

Etude moléculaire de neurotoxines de venins de serpents marins et terrestres

André Ménez, Toru Tamiya, Gilberte Guignery-Frelat, Françoise Bouet, Jacques Mallet*, Jean-Claude Boulain et Pierre Fromageot

Service de Biochimie du Département de Biologie, CEN Saclay, 91191-Gif/Yvette Cédex

*Laboratoire de Neurobiologie, CNRS, 91191-Gif/Yvette

Abstract - The present paper describes (1) Biosynthesis of a snake neurotoxic protein and refolding of its polypeptide chain; (2) Identification of the surfaces by which a neurotoxin interacts with: i) the acetylcholine receptor, ii) specific monoclonal antibodies.

INTRODUCTION

Nombre de substances toxiques, d'origine animale, végétale ou microbienne ont pour cible un ou plusieurs élément(s) constitutif(s) de la jonction neuromusculaire. C'est le cas des neurotoxines des venins des serpents marins (Hydrophidae) ou terrestres (Elapidae) (Réf.1). Ces substances se lient avec sélectivité et avidité au récepteur nicotinique de l'acétylcholine, une structure protéique qui, traversant la membrane postsynaptique, assure la régulation de la dépolarisation de la fibre musculaire (Réf.2). La liaison entre une neurotoxine et le récepteur cholinergique entraîne une paralysie de la fibre musculaire. La mort survient à la suite d'un arrêt respiratoire consécutif au blocage des muscles du diaphragme.

Dès leur découverte, les neurotoxines de serpents sont devenues l'objet d'un intérêt considérable de la part des pharmacologistes et des neurobiologistes. Ceux-ci, mettant à profit ces outils exceptionnels en raison de leur spécificité, sont parvenus à localiser le récepteur cholinergique au sein de la membrane postsynaptique, puis à l'en isoler (Réf.2).

Voici une vingtaine d'années, les chimistes montraient que les neurotoxines sont des petites protéines d'une seule chaîne polypeptidique (Réfs.3 et 4). Plus tard, en 1976, les cristallographes précisaient la géométrie selon laquelle cette chaîne est repliée sur elle-même (Réfs.5 et 6). Au cours des dix années qui viennent de s'écouler, notre connaissance des neurotoxines a considérablement progressé. Le présent article décrira les deux points suivants: (1) la biosynthèse et la dynamique du platement de la chaîne polypeptidique d'une neurotoxine; (2) l'identification des surfaces par lesquelles une neurotoxine interagit avec, d'une part le récepteur cholinergique, d'autre part, des anticorps spécifiques.

QUELQUES RAPPELS SUR LES NEUROTOXINES

En 1966, à l'occasion du 7ème Congrès International de Biochimie, Eaker et Porath (Réf.3) d'une part et Tamiya et Sato (Réf.4) d'autre part, présentaient respectivement la séquence complète en acides aminés de la toxine α du cobra terrestre Naja nigricollis et celle, partielle, de l'érabutoxine b extraite du venin du serpent marin Laticauda semifasciata (Fig. 1). Ces deux molécules présentent de fortes homologies de séquences. Toutes deux sont constituées d'une seule chaîne polypeptidique d'une soixantaine de résidus parmi lesquels on compte huit résidus demi-cystines. Depuis lors, les séquences en acides aminés de quelques soixante-dix neurotoxines ont été identifiées (Réf.7). Au vu de ces séquences, on peut classer les neurotoxines selon deux groupes. Celui des neurotoxines "courtes" constituées d'une chaîne polypeptidique de 60, 61 ou 62 résidus et quatre liaisons disulfure et celui des neurotoxines "longues" dont la chaîne polypeptidique comporte 66/74 résidus et 4/5 ponts disulfure. Malgré ces différences, toutes ces molécules possèdent la propriété commune de se lier avec affinité au récepteur nicotinique de l'acétylcholine.

Au cours de cet article, il ne sera question que des toxines "courtes" et plus particulièrement de l'érabutoxine b et la toxine α , déjà citées. La figure 2 représente la structure dans l'espace de l'érabutoxine b.

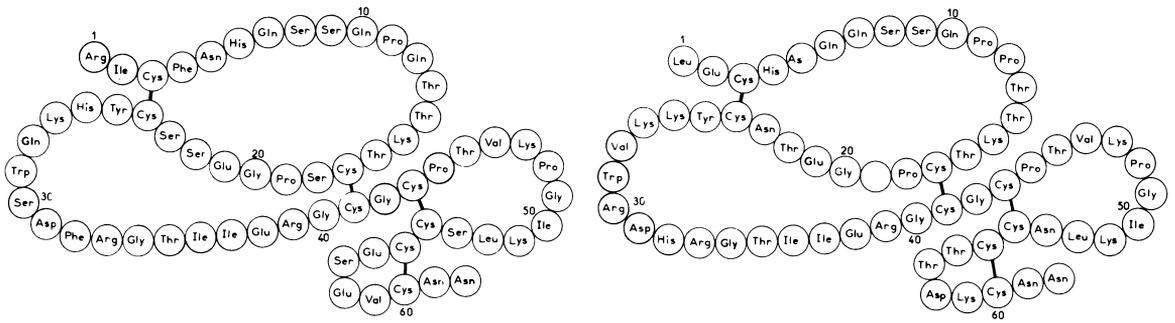


Fig.1 : Séquence en acides aminés de l'érabutoxine b de *Laticauda semifasciata* (Réf.3) (gauche) et de la toxine α de *Naja nigricollis* (Réf.4) (droite).

