique effectué à 230 nm montre que B7 est résolue en 3 pics 7a, 7b, et 7c (Figure 1b), dont le dernier (7c) se révèle le plus symétrique et homogène.

Le pic 7c repassé en CLHP sur la même colonne avec un gradient linéaire 14 à 20% d'acétonitrile - TFA (0,1%) en 100 min, montre un profil à 214 nm avec un pic symétrique et homogène présentant un temps de rétention de 51 min. Ce pic élué à 17,1% d'acétonitrile - TFA (0,1%) est nommé Kbot2 (Figure 1c).

2- CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE KBOT2

2-1 ELECTROPHORÈSE EN CONDITIONS DÉNATURANTES :

1,5 µg de la toxine Kbot2 ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 16% en présence de SDS. L'analyse électrophorétique nous a permis la détection d'une seule bande reflétant l'homogénéité moléculaire de la toxine.

Les marqueurs de masse moléculaire utilisés en même temps que Kbot2 nous ont permis d'estimer la masse moléculaire à environ de 3300 Da (Figure 2).

2-2 SÉQUENÇAGE:

La séquence complète d'acides aminés de Kbot2 a été réalisée:

ATxYSSDxRvKxRAMGFSSGKxINSKxKxYK

De la même manière que la scyllatoxine et la P05, respectivement purifiées à partir de *leirus quinques-*

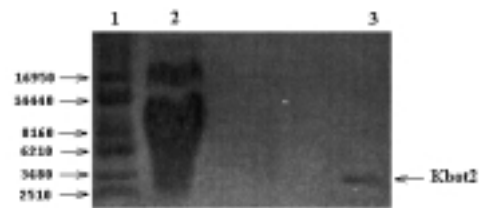


Figure 2: Electrophorèse: masse moléculaire de Kbot2
 Profil électrophorétique en conditions dénaturantes de la toxine Kbot2 avec la fraction Bot G50 et le marqueur de masse moléculaire.

- (1): marqueur de masse moléculaire,
- (2): fraction Bot G50,
- (3): Kbot2.

Consensus des sous-familles/ nomenclature des toxines α-KTx

C1	-----C-S-C-----GKC----C-C---
1.1 ChTx	ZFTNVSCITTSKECWSVCQRLHNTS-RGKCMNK-KRCYCYS
C2	---I-KC---QC--CK--G----KC-NG-KCKCY--
2.1 NTx	THINVKCTSPKQCSKPKCKELYSSAGAKCMNG-KCKCYNN
C3	--V-I-V-C-S-QC-PCK-A-GMR-FGKC-N-KC-CTP--
3.1 KTx	GVEINVKCSGSPQCLPKCKDA-GMR-FGKCMNR-KCHCTPK
C4	--V-I--C-SP-C--CK--G-KA-GKC-NG--C-C---
4.2 Tsk	VVIGQRCYRSPDCYSACKKLVG-KATGKCTNG-RCDC
C5	-----C-NL-CQLSCRSI-GL-LGKCI-G-KCECVKH-
5.1 LeTx1	AFC-NLRMCQLSCRSI-GL-LGKCI-G-KCECVKH
5.2 PO5	TVC-NLRRQLSCRSI-GL-LGKCI-G-KCECVKH
5.3 BmPO5	AVC-NLKRQLSCRSI-GL-LGKCI-G-KCECVKH
Kbot2 ATC-YSSDCRVKCRAM-GF-SSGKCIINS-KCKCYK	
C6	-----C---DC-PC--TGC----C-N--CKG-C-
6.1 Pi1	L-VKCRGTSDCGRPCQQQTGCPNS-KCINR-MCKCYGC
6.2 MTx	VSCVTSKDCYAPCRKQTGCPNA-KCINK-SCKCYGC
C7	--TI--SCTN-KQCYPHCKKGTGYPNA-KCMNR-KCKCFGR-
C8	-----C--EDCP-HC-TQ---A-AKCDND-KCVCEP
8.1 PO1	VSC--EDCPEHCSTQ--KAQAKCDND-KCVCEPI
C9	-----VGC--EECPMHCKGK--NA-PTCD-GVCNCNV-
9.1 BmPO2	VGC--EECPMHCKGK--NAKPTCD-DGVCNCNV
C10	-----C-VYRTCDKDC-R--YR-SGKCIINN-ACKCYPY-
C11	--DEEPKE-C-SDEMCVIYCKGE-EYS-TGVCDGPQKCKCSD-
C12	WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFG-RAHGKCMNN-KCRCYTN

