

# Relations entre la fonction venimeuse et la fonction immunitaire innée

Max Goyffon<sup>1</sup>, Frederick Saul<sup>2</sup> et Grazyna Faure<sup>3</sup>

<sup>1</sup> UMR CNRS 7245, Département RDDM, Muséum national d'Histoire naturelle, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France

<sup>2</sup> Institut Pasteur, Plate-forme de Cristallographie, CNRS-UMR 3528, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

<sup>3</sup> Institut Pasteur, Unité Récepteurs-Canaux, CNRS-UMR 3571, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

Auteur correspondant : Max Goyffon, [mgoyffon@mnhn.fr](mailto:mgoyffon@mnhn.fr)

Reçu le 21 août 2015

**Résumé** – La fonction venimeuse est étudiée dans ses rapports avec la fonction immunitaire innée à partir de deux exemples choisis dans les venins de scorpions puis dans les venins de serpents. Dans le premier exemple, l'analyse des structures des toxines de scorpion et des défensines amène à considérer la réelle intrication des deux fonctions. Dans le second exemple, l'analyse de la fonction des inhibiteurs de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) neurotoxique conduit à l'analyse de structures homologues du système immunitaire inné de vertébrés (mammifères) pour aboutir à une même conclusion. Les venins de scorpions contiennent principalement des toxines actives sur les canaux ioniques membranaires dont la structure est comparable à celle de leurs défensines circulantes. Fonctionnellement, il n'y a pas d'erreur : les défensines se trouvent dans l'hémolymphe des scorpions, les toxines dans le venin utilisé dans l'immobilisation des proies. Toxines et défensines possèdent une homologie structurale et contiennent un motif tridimensionnel CS $\alpha\beta$  conservé dit aussi « *Cysteine-Stabilized alpha-helical and beta-sheet fold* », composé de ponts disulfures conservés qui unissent une hélice  $\alpha$  et des feuillettes  $\beta$  antiparallèles. Une analyse génomique a permis aux auteurs de conclure que les toxines longues du venin de scorpion se sont précocement isolées d'un ensemble ayant donné naissance d'une part à l'ensemble « toxines longues » du venin et d'autre part à l'ensemble « toxines courtes et défensines ». Il y aurait donc bien un ancêtre commun aux défensines et aux toxines du venin. Une autre équipe a pu synthétiser une toxine courte de venin de scorpion à partir d'une défensine d'un hyménoptère parasitoïde. Enfin, un peptide antibactérien de scorpion, l'androctonine, dont la structure est comparable à celle d'une toxine de venin de cône, a montré que les deux molécules possèdent la même haute affinité pour le récepteur post-synaptique à l'acétylcholine de *Torpedo* sp. Les inhibiteurs naturels de phospholipases A<sub>2</sub>, identifiés principalement dans le sang de serpents et plus rarement dans certaines glandes à venin, expliquent la résistance habituelle des serpents venimeux vis-à-vis de leur propre venin, comme s'ils étaient protégés naturellement contre l'une des catégories de toxines les plus puissantes de leur venin. Les inhibiteurs de PLA<sub>2</sub> ou PLI possèdent tous des structures variées qui les apparentent aux protéines de l'immunité innée, comme les lectines et les récepteurs Toll notamment, ce qui les différencie nettement des anticorps neutralisants. On trouve donc, chez des vertébrés comme chez des invertébrés, des molécules neutralisant les toxines qui sont composées de molécules apparentées aux protéines de l'immunité innée. Au total, ni dans les structures ni dans le mode de fonctionnement ni dans la phylogénie, la fonction venimeuse ne se détache véritablement de la fonction immunitaire innée.

**Mots clés** : Scorpions / serpents / défensines / phospholipase inhibiteurs / immunité innée

**Abstract** – Relationships between venomous function and innate immune function.

Venomous function is investigated in relation to innate immune function in two cases selected from scorpion venom and serpent venom. In the first case, structural analysis

of scorpion toxins and defensins reveals a close interrelation between both functions (toxic and innate immune system function). In the second case, structural and functional studies of natural inhibitors of toxic snake venom phospholipases A<sub>2</sub> reveal homology with components of the innate immune system, leading to a similar conclusion. Although there is a clear functional distinction between neurotoxins, which act by targeting membrane ion channels, and the circulating defensins which protect the organism from pathogens, the scorpion short toxins and defensins share a common protein folding scaffold with a conserved cysteine-stabilized alpha-beta motif of three disulfide bridges linking a short alpha helix and an antiparallel beta sheet. Genomic analysis suggests that these proteins share a common ancestor (long venom toxins were separated from an early gene family which gave rise to separate short toxin and defensin families). Furthermore, a scorpion toxin has been experimentally synthesized from an insect defensin, and an antibacterial scorpion peptide, androctonin (whose structure is similar to that of a cone snail venom toxin), was shown to have a similar high affinity for the postsynaptic acetylcholine receptor of *Torpedo* sp. Natural inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> found in the blood of snakes are associated with the resistance of venomous snakes to their own highly neurotoxic venom proteins. Three classes of phospholipases A<sub>2</sub> inhibitors (PLI- $\alpha$ , PLI- $\beta$ , PLI- $\gamma$ ) have been identified. These inhibitors display diverse structural motifs related to innate immune proteins including carbohydrate recognition domains (CRD), leucine rich repeat domains (found in Toll-like receptors) and three finger domains, which clearly differentiate them from components of the adaptive immune system. Thus, in structure, function and phylogeny, venomous function in both vertebrates and invertebrates are clearly interrelated with innate immune function.