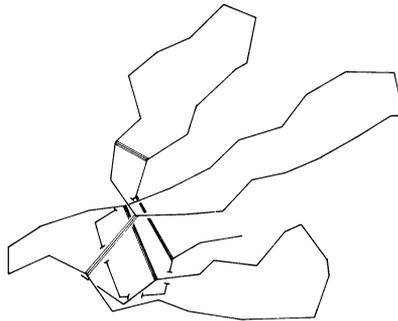


Fig.2 : Structure spatiale de la chaîne polypeptidique de l'érabutoxine b (Réf.8).

Biosynthèse d'une neurotoxine

Les neurotoxines sont particulièrement abondantes dans les glandes à venin des serpents marins (Réf.9). Nous avons choisi d'examiner la biosynthèse de l'érabutoxine b du *Laticauda semifasciata* dont la chaîne polypeptidique comporte 62 résidus (Fig.1). Il n'est pas possible, aujourd'hui, d'examiner la synthèse de la toxine, directement au cœur de la cellule. On peut, par contre, extraire de celle-ci la "machinerie" impliquée dans le processus et reproduire les conditions de biosynthèse *in vitro*. Nous avons donc extrait les ARN messagers poly (A⁺) contenus dans les glandes à venin du *L.semifasciata* et soumis ceux-ci à une traduction en présence de réticulocytes de lapin dans un milieu enrichi en acides aminés dont un au moins est fortement radioactif. Les ARN messagers étant hétérogènes, les protéines synthétisées le sont également. Il convient donc de distinguer parmi les protéines synthétisées, celles qui ont des traits communs avec l'érabutoxine b. Des anticorps préparés contre la forme réduite et carboxyméthylée de cette dernière, sont utilisés à cet effet. Ajoutés au mélange réactionnel, puis précipités, ils entraînent sélectivement le matériel possédant les propriétés immunologiques de l'érabutoxine. Le complexe formé est dissocié par un agent dénaturant puis soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide. La figure 3 montre le résultat de cette expérience. La fluorographie du gel (partie droite) révèle deux bandes radioactives qui migrent avec un poids moléculaire supérieur (PM \approx 13000) à celui de l'érabutoxine b (PM \approx 7400, partie gauche de la figure). Le produit ainsi détecté est reconnu spécifiquement par les anticorps antiérabutoxine puisqu'il disparaît lorsque ceux-ci sont incubés au préalable en présence d'un excès d'érabutoxine non radioactive. Quel est donc l'élément moléculaire qui confère au produit issu de la traduction de l'ARNm, une taille supérieure à celle de la toxine mature? Pour le savoir, Tamiya *et al.* (Réf.10), ont cloné un ADN complémentaire de l'ARN messager codant pour une toxine homologue, l'érabutoxine a. L'érabutoxine a possède aussi 62 acides aminés et diffère de l'érabutoxine b par un seul résidu localisé en position 26 (Réf.11). Les auteurs ont élucidé la séquence en nucléotides de l'ADN cloné et déduit celle, en acides aminés, de la protéine correspondante. Celle-ci est représentée sur la figure 4. Comme l'avaient démontrées les expériences de traduction, la taille de la

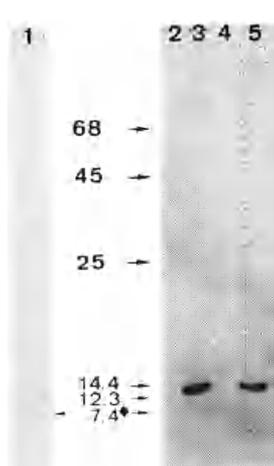


Fig.3 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide (gradient de 10 à 26%, SDS 0.1%). Les nombres indiqués au centre correspondent aux positions de migrations des protéines de poids moléculaires définis (68=68000; 45=45000, etc.). A gauche de cette colonne: la colonne 1 sur laquelle a migré l'érabutoxine b, réduite carboxyméthylée, non radioactive (PM=7400). Sa présence est révélée par un traitement au bleu de Comassie. La partie droite de cette colonne représente une fluorographie du gel où, seuls les produits radioactifs sont détectés. Colonne 2 (idem colonne 1): migration des érabutoxines non radioactives. Les colonnes suivantes correspondent aux migrations des produits issus de la traduction précipités par des anticorps antiérabutoxines. Colonne 3: les anticorps ne subissent aucun traitement préalable. Colonne 4: ils sont préincubés avec un excès d'érabutoxine non radioactive. Colonne 5: ils sont préincubés avec une autre toxine qui, on le sait, ne présente pas de réaction croisée avec l'érabutoxine.