Figure 3: Séquence de kbot2 et nomenclature des toxines α-KTx

Séquence primaire de Kbot2 et Nomenclature simplifiée des 12 premières sous-familles de toxines courtes isolées de venin de scorpion avec leurs consensus (c) correspondant.

Les résidus fonctionnels basiques, les résidus hydrophobes et les résidus cystéines sont en caractère gras.

La plus part des séquences ont été obtenues d'après Tytgat et coll. 1999. ChTx (charybdotoxine), AgTx1 (Agitoxine 1), et LeTx1 (leurotoxine I) ont été purifiées du venin de *Leirus quinquestriatus* var *Hebraeus*, BmPO2 et BmPO5 ont été purifiées du venin de *Bulbus martensi* Karsch, NTx (noxiustoxine) a été purifiée du venin de *Centruroides noxius* Hoffmann, KTx (kaliotoxine), PO1 et PO5 ont été purifiées du venin d'*Androctonus mauretanicus* mauretanicus, MTx (maurotoxine) a été purifiée du venin de *Scorpio maurus*, Pi1 (PiTx-Kg) a été purifiée du venin de *Pandinus imperator*, Tsk a été purifiée du venin de *Tityus serrulatus*.

En se basant sur ces consensus, Kbot2 pourrait représenter un nouveau membre de la sous-famille 5 de toxines courtes de scorpion.

triatius hebraeus et *Androctonus mauretanicus mauretanicus*^{24,25}, Kbot2 comprend 31 acides aminés. Kbot2 est une molécule très basique. En effet, elle présente 7 résidus basiques (Lys et Arg) et une faible représentation en résidus acides (Asn/Gln).

En se basant sur cette séquence et la classification de Tytgat et coll. (1999)⁴ des toxines courtes actives sur les canaux potassium, nous avons pu conclure que Kbot2 appartient à la sous-famille 5 de toxines courtes de scorpion. Les résidus [x] sont en parfait alignement avec les résidus cystéines des toxines de scorpions (Figure 3).

Cette sous-famille présente quatre résidus délétés au niveau de l'extrémité N-terminale par rapport à la sous-famille de la ChTx, ainsi que la présence de deux délétions internes en positions (8-10) et (21-23). En effet, la séquence primaire de Kbot2 présente plusieurs homologies de séquence avec la P05 et appartenant à la même famille que Kbot2.

Cependant, l'extrémité N-terminale de Kbot2 présente des homologies avec la P01, et la MTX purifiées, respectivement, à partir du venin d'*Androctonus mauretanicus mauretanicus*²⁵ et *Scorpio maurus*⁷. Cette homologie structurale pourrait entraîner une homologie pharmacologique et antigénique.

3- CARACTÉRISATION PHARMACOLOGIQUE ET ANTIGÉNIQUE DE KBOT2

3-1 ANTIGÉNICITÉ DE KBOT2 (TEST ELISA)

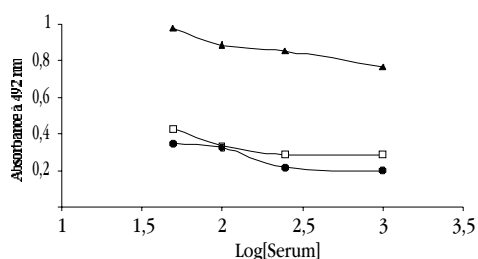


Figure 4: Test ELISA : Antigénicité de Kbot2 vis-à-vis de l'anticorps anti-MTX.