**Key words:** Scorpions / snakes / defensins / PLI (Phospholipase inhibition) / innate immunity

## Abréviations

AMP	<i>AntiMicrobial Peptide</i>
CICS	<i>Crotalus Inhibitor from Crotalus Serum</i>
CRISP	<i>Cystein Rich Secreted Protein</i>
CS $\alpha\beta$	<i>Cystein Stabilized alpha-beta</i>
CTX	charybdotoxine
Cyt C	cytochrome C
LRG	$\alpha$ 2- globuline sérique humaine
LRR	<i>Leucin Rich Repeat</i>
PLA	PhosphoLipase A
PLI	<i>PhosphoLipases Inhibitor</i>
sPLA <sub>2</sub>	PLA <sub>2</sub> sécrétée
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>

Chez les vertébrés, deux systèmes de défense immunitaire d'importance équivalente, qui protègent l'individu contre une infection microbienne, peuvent être identifiés, l'immunité adaptative et l'immunité innée.

L'immunité adaptative possède deux caractéristiques, la spécificité liée à la présence d'anticorps neutralisants, fréquemment du type IgG (immunoglobulines G), et la mémoire, d'où la possibilité de vaccinations. Ce type de réponse très ancien n'existe que chez les vertébrés (Leulier & Lemaître, 2002).

L'immunité dite innée, phylogénétiquement plus ancienne que la précédente, existe chez tous les

métazoaires, vertébrés compris, mais aussi chez les végétaux. Elle est mise en jeu de façon automatique face à toute agression, microbienne ou mécanique. Elle paraît limitée à la reconnaissance du soi et du non-soi. Les récepteurs *Toll* (ou TLR, *Toll-Like Receptors*) réagissent à des motifs structuraux habituellement absents chez les Eucaryotes, mais présents chez les bactéries, comme les LPS (lipopolysaccharides) des bactéries Gram-négatives ou les peptidoglycanes des bactéries Gram-positives. Ce type de motif est parfois appelé PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Les récepteurs *Toll* sont des protéines transmembranaires qui possèdent un domaine riche en motifs LRR (*Leucin Rich Repeat*). Leur stimulation conduit chez l'homme à une réaction de type inflammatoire (phagocytose, opsonisation, intervention du complément etc.), mais peut conduire aussi, chez les arthropodes en particulier, à la libération de peptides antibactériens (AMP, *AntiMicrobial Peptides*), un ensemble auquel appartiennent notamment les « défensines ». Les défensines sont habituellement inductibles (insectes), n'apparaissant qu'après une stimulation (bactérienne ou mécanique), elles sont plus rarement constitutives, c'est à dire toujours présentes dans l'hémolymphe de l'animal comme chez les scorpions, indépendamment de toute stimulation (Cociancich *et al.*, 1993). Chez les vertébrés, outre les barrières physiques, la réponse immunitaire innée

représente la ligne de défense principale contre les infections microbiennes. La qualité de la réponse immunitaire innée détermine aussi la qualité de la réponse immunitaire adaptative qui suivra : les deux types d'immunité ont en quelque sorte partie liée, en tout cas elles ne sont pas indépendantes.

Les relations entre fonction venimeuse et fonction immunitaire innée seront illustrées par deux exemples, l'un reposant sur une analyse des venins de scorpions, l'autre sur une analyse des inhibiteurs naturels de phospholipases A<sub>2</sub> ou PLA<sub>2</sub> neurotoxiques des venins de serpents. Le premier exemple ira des structures vers la fonction, le second exemple ira de la fonction vers les structures et les deux démarches convergeront sur une même conclusion.

## 1 Les venins de scorpions

La composition des venins de scorpions de la famille des Buthidæ repose sur une base simple. Les venins des espèces appartenant à cette famille contiennent des toxines protéiques agissant sur les canaux ioniques de membranes cellulaires, soit de cellules appartenant à un tissu dit « excitable » (système neuromusculaire et toxines longues), soit de cellules de tout tissu (toxines courtes). Elles modifient l'activité d'un certain nombre de canaux ioniques, canaux sodium, canaux potassium, canaux chlore principalement, mais aussi canaux calcium intra-cellulaires. C'est plus précisément ce groupe de toxines actives sur les canaux ioniques membranaires qui retiendra l'attention. Le contenu des venins de scorpions Buthidæ est pauvre en enzymes, pratiquement limité à une hyaluronidase, pourvu que l'obtention du venin soit consécutive à une stimulation mécanique de l'animal. Et de fait, les piqûres de scorpions Buthidæ ne déclenchent pas de réaction inflammatoire cutanée, ni chez l'animal d'expérimentation, ni chez l'homme accidentellement victime d'une piqûre d'un scorpion de la famille des Buthidæ, même chez l'enfant. Précisons encore que si le venin est obtenu par une « traite électrique », le venin contiendra des enzymes variées, dont la présence est vraisemblablement artéfactuelle : tout porte à penser qu'il s'agit d'enzymes intra-cellulaires libérées par un choc électrique qui lèse les cellules sécrétrices de la glande à venin. Seul le venin « physiologique » est pauvre en enzymes.

Deux types de venins ont été décrits chez le scorpion (Inceoglu *et al.*, 2003) : ces auteurs ont constaté que si la proie capturée par le scorpion est petite et ne se débat pas, elle est d'abord immobilisée par l'injection d'un venin riche en ions potassium, mais pauvre en toxines. Si la proie se débat ou si elle est volumineuse, une deuxième dose de venin lui

est injectée, un venin non plus limpide mais visqueux et d'aspect laiteux, riche en toxines. Les auteurs concluent que les toxines, dont la biosynthèse a un certain coût énergétique, sont économisées par l'animal. Plus généralement, le scorpion fait preuve d'un métabolisme peu actif et sa consommation en oxygène est limitée. Ses capacités à économiser l'énergie dépensée ont été signalées à plusieurs reprises (Goyffon, 1983 ; Goyffon et Roman, 2001).

