

#### 48. PURIFICATION DES NEUROTOXINES DU SCORPION *ANDROCTONUS AUSTRALIS*

CATHERINE ROCHAT, HERVÉ ROCHAT, FRANÇOIS MIRANDA  
et SERGE LISSITZKY

*Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine, Bd. d'Alès,  
Marseille 5e, France*

Des recherches antérieures (1-3) on 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, une filtration 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, source de pertes appréciables de toxines. Un exposé détaillé de la procédure de purification pourra être trouvé dans un article à paraître prochainement (4). Le tableau I résume les étapes de la purification. 52 mg de toxine I soit 1,6% et 83 mg de toxine II soit 2,5% 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  $DL_{50}$  des toxines pures déterminée sur la souris de 20 g en présence d'albumine et par voie intraveineuse est de 19  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (toxine I) et de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (toxine II). Les toxines pures sont donc 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

TABLEAU I — PURIFICATION DES NEUROTOXINES DU VENIN D'ANDROCTONUS AUSTRALIS

ETAPES		DL <sub>50</sub> (nombre)*	Toxicité spécifique**	Rendement en toxicité (%)***
Venin recueilli par stimulation électrique (3,224 g)		844.383	283	100,0
Extraction par l'eau et dialyse (48 heures)		837.628	310	99,2
Filtration sur Sephadex G-50		775.988	622	91,9
Chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50 à pH 6,70 (tampon AcNH <sub>4</sub> 0,2 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 KARBEL (5) par injection intraveineuse à la souris Swiss mâle de 20 g de solutions toxiques supplémentées avec de la sérumalbumine humaine 1 × cryst. (2 mg/ml).

\*\* DL<sub>50</sub>/unité DO à 280 mμ.

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

l'hydrolyse (HCl 6N à 110° pendant 20 et 70 h) des toxines alkylées par l'acide monoiodoacétique qui ont fourni 7,40 (toxine I) et 7,52 résidus (toxine II) de demi-cystine et aucun résidu de S-carboxyméthylcystéine.

Le poids moléculaire déterminé par équilibre de sédimentation selon Sved-monoiodoacétique qui ont fourni 7,40 (toxine I) et 7,52 résidus (toxine II) de minations ont été réalisées dans une ultracentrifugeuse Spinco E à 15.220 et 13.410 rev./min (toxines I et II) pendant 88,5 et 116 h à 20°. 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 pour 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 m $\mu$  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).

TABLEAU II — COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DES NEUROTOXINES  
D'ANDROCTONUS AUSTRALIS

1 à 2 mg de toxine pure ont été hydrolysés pendant 20 et 70 h dans HCl 6N à 110° selon MOORE et STEIN (7) et analysés 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.

Acide aminé	Toxine I (rapport molaire *)		Toxine II (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)		(1)
Total		63		64
Poids moléculaire minimum		6.822		7.249

\* En prenant phénylalanine = 1,0. Entre parenthèses l'entier le plus proche.

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

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

Les acides aminés N-terminaux ont été déterminés par dinitrophénylation 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. 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 milite en outre en faveur de ce 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 aminé 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>, Ileu<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>, Ileu<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 pour I et II). 4) le même résidu de lysine N-terminal.

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 leur 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 des protéines pourrait être responsable de leur activité neurotoxique.

#### BIBLIOGRAPHIE

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

#### DISCUSSION

A. do Amaral: "Est-ce que le pouvoir antitoxinogénique de ces deux toxines a déjà été essayé comparativement?"

S. Lissitzky: "Non".

D. Mebs: "Have you found a direct relation between the toxicity and the reduction of the SS-bonds of your neurotoxin preparation?"

*S. Lissitzky*: "The fully reduced and carboxymethylated toxins have lost their toxicity."

*E. G. Mendes*: "Les deux toxines ont-elles le pouvoir de modifier l'activité cholinestérasique?"

*S. Lissitzky*: "Cet effet éventuel n'a pas été essayé."

*A. Shulov*: "Our group has an impression that there is a difference in constituents whether the venom is lyophilised, fresh or from direct bites. We shall be glad to help your group in the preparation of anti-serum against *Androctonus australis* if you would like to try to elucidate this difference, according to the method which led to excellent results your group achieved."

*S. Lissitzky*: "I thank you for your suggestion, Dr. Shulov, and I should be glad to get in touch with you."

*N. Sarkar*: "It is unusual that a polypeptide of such molecular weight as the scorpion venom is so easily denatured. Do you know which are the structural properties responsible for this behaviour of the polypeptide?"

*S. Lissitzki*: "I think we should wait until more information on the structure of the toxins is available."

*C. Y. Lee*: "Is there any study on the action of your purified neurotoxins on the neuromuscular transmission?"

*S. Lissitzki*: "We have not done such studies."

*J. M. Gonçalves*: "Etant donné que vous avez, par hydrazinolise, identifié la glycine comme C-terminal de la toxine II, avez-vous trouvé une résistance de la toxine à l'action de la carboxipeptidase du pancreas?"

*S. Lissitzki*: "Ces essais sont en cours de réalisation."