((◻) BotG50, (▲) MTX, (●) Kbot2).

Ces résultats sont obtenus suite à la réactivité de 3 µg de Kbot2 avec des dilutions croissantes d'anti-MTX : 1/50, 1/100, 1/250 et 1/1000. La fraction Bot G50, ainsi que Kbot2 ne sont pas reconnues par les anticorps anti-MTX.

L'antigénicité de Kbot2 vis-à-vis de l'anticorps anti-MTX (Anti-maurotoxine préparé par Kharrat 1996)⁷ a été déterminée en utilisant la technique d'ELISA.

La Figure 4 montre l'absence d'antigénicité croisée de Kbot2 (3µg) avec des dilutions croissantes d'anti-MTX: 1/50, 1/100, 1/250 et 1/1000.

La fraction Bot G50 représentative de la majorité des toxines du venin de *Butbus occitanus tunetanus* n'est pas reconnue par l'anti-MTX.

Ainsi, malgré l'homologie de séquence N-terminale de Kbot2 et la MTX, ces deux toxines ne présentent pas de spécificité pour les mêmes anticorps. Ils n'appartiennent donc pas au même groupe antigénique.

3-2 CARACTÉRISTIQUES PHARMACOLOGIQUES

*** Toxicité *in vivo* :** Deux lots de 6 souris C57bL/6 ont été injectés par voie intracérébro-ventriculaire avec des doses croissantes allant de 0,8 ng à 25 ng pour Kbot2. Kbot2 se révèle être toxique et sa DL50 est de 20 ng /20 g de souris. Cette DL50 est comparable avec les valeurs précédemment établies pour les autres toxines actives sur les canaux K⁺ et se trouve cinq fois plus active que la Maurotoxine (DL50 = 100 ng).

*** Effet de Kbot2 sur les canaux SKca :** Nous avons déterminé la capacité de Kbot2 d'entrer en compétition avec l'apamine pour les canaux SKca présents au niveau des synaptosomes de cerveaux de rat. La

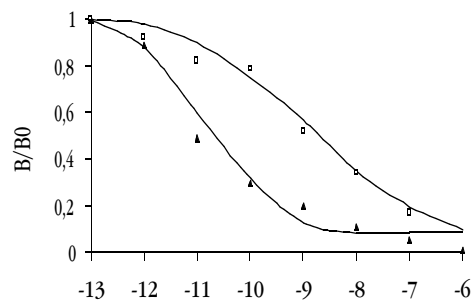


Figure 5: Tests de déplacements: Inhibition de la fixation de [125I]apamine sur les synaptosomes de cerveaux de rats. ((o)Kbot2, (s)apamine).

Les valeurs indiquées sur la courbe signifient une moyenne de trois valeurs expérimentales. L'erreur est aux alentours de 5%. Bo est la fixation de [125I]apamine en absence de ligand, et B est la fixation en présence de différentes concentrations de Kbot2. (B) est exprimée en pourcentage de la fixation totale en absence de tout compétiteur (Bo). La fixation non-spécifique est < 10% de la fixation totale.

Figure 5 montre que l'apamine native inhibe complètement la fixation de [¹²⁵I] apamine avec un IC50 de 5 pM; une valeur en parfait accord avec celles déjà déterminées par Hugues et coll. (1982)²². Kbot2 inhibe modérément la fixation de [¹²⁵I]apamine avec 50 % de déplacement de fixation spécifique observé à 4 nM de toxine.

DISCUSSION

Durant ces dernières décennies, les études portées sur le venin de *Buthus occitanus tunetanus* ont révélé que l'activité toxique de ce venin est attribuée à une panoplie de toxines peptidiques comprenant 60-70 acides aminés réticulés par 4 ponts disulfures appartenant à la fraction Bot G50. Ces toxines interagissent spécifiquement avec des canaux sodium en altérant leurs propriétés fonctionnelles.