Sur la base des travaux de Vachon (1973, 1975), il est possible de distinguer deux sous-familles chez les Buthidæ, les Buthinæ et les Parabuthinæ (Goyffon & Billiard, 2002). En pratique, les deux types principaux de toxines, toxines longues et toxines courtes, sont présents dans le venin de tous les représentants de la famille des Buthidæ.

### 1.1 les toxines longues

Historiquement, les toxines longues ont été les premières à être identifiées (Miranda & Lissitzky, 1958 ; Miranda *et al.*, 1960). Elles sont les principales responsables de la symptomatologie de l'envenimation chez l'homme et les mammifères (Rochat *et al.*, 1979). Elles constituent en général 4 à 5 % du poids sec du venin, exceptionnellement davantage. Les toxines longues sont constituées d'une chaîne d'une soixantaine d'acides-amino-acides et leur masse molaire est de l'ordre de 7 kDa. Elles sont réticulées par 4 ponts disulfures. Jusqu'à présent, les toxines longues n'ont été trouvées que dans les venins de Buthidæ, la famille qui rassemble, à une exception près, les espèces d'importance médicale. Elles semblent absentes des venins des espèces appartenant aux autres familles (18 familles au total selon Prendini & Wheeler, 2005 ; Stockmann & Ythier, 2010). Elles agissent uniquement sur les canaux sodium des cellules dites excitables (neurones et fibres musculaires striées) selon deux modalités :

- soit, **type  $\alpha$** , en bloquant l'inactivation du potentiel d'action. Ces toxines  $\alpha$ , qui sont dites « potentiel-dépendantes » en raison de leur mode d'action, ne se trouvent que dans les venins d'espèces de scorpions paléotropicales, c'est à dire de l'Ancien Monde (Goyffon & Tournier, 2014), exceptionnellement dans les venins d'espèces du Nouveau Monde. Elles se fixent sur le site 3 du canal sodium (tableau 1). La spécificité des toxines du venin des scorpions Buthidæ vis-à-vis des espèces animales est diverse (Rochat *et al.*, 1979) : on peut y distinguer des toxines anti-mammifères, qui généralement sont dépourvues de méthionine, des toxines anti-insectes, des toxines mixtes à la fois anti-mammifères et anti-insectes, rares dans les venins des espèces paléotropicales. Les toxines anti-insectes de type  $\alpha$  entraînent généralement chez l'insecte des paralysies flasques. La plus grande part de la toxicité, pour

**Tableau 1.** Sites de fixation de diverses toxines sur le canal sodium (d'après Legros & Goyffon, 2010). L'indication de plusieurs toxines pour un même site implique une possible compétition pour chacune d'entre elles.

Toxines	Mécanismes d'action
1) Tétrodotoxine (TTX), STX, $\mu$ -conotoxine GIIIa	Blocage de la conductance ionique
2) Batrachotoxine, Véatridine, Aconitine, Grayanotoxine	Activation permanente du canal sodique
3) Toxines $\alpha$ de scorpion	Inhibition du potentiel de fermeture
4) Toxines $\beta$ de scorpion	Diminution du seuil d'activation
5) Brévétotoxines, ciguatoxines	Diminution du seuil d'activation, blocage de l'inactivation
6) $\delta$ -Conotoxines	Ralentissement du potentiel de fermeture
7) Pyréthriinoïdes (insectes)	Ralentissement de l'inactivation, Diminution de l'amplitude des PA

STX : saxitoxine ; PA : potentiels d'action. Les toxines de venin de scorpions définissent deux sites.

l'Homme et les mammifères, du venin du scorpion nord-africain *Androctonus australis*, espèce des régions nord-saharienne et saharienne, est due principalement à trois toxines longues anti-mammifères (AaH I, AaH II, AaH III). La toxine AaH II est la plus toxique pour la souris : DL50 < 1 ng par souris de 20 g par injection intra-cérébroventriculaire, et haute affinité pour son site de fixation ( $K_D = 0,1$  nM) sur les canaux sodium. Les toxines anti-insectes de type  $\alpha$  sont parfois très faiblement toxiques pour les mammifères (Eitan *et al.*, 1990 ; Legros & Goyffon, 2010) sauf rares exceptions comme la toxine III de *Leiurus quinquestriatus* (Kopeyan *et al.*, 1993). Toutefois, les toxines longues anti-mammifères ne franchissent pas la barrière hémato-méningée, ce qui signifie que les symptômes de l'envenimation sont dus à des atteintes neurotoxiques périphériques et non centrales (Clot-Faybessé *et al.*, 2000).

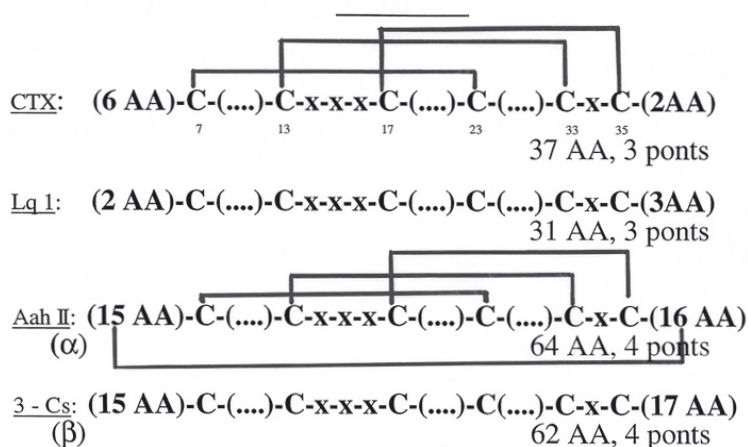
Les premières expérimentations de Paul Bert (1865, 1885) avec le venin du scorpion *Buthus occitanus* concernaient donc des toxines de type  $\alpha$ . Paul Bert avait noté par exemple que du sang de chien auquel du venin de ce scorpion avait été injecté était sans effet sur un autre chien, ce qu'on traduirait maintenant par une disparition rapide des toxines qui vont se fixer en peu de temps sur leurs récepteurs, ce qui s'est confirmé plus d'un siècle plus tard (Choumet, 2010).