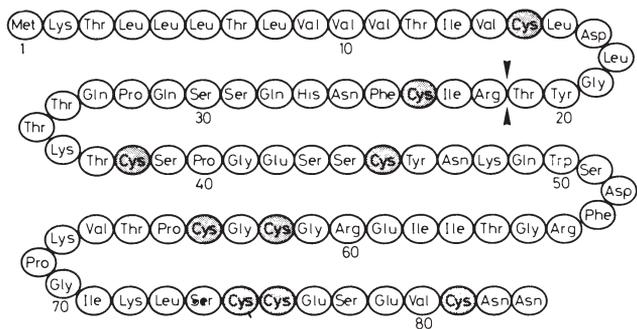


Fig. 4 : Séquence en acides aminés du précurseur de l'érabutoxine a, déduite de celle, en nucléotides, de l'ADN_C correspondant (Réf.10). Les deux flèches indiquent le début de la séquence de l'érabutoxine a telle qu'on la rencontre dans la lumière de la glande à venin (Réf.11). Les résidus cystéine sont en grisé.

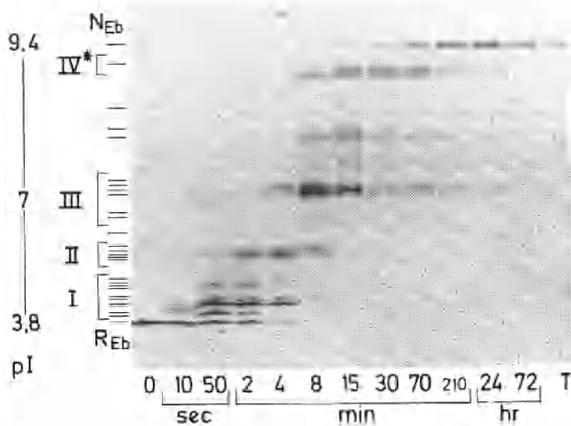


Fig.5 : Isoélectrophorèse sur gel de polyacrylamide (8%) des espèces moléculaires, piégées par l'acide iodoacétique, telles qu'elles apparaissent au cours du processus de réoxydation de l'érabutoxine b réduite. Les espèces RE_b et NE_b correspondent à l'érabutoxine b réduite et totalement renaturée, respectivement. T correspond à l'érabutoxine b native, non soumise au processus de réduction-réoxydation. I, II, III et IV, correspondent aux populations qui possèdent 1, 2, 3 et 4 ponts disulfure, respectivement. pI indique les points isoélectriques.

protéine codée par l'ARNm est supérieure à celle de la toxine mature. 21 acides aminés, tous localisés dans la partie N-terminale de la séquence, précèdent la séquence de l'érabutoxine a. Ce segment additionnel de 21 résidus est, notons le, particulièrement hydrophobe. On y trouve en particulier, 3 résidus leucine consécutifs puis un résidu leucine suivi de trois résidus valine consécutifs. Comme l'ont suggéré Blobel et Dobberstein (Réf.12), un peptide de cette nature est sans doute indispensable pour que la chaîne polypeptidique néosynthétisée puisse pénétrer puis traverser la membrane du reticulum endoplasmique où se trouve localisée la synthèse. La toxine est ensuite excrétée de la cellule et, c'est dans la lumière de la glande que nous la retrouverons. Elle aura entre temps subi deux transformations. (1) Le peptide signal de 21 résidus a disparu. Le clivage de liaison Thr₂₁-Arg₂₂ résulte probablement d'une action enzymatique associée à la membrane du reticulum (Réf.12); (2) la chaîne polypeptidique s'est structurée, adoptant la configuration représentée sur la figure 2. Nous pensons que cette structuration se produit après que le clivage évoqué ait eu lieu. En effet, nous avons vu, ci-dessus, que le précurseur de la toxine, tel qu'issu de la traduction de l'ARNm reconnaît des anticorps antiérabutoxine b réduite et carboxyméthylée. En fait, il ne reconnaît que les anticorps dirigés contre la forme dénaturée de la toxine (résultats non publiés). La présence du peptide signal de 21 résidus constituerait donc une gêne au repliement de la chaîne de la toxine.

Dynamique du plioement de la chaîne d'une neurotoxine

C'est *in vitro* que nous avons examiné le processus de plioement de la chaîne polypeptidique d'une neurotoxine (Réfs. 13 et 14).