Cependant, la découverte de toxines plus courtes formées de 30 à 40 acides aminés et spécifiques de canaux potassium, n'a jamais été réalisée au niveau de ce venin. L'handicap majeur de la découverte de ces toxines est dû à leurs caractéristiques physico-chimiques particulières. En effet, ces toxines n'absorbent généralement pas à 280 nm, ne présentent généralement pas de tryptophane au niveau de leur séquence, sont très hydrophiles et ne sont pas actives par voie sous-cutanée, la voie la plus utilisée pour la détection des toxines longues de scorpions.

Les nouvelles stratégies d'identification ont permis à un bon nombre de chercheurs la découverte de ce type de toxines^{27,28,29,30,31,32,7,16}. Cependant, toutes les recherches se sont heurtées aux problèmes de spécificité de ces toxines pour les différents types de canaux potassium. En effet, ces toxines présentent une spécificité large avec des réactivités croisées.

Nous nous sommes intéressés à la purification de la toxine Kbot2 à partir du venin de *Buthus occitanus tunetanus*. C'est une toxine de masse moléculaire 3300 Da, déterminée par SDS-PAGE et correspondant à 31 acides aminés confirmés par la composition en acides aminés et le séquençage. L'analyse de la séquence primaire en acides aminés de Kbot2 révèle des homologies avec celles de toxines courtes de scorpions de la sous-famille 5¹. Cette toxine présente six résidus cystéines (déterminés par l'analyse de la composition en acides aminés et le séquençage) formant probablement les trois ponts disulfures clas-

siques, la présence de quatre résidus délétés au niveau de l'extrémité N-terminale par rapport à sous-famille de la ChTx, ainsi que de deux délétions internes au niveau des résidus en position (8-10) et (21-23). Comme toutes les molécules appartenant aux sous-famille 5, Kbot2 exprime une forte toxicité après injection par voie I.C.V. aux souris (DL50: 20 ng /20 g de souris), et déplace l'apamine issue du venin d'abeille *apis mellifera*, de son site au niveau des synaptosomes de cerveaux de rats (IC50 =4 nM).

Malgré que Kbot2 présente des caractéristiques structurales et biologiques proches de celles de la MTX (DL50: 100ng/20g de souris, IC50: 5nM pour les canaux SK)⁷, il a été noté lors des tests d'antigénicité avec des anticorps dirigés contre cette toxine, que Kbot2 ne présente pas de site antigénique commun avec celui de la MTX. Ces deux molécules présenteraient probablement des épitopes conformationnels différents.

RELATION STRUCTURE-FONCTION DE KBOT2 AVEC D'AUTRES TOXINES ACTIVES SUR LES CANAUX POTASSIUM

Les canaux potassium sont chargés négativement près de leur région pore¹⁰, formant un potentiel local négatif. Comme les toxines courtes de scorpion sont des molécules basiques, les résidus chargés positivement occupent une fonction importante pour l'interaction toxine-canal¹¹. Kbot2 est une molécule très basique, présentant 7 acides aminés basiques et une seule charge négative (D) avec une charge globale + 6.

Des études récentes^{24,26,33,34} ont conclu que les toxines inhibent très efficacement le canal SKca grâce à la présence d'une séquence consensus localisée au niveau de l'extrémité N-terminale sur une structure secondaire en hélice α décrite comme essentielle pour la reconnaissance toxine-canal SKca. Cette séquence inclut les éléments Arg/Lys- Arg/Lys - Cys - Gln^{25,35,36,37,38} où les deux charges positives contiguës : Arg-Arg sont importantes pour l'expression de leur haute affinité de fixation au canal SKca.