- **soit, type  $\beta$** , en abaissant le seuil d'excitabilité de la membrane cellulaire. Ces toxines  $\beta$ , potentiel-indépendantes, existent uniquement dans les venins d'espèces néotropicales ou espèces du Nouveau Monde. Comme les toxines précédentes, elles comptent des toxines spécifiques de mammifères, des toxines spécifiques d'insectes, et des toxines mixtes. Elles se fixent sur le site 4 du canal sodium avec une affinité nanomolaire. Elles provoquent parfois une réponse sous la forme de trains de potentiels d'action. La toxine de référence est la toxine II de *Centruroides suffusus suffusus* ou CII, qui fut longtemps considérée comme

une toxine spécifique de mammifères, sans effet sur les insectes. Les toxines  $\beta$  anti-insectes peuvent entraîner une paralysie contracturante ou induire une paralysie flasque. Comme les toxines  $\alpha$  et  $\beta$  se fixent sur des sites différents du canal sodium, elles n'entrent pas en compétition (tableau 1). Toutefois, les différents sites pharmacologiques du canal sodium, topologiquement distincts, interagissent les uns avec les autres de façon allostérique : la fixation d'une toxine sur l'un des sites peut moduler de façon allostérique la fixation d'une autre toxine sur un autre site (Cestele *et al.*, 1996 ; Legros & Goyffon, 2010).

Qu'elles soient de type  $\alpha$  ou  $\beta$ , Possani *et al.* (1999) ont classé les toxines longues actives sur les canaux sodium en dix groupes :

- (i) toxines  $\alpha$  classiques des venins de scorpions de l'Ancien Monde, actives sur les mammifères (AaHII, AaHIII, AaHIII) ;
- (ii) toxines  $\beta$  classiques des venins de scorpions du Nouveau Monde, actives sur les mammifères ;
- (iii)  $\beta$ -toxines actives sur les mammifères et les insectes, comme les toxines CII et AaH1T1 (paralysie contracturante des insectes) et Lqh1T2 (paralysie flasque des insectes) ;
- (iv) toxines spécifiques d'insectes conduisant à une paralysie flasque ;
- (v) toxines faiblement actives sur les insectes, représentant un groupe intermédiaire. Les toxines de ce groupe ont une affinité modérée pour les canaux sodium d'insectes et de mammifères, plus marquée chez les mammifères ;
- (vi) toxines d'insectes de type  $\alpha$  de faible activité : en réalité elles sont peu spécifiques, car elles sont également toxiques pour les mammifères, et même presque aussi actives que les toxines du premier groupe. Elles déplacent même la toxine AaHIII, puissante  $\alpha$ -toxine des cellules de cerveau de rat ;
- (vii) toxines entrant en compétition avec des toxines contracturantes spécifiques d'insectes de type  $\alpha$

SCORPIONS: SÉQUENCES DE TOXINES K<sup>+</sup> ET Na<sup>+</sup>

**Fig. 1.** Séquence linéaire des toxines longues et des toxines courtes de venins de scorpion. On peut situer ainsi la position conservée des trois ponts disulfures centraux des toxines longues. On peut vérifier sur ce schéma que l'élimination du pont disulfure joignant les extrémités de la chaîne d'acides aminés des toxines longues laisse une molécule dont les trois autres ponts disulfures restent en position conservée, identique à celle des défensines de scorpions. CTX : charybdotoxine, toxine courte du venin de *Leiurus quinquestriatus* (famille des Buthidæ, espèce paléotropicale), utilisée comme modèle. Lq 1 : leurotoxine 1, toxine courte du venin de *Leiurus quinquestriatus*. Aah II : toxine longue de type  $\alpha$  du venin d'*Androctonus australis* (Buthidæ paléotropical), la plus toxique des toxines longues pour les mammifères. 3-Cs : toxine longue de type  $\beta$  du venin de *Centruroides suffusus* (Buthidæ néotropical).

- (AaH1T1) ou de type  $\beta$  (C<sub>ss</sub> II), et donc toxiques également pour les mammifères et les insectes ;
- (viii) toxines faiblement actives, paraissant être surtout de type  $\alpha$ , pratiquement atoxiques pour les mammifères ;
- (ix) toxines actives sur les insectes et les crustacés ;
- (x) toxines contracturantes spécifiques d'insectes.

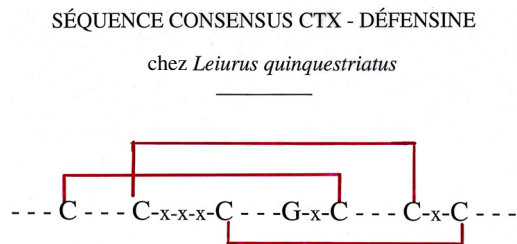
Dans cette classification largement adoptée, le caractère contracturant ou « flaccide » des toxines d'insectes apparaît aléatoire, tout au moins peu caractéristique d'un type de toxines,  $\alpha$  ou  $\beta$ . Plus intéressant consiste le classement des toxines longues en fonction de leur réactivité immunologique croisée avec des anticorps : Rochat *et al.* (1979) distinguent cinq types immunologiques, ce qui implique la présence dans un sérum antivenimeux d'au moins un anticorps spécifique de chacun de ces groupes antigéniques. Ces observations expérimentales introduisent une complication supplémentaire dans la préparation des sérums antivenimeux (SAV), puisque les toxines longues sont pour l'essentiel responsables de la symptomatologie chez l'Homme d'une envenimation par piqûre de scorpion, et qu'idéalement, un représentant de chaque type immunologique doit être présent dans les venins utilisés pour la préparation des SAV. D'autre part, Couraud & Van Rietschoten (1982) ont montré que la modification ou la rupture d'un pont disulfure entraîne une perte d'activité de la toxine, quel qu'en soit le type,  $\alpha$  ou  $\beta$  (figure 1).