Les quatre liaisons disulfure d'une neurotoxine (Fig.2), sont, nous l'avons dit, indispensables au maintien de sa structure. Leur réduction sélective par un réactif tel que le glutathion réduit, entraîne outre une désorganisation architecturale totale, (Réf.13), une perte de la toxicité, et des propriétés immunologiques initiales de la molécule. Plaçons maintenant la molécule ainsi réduite et présentant donc 8 groupes sulfhydryle libres, dans un milieu oxydo-réducteur approprié, par exemple contenant un mélange de glutathions oxydé (1 mM) et réduit (1 mM), à pH neutre ou légèrement alcalin. Il s'ensuit une réoxydation des groupes sulfhydryles accompagnés d'un recouvrement de la structure native et des propriétés biologiques natives de la molécule (réf.13). Spontanément, la toxine réduite a suivi un chemin de repliement qui l'a conduite vers sa forme native dans laquelle les 4 liaisons disulfure sont à nouveau formées. Comment se déroule un tel processus? Pour le savoir, nous avons cherché à isoler les diverses espèces moléculaires apparaissant au cours de la renaturation et qui possèdent 1,2,3 ou 4 liaisons disulfure. Pour cela nous avons ajouté, à différents temps de renaturation un excès d'acide iodoacétique. Ce réactif présente deux avantages. Premièrement, il bloque sélectivement les groupes SH libres, prévenant ainsi tout nouvel appariement et donc, toute possibilité d'évolution du processus. Deuxièmement, il introduit un groupe carboxylique qui contribue à l'abaissement du point isoélectrique (pI) de la molécule. Par exemple, le pI de l'érabutoxine b native est égal à 9,1 et celui de l'érabutoxine b réduite et ayant incorporé 8 groupes carboxylique est égal à 3,8. Par conséquent à des degrés de carboxyméthylation décroissants correspondent des pI_s croissants. Nous avons séparé par isoélectrophorèse les diverses populations piégées par l'acide iodoacétique au cours du processus de repliement de l'érabutoxine b. Le résultat de cette expérience est représenté sur la figure 5. Dans son état totalement réduit, la toxine possède, nous l'avons dit, 8 groupes SH qui, au cours de la renaturation, vont s'associer deux à deux. En théorie donc, 28 populations différentes possédant chacune 1 pont disulfure peuvent se former. Dans le cas de l'érabutoxine b, ce nombre est égal à 10, comme l'ont montré des expériences mettant en oeuvre de l'acide iodoacétique ¹⁴C (Réf.13). Il s'agit des 10 espèces regroupées sous le chiffre I (Figure 5). Cette valeur élevée, illustre l'aspect aléatoire du processus de repliement, tout au moins tel que nous pouvons l'observer *in vitro*. Autre remarque intéressante, toutes les populations ayant un pont disulfure ont, bien sûr, la même charge globale. Malgré cela, les points isoélectriques de ces populations sont différents, comme en témoigne la bonne résolution des espèces détectées. De telles différences sont probablement le reflet de caractéristiques conformationnelles particulières propres à chaque espèce moléculaire. Rapidement, les populations à 1 pont disulfure disparaissent au profit d'autres possédant 2 ponts disulfure (groupe II) lesquelles à leur tour font place aux populations à trois ponts (groupe III). En 30 min environ, la population IV*, à quatre liaisons disulfure devient majoritaire. Elle se caractérise par une migration différente de celle de la toxine native, désignée par T (axe des temps). Il faudra attendre 24 heures environ pour que IV* se transforme en N_{EB}, population ultime qui, elle, migre comme la toxine native. C'est cette dernière étape qui est limitante.

En conclusion, le processus de repliement d'une neurotoxine tel qu'on l'observe *in vitro*, est lent et complexe. Il met en jeu diverses formes moléculaires à 1, 2, 3 et 4 ponts disulfure dont certains doivent être réduits au cours de la réaction puisque, finalement, ce processus conduit à une forme moléculaire homogène ayant un pI identique à celui de

la toxine native et possédant toutes les propriétés structurales et biologiques de la substance parentale.

IDENTIFICATION DE LA SURFACE PAR LAQUELLE UNE NEUROTOXINE INTERAGIT AVEC LE RECEPTEUR CHOLINERGIQUE

Les neurotoxines, nous l'avons dit, s'associent au récepteur nicotinique de l'acétylcholine avec une grande sélectivité et une haute affinité ($K_D \approx 10^{-11}M$) (Réf.2). Ceci suggère que cette interaction résulte d'une multiplicité d'interactions ponctuelles de types hydrophobe, électrostatique, etc. Il se pose alors la question d'identifier parmi les acides aminés constitutifs d'une neurotoxine ceux qui sont directement impliqués dans l'association évoquée. Plusieurs informations fondées notamment sur : i) l'observation des séquences de neurotoxines homologues, ii) l'examen des conséquences de modifications chimiques sélectives sur l'activité toxique d'une toxine, nous permettent aujourd'hui de préciser la nature de ce que nous appellerons par la suite le site "toxique" d'une neurotoxine.