L'analyse de séquence de Kbot2 montre l'absence de cette séquence consensus. Cependant, le site de reconnaissance de P05 pour les canaux SK a été bien élucidé et implique trois résidus basiques (arginines 10, 11 et 18)^{25,39}. La présence de trois charges positives en position 14, 16 et 18 au niveau de l'hélice α de

Kbot2, permettrait probablement d'expliquer la haute affinité de Kbot2 pour les canaux SK.

Kbot2 représente une nouvelle toxine active sur des canaux SK. Des tests pharmacologiques complémentaires de cette toxine, permettant d'approfondir le mode d'action de Kbot2 vis-à-vis des canaux K⁺, sont en cours d'expérimentation.

REMERCIEMENTS

On remercie le Prof. K. Dellagi pour son soutien. Nous voulons également remercier le Dr. H. Rochat pour son aide et le Dr. Z. Ben Lasfar et ses collaborateurs pour le venin de scorpion *Buthus occitanus tunetanus*.

RÉFÉRENCES:

- 1- **Mohamed AH, Kamel A, Ayobe MH.** (1969) Some enzymatic activities of Egyptian snake venoms and a scorpion venom. *Toxicon*, **7** (3), 185-188.
- 2- **Rochat H., Bernard P., and Couraud F.,** (1979) Scorpion toxins : Chemistry and mode of action. *Advances in cytopharmacology* , **3**, 325-333
- 3- **Duflon, M.J., Drake, A.F., et Rochat, H.**(1986) Conformational variations amongst scorpion toxins. *Biochem. Biophys. Acta.*, **896**, 16-22
- 4- **Tytgat, J., Chandy, G., Garcia M.L., Gutmann G.A., Martin-Eauclaire M.F., Van der Walt J.J., Possani, L.D.** (1999) A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venom: a-KTX molecular subfamilies. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**, 444-447
- 5- **Olamendi Portugal, T., Gomez-Lagunas F., Gurrola , G.B., and Possani L.D.** (1996) A novel structural class of K⁺ channel blocking toxin from the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem. J.*, **315** , 977-981
- 6- **Rogowski R.S., Collins J.H. O'Neill T., Gustafson T.A., Werkman T.R., Rogowski M.A., Tenenholz T.C., Weber D.J., and Blaustein M.P.** (1996) The new toxins from the scorpion *Pandinus imperator* selectivity block certain voltage-gated K⁺ channels. *Molecular Pharmacology*, **50**, 1167-1171
- 7- **Kharrat R., Mabrouk K. , Crest M., Darbon H., Oughuideni R., Martin –Eau Claire M.F., Jacquet G., El A yeb M., Van Rietschoten , J. Rochat H., and Sabatier J.M.** (1996) Chemical synthesis and characterization of a short scorpion toxin with four disulfide bridges that acts on K⁺ channels. *Eur. J. Biochem.*, **242**, 491-498
- 8- **Miller C.,** (1995) The Charybdotoxin family of K⁺ channel- blocking *peptides*. *Neuron*, **15**, 5-10
- 9- **Sabatier JM, Lecomte C, Mabrouk K, Darbon H, Oughuideni R, Canarelli S, Rochat H, Martin-Eauclaire MF, van Rietschoten J.** (1996) Synthesis and characterization of leiurotoxin I analogs lacking one disulfide bridge: evidence that disulfide pairing 3-21 is not required for full toxin activity. *Biochem.*, **35**(33), 10641-10647
- 10- **Anderson, C., Mac Kinnon, R., Smith, C., & Miller, C.** (1988) Charybdotoxin block of single Ca²⁺-activated K⁺ channels. Effects of channel gating, voltage, and ionic strength. *J. Gen. Physiol.*, **91**, 317-333
- 11- **Stampe, P., Kolmakova-Partensky, L., Miller, C.** (1994) Estimations of K⁺ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. *Biochem.*, **33**, 443-450
- 12- **Rudy B.** (1988) Diversity and ubiquity of K⁺ channels. *Neuroscience*, **25**, 729-749
- 13- **Marty A.**(1989) The physiological role of calcium-dependent channels. *Trends Neurosci.*,**12**, 420-424
- 14- **Miranda F, Kupeyan C, Rochat H, Rochat C, Lissitzky S.** (1970) Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of four neurotoxins from two different sources of Naja haje venom. *Eur. J. Biochem.*, **17**(3), 477-484.
- 15- **Martin Eau Claire M.F., and Rochat H.,** (1987) Large scale purification of toxins from the venom of scorpion *Androctonus australis bector*. *Toxicon*, **25**, 1131-1139
- 16- **Galvez, A., Gimenez-Galleco, G., Reuben , J.P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kackzorowski, G.J. AND Garcia, M.L.** (1990) Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of scorpion *Buthus occitanus tunetanus*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 11083-11090