## 1.2 Les toxines courtes

Elles ont été découvertes plus tard : la première de ces toxines, la noxiustoxine, extraite du venin du scorpion mexicain *Centruroides noxius* a été découverte par Possani *et al.* en 1982. Ces toxines courtes, nombreuses, agissent sur les canaux potassium ou sur les canaux chlore. Elles représentent environ 0,2 % du poids sec du venin. Elles comptent une séquence de 30 à 40 résidus d'acides aminés et trois ponts disulfures en position C1-C4, C2-C5 et C3-C6. Elles possèdent une séquence consensus commune avec les défensines d'arthropodes, marquée par une position conservée des ponts disulfure ainsi qu'une position conservée d'une glycine (figure 1). L'existence de cette similitude de structure a été notée par Kobayashi *et al.* (1991) et par Bontems *et al.* (1991) la même année, puis confirmées par Cociancich *et al.* (1993). Cette parenté structurale entre  $\beta$ -défensines et toxines a été notée aussi dans les venins d'ornithorynque. Zimmermann *et al.* (1995) notent que chez les vertébrés, le repliement des  $\beta$ -défensines est identique à celui des défensines d'insectes classiques (Bulet *et al.*, 2004), et marqué par l'existence d'un triple feuillet  $\beta$  antiparallèle, la position conservée de résidus glycine ou isoleucine, et un caractère amphiphilique, caractères communs à toutes les défensines. On distingue deux types de toxines courtes, les toxines actives sur les canaux potassium, et les chlorotoxines.

Les toxines actives sur les canaux calcium intracellulaires ryanodine-dépendants échappent en partie





**Fig. 2.** Schéma linéaire de la séquence consensus de toxines courtes de venins de scorpions et de leurs défensines circulantes, montrant la position conservée d'une glycine (G).

au schéma structural des toxines longues et des toxines courtes : elles restent encore mal connues (Du Plessis *et al.*, 2008).

### 1.2.1 Les toxines courtes actives sur les canaux potassium

Les canaux potassium sont ubiquistes : ils se rencontrent chez tous les êtres vivants même chez les plus simples (Jan & Jan, 1997). La première toxine de venin de scorpion active sur les canaux potassium, la noxiustoxine, a été isolée par Possani *et al.* (1982) à partir du venin du scorpion mexicain *Centruroides noxius*. Leur rôle essentiel étant de contrôler le potentiel de membrane cellulaire, les canaux potassium sont impliqués dans des fonctions variées, comme par exemple la libération d'un neurotransmetteur (Sitges *et al.*, 1986). Comme les toxines courtes de venins de scorpion bloquent aussi les canaux potassium des lymphocytes, leur impact sur la fonction immunitaire a été étudié, mais aucune réaction toxique n'a été notée. Plus généralement leur absence de toxicité chez l'Homme a été relevée. On pense qu'elles agissent en synergie avec les toxines longues. Toutefois, ces toxines ont un effet convulsivant chez la souris quand elles sont injectées par voie intra-cérébrale (Rochat *et al.*, 1979). On distingue deux grands groupes de récepteurs de ces toxines, les canaux voltage-dépendants et les canaux calcium-dépendants. Plusieurs dizaines de ces toxines étant connues, une classification rationnelle reposant sur les séquences d'acides-amino a été proposée (Tytgat *et al.*, 1999). L'ensemble de ces toxines se comportant en inhibiteurs de canaux potassium, on admet actuellement que cet effet inhibiteur est dû à une obturation mécanique du canal. Les toxines courtes sont présentes en faible quantité dans les venins de scorpion, toujours en quantité inférieure à 1 % du poids sec du venin, parfois limité à des quantités de l'ordre de 0,2 % (Choumet, 2010).

Il est possible de distinguer trois catégories principales de toxines bloquant les canaux potassium (Tytgat *et al.*, 1999; Legros & Goyffon, 2010) :

- les  $\alpha$ -KTx : leurs séquences comptent de trente à quarante résidus amino-acides et sont réticulées par

trois ou quatre ponts disulfures. Elles peuvent agir sur des canaux  $K_v$  ou  $K_{Ca}$ . Historiquement, elles ont été les premières à être découvertes dans les venins de scorpions (noxiustoxine, Possani *et al.*, 1982; Sitges *et al.*, 1986). La molécule de référence est la charybdotoxine (CTX), du venin du scorpion paléotropical *Leiurus quinquestriatus*, et cette molécule qui a pu être synthétisée est utilisée pour la classification de cette catégorie de toxines en sous-familles, en fonction du degré d'homologie de la séquence analysée avec celle de la charybdotoxine (Legros & Goyffon, 2010) (figure 2).

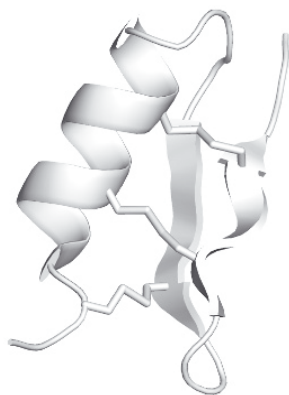
- les  $\beta$ -KTx : cette sous-famille, dont les chaînes réticulées par trois ponts disulfures comptent une soixantaine de résidus amino-acides, est peu nombreuse. Les toxines de cette sous-famille présentent une grande homologie de structure avec les défensines, en dépit de la longueur de leurs séquences.

- les  $\gamma$ -KTx : cette sous-famille peu nombreuse rassemble des peptides qui bloquent des canaux  $K^+$  potentiel-dépendants de type « eag » (*ether-a-go-go*).