Examen des séquences en acides aminés des neurotoxines homologues

Si on examine les soixante-dix séquences de neurotoxines actuellement connues (Réf.7), on se rend compte que 25 positions sont occupées par des résidus invariants. Par exemple, la position 25 est toujours occupée par un résidu tyrosine, la position 29 par un résidu tryptophane, etc. Parmi ces 25 résidus conservés, certains ont, à l'évidence un rôle essentiellement structural. C'est le cas, nous l'avons vu, des 8 résidus demi-cystine, appariés en 4 liaisons disulfure. Comment distinguer les résidus dont le rôle est attaché au maintien de la structure de ceux qui sont plus directement fonctionnels? Une réponse à cette question nous est fournie (Réf.15) par la comparaison des séquences des neurotoxines avec celles des cardiotoxines, petites protéines des venins de cobras terrestres, dont la structure est similaire à celle des neurotoxines (Réf.16) mais dont la fonction est différente. On constate que parmi les 25 résidus conservés chez les neurotoxines, 13 le sont également chez les cardiotoxines. Il s'agit des 8 résidus demi-cystine déjà évoqués auxquels s'ajoutent les résidus 25, 40, 44, 50 et 57. Le rôle structural de ces 13 acides aminés est donc probable. Par différence, les 12 résidus conservés seulement chez les neurotoxines joueront probablement un rôle fonctionnel. Ces résidus sont représentés sur la figure 6. On le voit, le repliement de la chaîne rapproche ces douze résidus les uns des autres, de telle sorte qu'ensemble, ils constituent une surface compacte. Nous avons remarqué, en outre, que les cinq résidus invariants, Lys-27, Trp-29, Asp-31, Arg-33 et Glu-38 associés au résidu Ile-36 s'organisent selon une géométrie qui mime celle du curare (Réf.17).

Il importe maintenant de démontrer que la surface qui vient d'être définie (Fig.6) correspond effectivement au site "toxique" d'une neurotoxine.

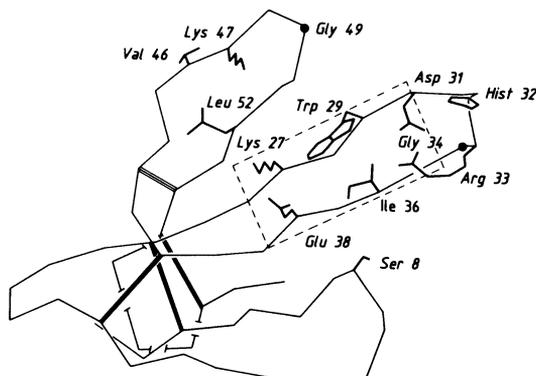


Fig.6 : Les acides aminés qui constituent le site "toxique" d'une neurotoxine. Douze acides aminés (en italique) sont invariants. Cinq d'entre eux (27,29,31,33 et 38) associés au résidu Ile 36 s'organisent selon une géométrie qui mime le curare.

Modifications chimiques d'une neurotoxine

Si l'hypothèse avancée ci-dessus est correcte, on peut prévoir que la modification sélective d'un résidu appartenant au site présumé "toxique" entraînera une réduction d'affinité de la toxine pour le récepteur tandis qu'elle restera sans effet si le résidu est en dehors de ce site.

Nous présenterons ici deux modifications particulièrement révélatrices à cet égard. Il s'agit des modifications des résidus tryptophane et lysine. Examinons tout d'abord la modification sélective du seul tryptophane de la toxine α de *Naja nigricollis*. Celui-ci est localisé en position 29. Lorsque l'on soumet la toxine en milieu acide, à un excès de chlorure de nitro-2-phénylsulfényle, il s'ensuit une incorporation sélective en position C₂ de l'indole 29, d'un groupe nitrophénylsulfényle, via une liaison thioéther (Réf.18). Débarrassé du réactif en excès, le dérivé est ensuite purifié par chromatographie liquide à haute pression. Ce dérivé présente des caractéristiques structurales identiques à celle du produit de départ (Réf. 19). Cependant, son affinité pour le récepteur nicotinique de l'acétylcholine, telle qu'elle est mesurée par des expériences de compétition mettant en oeuvre la toxine tritiée et des fragments de membrane riches en récepteur cholinergique, s'avère être sensiblement inférieure à celle de la toxine non modifiée. Les valeurs des constantes de dissociation à l'équilibre sont égales à $59 \cdot 10^{-11} \text{M}$ et $2 \cdot 10^{-11} \text{M}$, respectivement (Réf. 19).