- 17- **Lebreton F, Delepierre M, Ramirez AN, Balderas C, Possani LD.** (1994) Primary and NMR three-dimensional structure determination of a novel crustacean toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus*. *Karsch. Biochem.*, **33**(37), 11135-11149.
- 18- **Zenouaki I, Kharrat R, Sabatier JM, Devaux C, Karoui H, Van Rietschoten J, el Ayeb M, Rochat H.** (1997) *In vivo* protection against *Androctonus australis hector* scorpion toxin and venom by immunization with a synthetic analog of toxin II. *Vaccine*, **15**(2), 187-194.
- 19- **Schagger H, von Jagow G.** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.*, **166**(2), 368-379.
- 20- **Romi R, Crest M, Gola M, Sampieri F, Jacquet G, Zerrouk H, Mansuelle P, Sorokine O, Van Dorselaer A, Rochat H, et al.** (1993) Synthesis and characterization of kaliotoxin. Is the 26-32 sequence essential for potassium channel recognition?. *J. Biol. Chem.*, **268**(35), 26302-26309.
- 21- **Salacinski, P.R., McLean, C., Sykes, J.E., Clement-Jones, V.V., and Lowry, P.J.** (1981) Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 alpha, 6 alpha-diphenyl glycoluric (Iodogen). *Anal. Biochem.*, **117**, 136-146
- 22- **Hugues, M., Duval, D., Kitabgi, P., Lazdunski, M., and Vincent, J. P.** (1982) Preparation of a pure mono-iodo derivative of the bee venom neurotoxin apamin and its binding properties to rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.*, **25**, 2762-2769
- 23- **Miranda, F., Kopeyan, C., Rochat, H., Rochat, C., & Lissitzky, S.** (1970) Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions *Androctonus australis hector*, *Butbus occitanus tunetanus* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *Eur. J. Biochem.*, **16**, 514-523
- 24- **Auguste P, Hugues M, Grave B, Gesquiere JC, Maes P, Tartar A, Romey G, Schweitz H, Lazdunski M.** (1990) Leiurotoxin I (scyllatoxin), a peptide ligand for Ca²⁺-activated K⁺ channels. Chemical synthesis, radiolabeling, and receptor characterization. *J. Biol. Chem.*, **265**(8), 4753-4759.
- 25- **Sabatier JM, Zerrouk H, Darbon H, Mabrouk K, Benslimane A, Rochat H, Martin-Eauclaire MF, Van Rietschoten J.** (1993) P05, a new leiurotoxin I-like scorpion toxin: synthesis and structure-activity relationships of the alpha-amidated analog, a ligand of Ca²⁺-activated K⁺ channels with increased affinity. *Biochem.*, **32**(11), 2763-2770.
- 26- **Zerrouk H, Laraba-Djebari F, Fremont V, Meki A, Darbon H, Mansuelle P, Oughideni R, van Rietschoten J, Rochat H, Martin-Eauclaire MF.** (1996) Characterization of PO1, a new peptide ligand of the apamin-sensitive Ca²⁺ activated K⁺ Channel. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **48**(6), 514-521.
- 27- **Koppenhofer E, Schmidt H.** (1968) Incomplete sodium inactivation in nodes of Ranvier treated with scorpion venom. *Experientia.*, **24**(1), 41-42.
- 28- **Narahashi T, Shapiro BI, Deguchi T, Scuka M, Wang CM** (1972) Effects of scorpion venom on squid axon membranes. *Am. J. Physiol.*, **222**(4), 850-857
- 29- **Crest M., Jacquet G., Gola M. Zerrouk H., Ben sliman A ., Rachat H., Mansuelle P., Martin-Eau Claire M.F.** (1992) Kaliotoxin , a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-type Ca²⁺-activated K⁺ channel characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. *J. Biol. Chem.*, **267**, 1640-1647
- 30- **Gimenez-Galleco G., Navia M.A. Ruben J.P., Katz G.M., Kaczorowski G.J. , Garcia M.L.** (1988) Purification ,sequence and model structure of Charybdotoxin, a potent selective inhibitor of Ca⁺⁺ - activated potassium channels. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 3329-3333
- 31- **Carbone E., Wanke E., Prestipino G., Possani L.D., Maelicke A .** (1982) Selective blockage of voltage- dependent K⁺ channel, by a novel scorpion toxin. *Nature*, **296**, 90-91
- 32- **Garcia-Calvo M., Leonard R.J., Novick J., Stevens S.P., Schmalhofer W., Kaczorowski G.J. , Garcia M.L.** (1993) Purification, characterization, and biosynthesis of Margatoxin, a component of *Centruroides mauretanicus* venom