### 1.2.2 Les toxines courtes actives sur les canaux chlore

Les canaux  $Cl^-$  constituent une vaste famille de canaux ioniques et les chlorotoxines du venin de scorpion sont potentiel-dépendantes (Rosso *et al.*, 2009). Leur rôle est important, en particulier dans la régulation du volume cellulaire. La première chlorotoxine du venin de *Leiurus quinquestriatus* a été découverte par DeBin & Stritchartz (1991), et suivie d'une étude de DeBin *et al.* (1993). Elle bloque les canaux  $Cl^-$  avec une bonne affinité de l'ordre du  $\mu M$ . Elles ont été utilisées comme marqueurs de tumeurs malignes du cerveau (gliomes), mais leur potentiel thérapeutique, un moment espéré avec une prise de brevet, se serait révélé négatif (Harvey, 2014).

Il convient tout d'abord de noter qu'il existe dans le venin des scorpions des molécules dont la structure est identique à celles des toxines (ou à celles des défensines circulantes) mais apparemment sans effet toxique, ni pour les mammifères ni pour les bactéries. Cette curiosité existe aussi bien dans les venins de Buthidés (*Androctonus australis*, *Tityus serrulatus*) que dans les venins de scorpions appartenant à d'autres familles (Scorpionidæ), qu'il s'agisse de toxines longues de venins de Buthidæ (toxines  $\beta$ , Blanc *et al.*, 1997) ou de toxines courtes. On ignore tout du rôle physiologique de ces molécules apparemment inactives découvertes à plusieurs reprises par différentes équipes de chercheurs (Blanc *et al.*, 1997; Buisine *et al.*, 1997; Moreira-Ferreira *et al.*, 1998; Olamendi-Portugal *et al.*, 1998; Goyffon & Landon, 1998). On remarquera qu'une de ces « non toxines » a permis de préparer des anticorps protecteurs efficaces contre des toxines actives (Blanc *et al.*, 1997; Moreira-Ferreira *et al.*, 1998).



**Fig. 3.** Structure tridimensionnelle d'une toxine courte de venin de scorpion (d'après Jouirou *et al.*, 2004).

Qu'elles soient longues ou courtes, l'ensemble des toxines de venins de scorpion comporte une hélice  $\alpha$  reliée aux feuillets  $\beta$  antiparallèles par trois ponts disulfures : c'est le motif  $CS\alpha\beta$  ou *Cysteine Stabilized alpha-beta*. Il faut encore remarquer que les toxines longues comme les toxines courtes possèdent ce motif  $CS\alpha\beta$ . Mieux même : si le pont disulfure d'une toxine longue est supprimé, on constate alors que le cœur de la toxine longue est constitué de l'équivalent d'une toxine courte à trois ponts disulfures en position conservée (figure 3), comme le signalent Du Plessis *et al.* (2008). L'homologie de structure des toxines de venins de scorpions et des défensines d'insectes fut rapidement constatée puis analysée (Bontems *et al.*, 1991 ; Kobayashi *et al.*, 1991 ; Landon, 1997 ; Goyffon & Landon, 1998). Pour autant, au-delà de l'analogie de structure, existerait-il des relations fonctionnelles ?

Certaines observations expérimentales permettaient déjà de le supposer. Rapidement en effet, on remarqua qu'un peptide antibactérien circulant du scorpion saharien *Androctonus australis*, l'androctonine, possédait une homologie de structure avec l' $\alpha$ -toxine SII de venin du cône *Conus striatus*. Cette toxine de cône possède une activité curarisante caractérisée par une haute affinité pour les récepteurs nicotinniques post-synaptiques à l'acétylcholine de *Torpedo* sp. Or la toxine SII du venin de cône et l'androctonine (un AMP), extraite de l'hémolymphes d'*A. australis*, possèdent la même affinité pour le récepteur nicotinnique, soit une  $IC_{50}$  de 8  $\mu$ M (Ehret-Sabatier *et al.*, 1996). On dispose donc d'une analogie fonctionnelle entre une neurotoxine courte présente chez un mollusque et un peptide antibactérien d'arthropode.

Ultérieurement, Zhu *et al.* (2012) conclurent que dans l'hypothèse où les défensines viendraient à être utilisées comme médicaments, il serait important de prendre en compte la neurotoxicité éventuelle de ces nouveaux médicaments, et d'en contrôler l'existence possible. Bien plus, peu de temps après ce commen-

taire, la même équipe (Zhu *et al.*, 2014) parvint à transformer une défensine en une toxine courte bloquant les canaux potassium et agissant exactement comme une toxine courte de venin de scorpion. Cette réalisation est d'autant plus étonnante qu'elle part d'une neurotoxine d'un hyménoptère parasitoïde, *Nasonia vitripennis*, et que la molécule dérivée obtenue possède toutes les caractéristiques fonctionnelles d'une toxine courte de venin de scorpion active sur les canaux potassium. Toutefois, la sélection de la défensine ne fut pas le fruit du hasard. Les auteurs avaient préalablement défini dans le choix possible et vaste qui s'offrait, ce qu'ils ont appelé une « signature de toxine de scorpion » ou STS (*Scorpion Toxin Signature*), c'est à dire une courte séquence d'acides aminés comportant une lysine et une asparagine séparées par deux autres acides aminés, du type Lys-Cys-X-Asn. Cette signature d'une toxine peut se trouver dans des défensines d'hémiptères ou d'hyménoptères : le choix se porta finalement sur la défensine d'un hyménoptère parasitoïde cosmopolite dont le génome est connu, et après prise en compte des résultats de Landon *et al.* (2008) : en effet, les défensines d'insectes possèdent une boucle importante pour l'activité antimicrobienne, mais cette boucle a été supprimée pour obtenir la toxine. La navitoxine ainsi obtenue a pu être synthétisée sous une forme réduite puis oxydée, avec reconstitution des trois ponts disulfures, et elle se comporte comme un bloqueur typique de canal potassium  $K_v$  : elle se lie au canal potassium de la même façon qu'une toxine courte de venin de scorpion. Ainsi un lien fonctionnel entre toxines de venin de scorpions et défensines est-il expérimentalement établi, sachant que les défensines constituent chez les êtres vivants la ligne principale de lutte contre une prolifération bactérienne.