Examinons maintenant la modification des résidus lysine. La toxine α de *Naja nigricollis* possède 7 fonctions aminées distribuées sur 6 résidus lysine (positions 15, 26, 27, 47, 51 et 59) et un groupe NH_3^+ terminal (Fig.1). L'anhydride acétique, on le sait, réagit avec les fonctions aminées et conduit à la formation d'une liaison amide accompagnée de la suppression de la charge initiale. Comment acétyler individuellement chaque fonction aminée de la toxine α ? Pour y parvenir nous avons procédé à une acétylation douce, où la toxine est en excès par rapport au réactif. De la sorte, nous favorisons l'acétylation d'une seule fonction aminée par molécule de toxine. Compte tenu du grand nombre de fonctions aminées présentes au sein de la toxine, le produit réactionnel est, bien entendu, hétérogène et il convient de séparer les uns des autres les dérivés monomodifiés ainsi préparés. Ceci est réalisé par chromatographie sur résine échangeuse d'ions et chromatographie liquide à haute pression (Réf.18). De la sorte, nous obtenons 5 dérivés monoacétylés purs. Pour chaque dérivé, la fonction aminée modifiée doit ensuite être identifiée. Ceci est réalisé sur la base d'une hydrolyse trypsique comparée entre, d'une part, la toxine non modifiée, et d'autre part, chaque dérivé monoacétylé (Réf.19). Cette analyse montre que les 5 dérivés obtenus sont monoacétylés au niveau du NH_3^+ terminal, des résidus lysine 15, 27, 47 et 51. En revanche, les résidus lysine 26 et 59 se sont avérés inaccessibles au réactif. De nombreuses analyses spectroscopiques ont montré que tous ces dérivés sont structuralement similaires à la toxine parentale. Nous avons examiné les affinités de tous ces dérivés vis-à-vis du récepteur cholinergique. Les constantes de dissociation à l'équilibre des dérivés monoacétylés sur les groupes NH_3^+ , 15 et 51 sont de valeurs égales à $3 \cdot 10^{-11} \text{M}$, $9 \cdot 10^{-11} \text{M}$ et $9 \cdot 10^{-11} \text{M}$, respectivement, valeurs proches de celle trouvée pour la toxine parentale ($K_D = 4 \cdot 10^{-11} \text{M}$). Par contre les dérivés acétylés sur les résidus lysine 27 et 47 se caractérisent par des constantes d'affinité dont les valeurs sont sensiblement plus élevées, soit $29 \cdot 10^{-11} \text{M}$ et $52 \cdot 10^{-11} \text{M}$, respectivement.

En conclusion, nous venons de présenter les modifications sélectives de six résidus de la toxine de *Naja nigricollis*. Trois d'entre elles sont sans effet notable sur l'affinité de la toxine pour le récepteur cholinergique. Il s'agit des modifications des groupes aminés en position 1, 15 et 51 qui, tous trois, sont donc exclus du site "toxique" de la toxine. Les trois autres modifications par contre altèrent sensiblement l'affinité de la toxine. Ce sont les modifications des résidus 27, 29 et 47. Ces trois acides aminés sont donc impliqués dans le site "toxique" de la toxine α . Le résultat de ces expériences valide totalement l'hypothèse selon laquelle le site "toxique" d'une neurotoxine est constitué par les résidus représentés sur la figure 6.

Identification des surfaces par lesquelles les neurotoxines interagissent avec les anticorps spécifiques

Voici dix ans, Köhler et Milstein (Réf.20), décrivaient le procédé qui permet de préparer des anticorps monoclonaux. Spécifique d'un site antigénique précis, c'est-à-dire d'une surface définie comportant 5-6 acides aminés, l'anticorps monoclonal apparaît comme une sonde immunologique exceptionnelle. Nous avons préparé divers anticorps monoclonaux dirigés contre la toxine α du venin de *Naja nigricollis*. Nous décrivons ici brièvement l'identification des sites antigéniques spécifiques de deux d'entre eux dénommés $M_{\alpha 1}$ (Réf.21) et $M_{\alpha 2-3}$ (Réf.22). Ces anticorps se caractérisent par des affinités élevées, les valeurs des K_D respectifs sont égales à $0,4 \cdot 10^{-9} \text{M}$ et 10^{-8}M . L'identification des acides aminés de la toxine impliqués dans les interactions avec ces anticorps repose sur des expériences de compétitions, mettant en oeuvre la toxine tritiée, les anticorps monoclonaux, les dérivés de la toxine sélectivement modifiée sur un acide aminé (cf. ci-dessus) et quelques

Tableau 1

Affinités de la toxine α native et de ses dérivés monoacétylés en positions NH_2 terminale, Lys-15, Lys-29, Lys-47 et Lys-51 et monosulfénylé en position 29, vis-à-vis des deux anticorps $\text{M}_{\alpha 1}$ et $\text{M}_{\alpha 2-3}$. Les valeurs des constantes d'inhibition K_I sont calculées à partir de la formule $K_I = \text{IC}_{50} / (1 + \frac{L^*}{K_D^*})$ où L^* et K_D^* indiquent la concentration totale en toxine radioactive et la constante de dissociation à l'équilibre de cette toxine. IC_{50} est la concentration en toxine non radioactive qui provoque une diminution de 50% de la quantité de toxine radioactive liée à l'anticorps.