- that selectively inhibits voltage-dependent K⁺ channel. *J. Biol. Chem.*, **268**, 18866-18874
- 33- Chicchi GG, Gimenez-Gallego G, Ber E, Garcia ML, Winquist R, Cascieri MA.** (1988) Purification and characterization of a unique, potent inhibitor of apamin binding from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom. *J. Biol. Chem.*, **263**(21), 10192-10197.
- 34- Zerrouk H., Mansuelle P., Ben slimane A., Rochat H., and Martin-Eau Claire M.F.** (1993) Characterization of a new Leiuorotoxin I-Like scorpion toxin P05 from *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. *F.E.B.S. letters*, **320**, 389-392
- 35- Meunier S, Bernassau JM, Sabatier JM, Martin-Eauclaire MF, Van Rietschoten J, Cambillau C, Darbon H.** (1993) Solution structure of P05-NH₂, a scorpion toxin analog with high affinity for the apamin-sensitive potassium channel. *Biochem.*, **32**(45), 11969-11976
- 36- Inisan AG, Meunier S, Fedelli O, Altbach M, Fremont V, Sabatier JM, Thevan A, Bernassau JM, Cambillau C, Darbon H.** (1995) Structure-activity relationship study of a scorpion toxin with high affinity for apamin-sensitive potassium channels by means of the solution structure of analogues. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **45**(5), 441-450.
- 37- Labbe-Jullie C, Granier C, Albericio F, Defendini ML, Ceard B, Rochat H, Van Rietschoten J.** (1991) Binding and toxicity of apamin. Characterization of the active site. *Eur. J. Biochem.*, **196**(3), 639-645
- 38- Vincent JP, Schweitz H, Lazdunski M.** (1975) Structure-function relationships and site of action of apamin, a neurotoxic polypeptide of bee venom with an action on the central nervous system. *Biochem.*, **14** (11), 2521-2525.
- 39- Cui, M., Shen, J., Briggs, J.M., Fu, W., Wu, J., Zhang, Y., Luo, X., Chi, Z., Ji, R., Jiang, H., Chen, K.** (2002) Brownian dynamics simulations of the recognition of the scorpion toxin P05 with the small-conductance calcium-activated potassium channels. *J. Mol. Biol.*, **318** (2), 417-428