D'autres questions se posent : existerait-il d'autres venins contenant des molécules structurellement analogues ou comparables, c'est-à-dire possédant de petits peptides toxiques ou neurotoxiques à trois ou quatre ponts disulfures et de structure analogue ou comparable à celle des défensines ? De tels venins existent, chez les araignées, ordre voisin des scorpions, mais aussi chez les cnidaires, en particulier dans les venins d'anémones de mer.

Dans les venins d'araignées on peut trouver, parmi d'autres exemples, la  $\delta$ -atracotoxine Ar1 du venin d'*Atrax robustus* ou encore la  $\delta$ -atracotoxine Hv1 d'*Hadronyche versutus* (Little *et al.*, 1998). Cependant, les quatre ponts disulfures de ces toxines qui comportent une chaîne de 42 résidus d'acides aminés constituent un « *Inhibitor Cysteine Knot* » ou ICK, légèrement différent du schéma  $CS\alpha\beta$  des toxines de venins de scorpion et des défensines d'arthropodes. Cependant, ces toxines de mygales se fixent aussi sur le site 3 du canal sodium, et ralentissent l'inactivation du potentiel d'action : elles se fixent donc sur un même

site du canal sodium pour produire les mêmes effets que les toxines  $\alpha$  des venins de scorpions. Par ailleurs, elles sont actives à la fois sur les canaux sodium de mammifères et sur ceux des insectes. Les venins de scorpions contiennent plutôt des toxines spécifiques, soit d'insectes soit de mammifères, mais leur structure est analogue.

Les anémones de mer (*Anemonia sulcata*) produisent de nombreuses toxines peptidiques ayant généralement une séquence d'une cinquantaine d'acides aminés réticulée par trois ponts disulfures. Elles agissent sur les canaux ioniques membranaires, sodium ou potassium, à la manière des toxines de venins de scorpions : les toxines « canaux sodium » de type  $\alpha$  ou  $\beta$  sont actives sur les canaux sodium de mammifères ou d'insectes. Selon Torres & Kuchel (2004) ou Whittington *et al.* (2009), les toxines d'anémones de mer auraient une structure et un repliement de  $\beta$ -défensine. Elles compteraient de 35 à 50 résidus d'acides aminés réticulés par trois ponts disulfure en position C1-C5, C2-C4 et C3-C6, les C représentant des cystéines. Ces toxines d'anémones de mer agiraient sur les canaux sodium à la façon des toxines longues de type  $\alpha$  de venins de scorpions buthidæ paléotropicaux. En conclusion, les toxines de cnidaires se fixent sur le site 3 des canaux sodium en inhibant l'inactivation du canal (Bosmans & Tytgat, 2007). En outre, un travail de Zimmermann *et al.* (1995) conclut que le repliement des  $\beta$ -défensines (de vertébrés) est identique à celui des défensines d'insectes classiques (bien qu'elles comportent un schéma de ponts disulfure un peu différent (en C1-C4, C2-C5, C3-C6). Le feuillet  $\beta$ , la position conservée de certains acides aminés comme la glycine ou l'isoleucine, le caractère amphiphilique de la molécule sont des caractères communs à toutes les défensines, de type  $\alpha$  (invertébrés) comme de type  $\beta$  (vertébrés). De toute façon, la toxine II d'*Anemonia sulcata* et la toxine longue II de type  $\alpha$  du buthidæ *Androctonus australis hector* interagissent compétitivement au niveau des sites 3 des canaux sodium de cellules de neuroblastomes (Rochat *et al.*, 1979). Ces deux toxines exercent le même effet inhibiteur sur l'inactivation du potentiel d'action de fibres myélinisées et non myélinisées. En revanche, la toxine II de type  $\beta$  du scorpion mexicain *Centruroides suffusus suffusus* n'interagit pas, comme prévu, avec la toxine II d'*Androctonus australis hector*, les deux toxines se fixant chacune sur un site différent du canal sodium (tableau 1). Pour Bosmans & Tytgat (2007), les toxines de cnidaires structurellement différentes se comportent comme des toxines potentiel-dépendantes au niveau du site 3 du canal sodium. En résumé, d'un point de vue fonctionnel, les toxines de venins de scorpions et les toxines d'anémones de mer, comme les toxines de venins d'araignées, ont un mode de

fonctionnement et une structure comparables. L'affinité des toxines d'anémones serait plus marquée pour les canaux sodium d'arthropodes que de mammifères, d'où les suggestions de Bosmans & Tytgat (2007), orientées sur les possibilités d'en tirer de nouvelles molécules insecticides, comme on a tenté de le faire à partir des venins d'araignées ou de scorpion.

Les venins des crotalidés américains, et notamment le venin du crotalinæ brésilien *Crotalus durissus terrificus*, contiennent de la crotamine. La crotamine est une myotoxine d'action relativement modérée, capable cependant de paralyser le train arrière d'une souris. Il s'agit d'une molécule peptidique de format modeste, constituée d'une courte chaîne de 42 acides aminés réticulée par trois ponts disulfures. Elle apparaît structurée comme une  $\beta$ -défensine de vertébré, soit un schéma de ponts disulfures : C1-C5, C2-C4, C3-C6. Rappelons que chez les scorpions, dans leurs toxines comme dans leurs défensines, le schéma des ponts disulfures est ainsi constitué : C1-C4, C2-C5, C3-C6. La crotamine interagit aussi avec les canaux sodium des cellules musculaires des muscles striés et possède en outre la capacité de s'internaliser dans différents types de cellules d'eucaryotes, même dans des cellules peu différenciées (Oguiura *et al.*, 2005). Pour Fry (2005), comme pour quelques autres auteurs (Kaser *et al.*, 2003), la famille des CRISP ou « *Cysteine Rich Secreted Protein* » figure au nombre des modèles de toxines de venin les plus anciens, au moins chez les serpents venimeux. Fry considère d'autre part que cette famille de molécules s'est diversifiée considérablement et que nombre de représentants de cette famille se trouvent dans tous les venins (Fry, 2005 ; Fry *et al.*, 2008).