Positions modifiées	Aucune	NH_3^+ -terminal	15	27	29	47	51
Affinités des toxines ($K_I \cdot 10^9 \text{M}$) pour $\text{M}_{\alpha 1}$	0,4	4,5	11,5	0,4	0,3	0,5	0,5
Affinités des toxines ($K_I \cdot 10^9 \text{M}$) pour $\text{M}_{\alpha 2-3}$	40	40	50	140	520	240	30

toxines homologues. Les affinités de ces dernières sont estimées à partir des concentrations auxquelles elles inhibent 50% de la liaison ^3H -toxine-anticorps. Quelques constantes d'inhibition (K_I) déduites des valeurs obtenues sont indiquées sur le tableau I. On le voit, les modifications des positions 27, 29, 47 et 51 n'altèrent pas l'affinité de la toxine vis-à-vis de $\text{M}_{\alpha 1}$. Ces quatre résidus sont donc extérieurs au site antigénique par lequel la toxine α se lie à cet anticorps. En revanche, les modifications de la lysine 15 et du groupe NH_3^+ terminal réduisent l'affinité de la toxine, pour l'anticorps. Nous concluons que ces deux résidus sont des éléments constitutifs de l'épitope spécifique de $\text{M}_{\alpha 1}$. Un raisonnement analogue nous conduit à conclure que $\text{M}_{\alpha 2-3}$ se lie, à la surface de la toxine α , en un site antigénique incluant les résidus Lys-27, Trp-29 et Lys-47, mais non le groupe NH_3^+ -terminal ni les résidus Lys-15 et Lys-51. Des expériences de compétition complémentaires effectuées notamment avec des toxines naturelles homologues nous ont permis de préciser davantage la composition en acides aminés des deux sites antigéniques. L'ensemble des résultats est présenté sur la figure 7. On le voit, les deux anticorps se lient sur deux sites antigéniques topographiquement différents. En outre l'un spécifique de $\text{M}_{\alpha 1}$ est topographiquement différent du site "toxique" tandis que l'autre le recouvre. Malgré cette distinction topographique, les deux anticorps sont

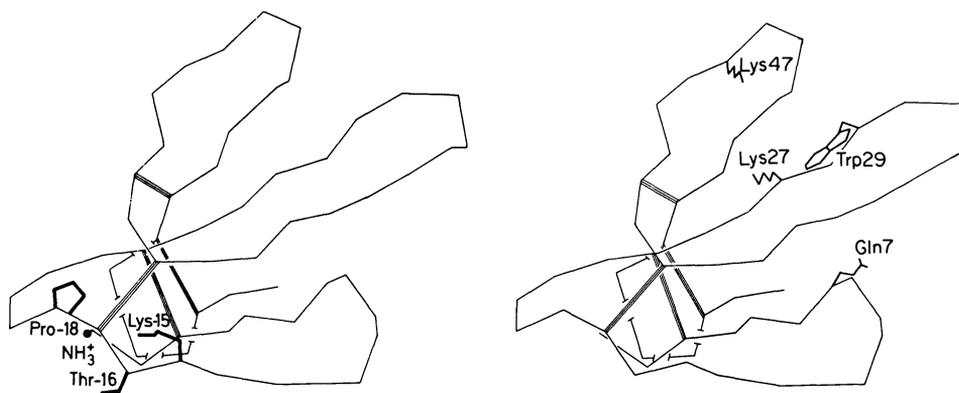


Fig.7 : Surfaces antigéniques par lesquelles la toxine α de *Naja nigricollis* interagit avec les anticorps monoclonaux $\text{M}_{\alpha 1}$ (gauche) et $\text{M}_{\alpha 2-3}$ (droite).

neutralisants *in vitro* et *in vivo* (Réfs. 21 et 22). Comment expliquer ces neutralisations? $\text{M}_{\alpha 2-3}$ qui recouvre le site "toxique" agit probablement selon une compétition stricte: l'anticorps et le récepteur ne peuvent se lier simultanément à la toxine. Par contre, on ne peut expliquer aussi simplement le caractère neutralisant de $\text{M}_{\alpha 1}$. Diverses expériences suggèrent que la liaison de l'anticorps induit un changement de conformation du site "toxique" (Réfs.22, 23 et 24). L'expérience la plus convaincante à cet égard est celle qui montre que $\text{M}_{\alpha 1}$ est capable de déstabiliser le complexe toxine-récepteur. Une observation qui implique la formation d'un complexe ternaire anticorps-toxine-récepteur (Réf.24). A l'évidence, un tel anticorps serait particulièrement adapté pour développer une sérothérapie efficace.

CONCLUSION

Comme en témoigne cet article, les neurotoxines de serpents de mer et de terre sont bien connues sur le plan moléculaire. Le processus de biosynthèse, les structures chimique et spatiale, la surface responsable de leur toxicité et quelques déterminants antigéniques sont désormais identifiés. Les connaissances acquises ouvrent des perspectives nouvelles dans divers domaines, notamment dans celui d'une thérapie spécifique élaborée à partir d'antigènes de synthèse. Dans un futur que nous espérons proche, nous envisageons de synthétiser des peptides qui mimeront les épitopes présentement localisés. Ces épitopes, nous l'avons vu, lient, et donc probablement induisent la production (Réfs. 25 et 26), d'anticorps neutralisants. Quatre acides aminés appartenant à chaque épitope sont actuellement identifiés. Or, on le sait, un site antigénique comporte davantage de résidus. Il convient donc, avant d'entreprendre les synthèses évoquées, d'identifier tous les éléments constitutifs de deux épitopes. Dans cet objectif, de nouveaux outils sont nécessaires. En particulier, d'autres toxines sélectivement modifiées au niveau d'un seul résidu. A cet égard, la voie de mutagenèse dirigée paraît tout à fait prometteuse, d'autant que l'élément décisif de cette technique, à savoir l'ADN_C est aujourd'hui cloné (cf. début de cet article).

REMERCIEMENTS

Nous remercions Mesdames MAILLET et PATRON qui ont assuré la frappe de cet article.

REFERENCES

- (1) C.C. CHANG, Handb. Exp. Pharm. p.309 - Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, (1979).
- (2) J-L. POPOT et J-P. CHANGEUX, Physiol. Rev., **64**, 1162-1239 (1984).
- (3) D. EAKER et J. PORATH, VII ème Congrès International de Biochimie, 1087-1089 (1966).
- (4) N. TAMIYA et S. SATO, VIIème Congrès International de Biochimie, 497 (1967).
- (5) B.W. LOW, H.S. PRESTON, A. SATO, L.S. ROSEN, J.E. SEARL, A.D. RUDKO et J.S. RICHARDSON, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 2991-2994 (1976).
- (6) D. TSERNOGLOU et G. PETSKO, FEBS Letters, **68**, I-4 (1976).
- (7) M.J. DUFTON et R.C. HIDER, C.R.C. Crit. Rev. Biochem., **14**, 113-171 (1983).
- (8) M.B. KIMBALL, A. SATO, J.S. RICHARDSON, L.S. ROSEN et B.W. LOW, Biochem. Biophys. Res. Comm., **88**, 950-959 (1979).
- (9) M. TAKEDA, H. YOSHIDA et N. TAMIYA, Toxicon, **12**, 633-641 (1974).
- (10) T. TAMIYA, A. LAMOUROUX, J-F. JULIEN, B. GRIMA, J. MALLET, P. FROMAGEOT et A. MENEZ, Biochimie, **67**, sous presse (1985).
- (11) N. NISHIDA, Y. KOKUBUN et N. TAMIYA, Biochem. J., **226**, 879-880 (1985).
- (12) G. BLOBEL et B. DOBBERSTEIN, J. Cell. Biol., **67**, 852-862 (1975).
- (13) A. MENEZ, F. BOUET, W. GUSCHLBAUER et P. FROMAGEOT, Biochemistry, **19**, 4166-4172 (1980).
- (14) F. BOUET, A. MENEZ, R.C. HIDER et P. FROMAGEOT, Biochem. J. **201**, 495-499 (1982).
- (15) L. RYDEN, D. GABEL et D. EAKER, Int. J. Pept. Protein Res. **5**, 261-273 (1973).
- (16) B. REES, D. MORAS, J-C. THIERY, M. GILLIBERT, J-C. FISHER, A. SCHWERTZ et M. LAZDUNSKI, 8ème Congrès Européen de Cristallographie (Liège), résumé, (1983).
- (17) A. MENEZ, J-C. BOULAIN, G. FAURE, J. COUDERC, P. LIACOPOULOS, N. TAMIYA et P. FROMAGEOT, Toxicon, **20**, 95-103 (1982).

- (18) E. SCOFFONE, A. FONTANA et C.A. ROCCHI, Biochemistry, 7, 980- 986 (1968).
- (19) G. FAURE, J-C. BOULAIN, F. BOUET, Th. MONTENAY-GARESTIER, P. FROMAGEOT et A. MENEZ, Biochemistry, 22, 2068-2076 (1983).
- (20) G. KOHLER et C. MILSTEIN, Nature, Lond., 256, 495-497 (1975).
- (21) J-C. BOULAIN, A. MENEZ, J. COUDERC, G. FAURE, P. LIACOPOULOS et P. FROMAGEOT, Biochemistry, 21, 2910-2915 (1982).
- (22) J-C. BOULAIN et A. MENEZ, manuscrit en préparation.
- (23) A. ROUSSELET, G. FAURE, J-C. BOULAIN et A. MENEZ, Eur. J. Biochem., 140, 31-37, (1984).
- (24) J-C. BOULAIN et A. MENEZ, Science (Wash. D.C.), 217, 732-733 (1982).
- (25) R. ARNON, M. SHAPIRA et C.O. JACOB, J. Imm. Meth. 61, 261-273 (1983).
- (26) T.M. SHINNICK, J.G. SUTCLIFFE, N. GREEN et R.A. LERNER, Ann. Rev. Microbiol., 37, 425-446 (1983).