Il n'est pas impossible que les venins de scorpions représentent, par la simplicité de leur composition, un archétype de venin primitif. Les scorpions figurent en effet au nombre des arthropodes les plus anciens. Ils sont connus depuis le Silurien, à tout le moins de l'époque du Dévonien. Considérés comme originellement marins, ils se transforment en espèces terrestres au Carbonifère, étage auquel ils sont actuellement considérés comme tous terrestres (Jeram, 1989). Toutefois, les cnidaires, restés essentiellement marins, sont beaucoup plus anciens, mais leurs venins restent encore insuffisamment connus.

La première constatation qui s'impose est celle de l'existence d'autres peptides neurotoxiques naturels dans d'autres venins que ceux des scorpions, non seulement dans des venins d'autres arthropodes mais aussi dans des venins de cnidaires et de vertébrés (ornithorynque, serpents). La structure et la position des ponts disulfures sont communes aux toxines et aux défensines, tant chez les invertébrés que chez les vertébrés.

Y aurait-il d'autre part un ou des venins dont les composants toxiques seraient en majorité, comme



chez les scorpions, structurellement identiques aux défensines, avec des ponts disulfures conservés? Ce venin existe, il est même le seul de son exemple, c'est le venin de l'ornithorynque. L'ornithorynque est un mammifère dont seul le mâle est venimeux. De plus, son appareil venimeux n'est fonctionnel que pendant la phase d'accouplement. Il est composé d'une sorte d'ergot situé à la partie haute de la face interne de la cuisse. Cet ergot, considéré comme dérivé d'un poil, est relié à une glande venimeuse abdominale dérivée d'une glande sudoripare (Whittington *et al.*, 2008; Whittington *et al.*, 2009; Whittington & Belov, 2014) qui migrerait vers son emplacement définitif au cours du développement. Les différentes toxines identifiées dans le venin d'*Ornithorhynchus anatinus* sont répertoriées sous la forme Ov (= *Ornithorhynchus venom*). Deux types principaux de toxines ont été identifiés, des peptides de 4 à 6 kDa, et des protéines de masse molaire supérieure à 12 kDa, ces dernières étant des enzymes pour l'essentiel. Les toxines identifiées comme des OvDLP (DLP, *Defensin-Like Peptide*) ont une structure similaire à celle des  $\beta$ -défensines, et sont de loin les plus abondantes dans le venin de l'ornithorynque, mais il existe en outre des OvCNP à schéma structural comparable à celui des peptides natriurétiques, ainsi qu'une toxine OvNGF, de structure comparable au NGF (*Nerve Growth Factor*) lequel se trouve en abondance dans les venins de certains serpents Élapidés. Les enzymes consistent en une protéase, une isomérase et une hyaluronidase. Au total, les toxines dérivées des  $\beta$ -défensines constituent les composants majeurs du venin d'ornithorynque (Whittington *et al.*, 2008). De plus, les gènes des toxines et les gènes des défensines sont groupés et voisins sur un même chromosome, et structurés de façon identique, à la manière de la crotamine et des peptides de structure analogue à la crotamine chez les serpents venimeux (*Crotamine-like Peptides*, Whittington *et al.*, 2008). Ces auteurs concluent donc à une évolution convergente des mêmes molécules dans les venins de serpents et de mammifères. Rappelons que cette convergence a été signalée d'abord par Dauplais *et al.* (1997) puis par Fry (2005), confirmée enfin par Kaplan *et al.* (2007), puis par Whittington *et al.*, (2008). Kaplan *et al.*, dès 2007, soulignent d'ailleurs déjà dans leur travail l'existence possible d'un lien évolutif entre les toxines de venins et les peptides antibactériens. Quant aux enzymes du venin d'ornithorynque, la hyaluronidase est considérée classiquement comme un facteur de diffusion des toxines. L'isomérase, toxique pour le rat et la souris, assurerait par sa fonction l'interconversion d'un amino-acide de forme L en forme D et réciproquement, mais tous les composants protéiques (19 fractions protéiques par électrophorèse) ne sont pas encore complètement identifiés (Whittington *et al.*, 2009). En

particulier, les molécules responsables de la vive douleur ressentie par les victimes humaines d'une envenimation restent encore inconnues. Aucune envenimation humaine consécutive à une envenimation due à un ornithorynque n'a été suivie d'un décès. Cependant, le venin de l'ornithorynque peut être fatal pour un chien. Les ornithorynques eux-mêmes semblent peu sensibles à leur propre venin, à en juger par les nombreuses traces de piqûres de mâles luttant pour leur dominance.

L'ensemble des résultats présentés par Whittington *et al.* (2008) ne s'accorde pas, selon ces auteurs, avec l'hypothèse de Dufton (1992). Celui-ci estimait qu'à leur origine, les premiers mammifères étaient probablement tous venimeux, ce qui pouvait leur conférer un avantage sélectif, au moins pour les espèces de mammifères prédateurs carnivores. Dufton soulignait que les mammifères venimeux actuels appartiennent tous à l'ordre des Insectivores, un ordre considéré comme primitif. Or les différents groupes d'animaux venimeux sont soit très anciens, comme les cnidaires, connus du Cambrien, soit constituent souvent les formes les plus anciennes des ordres ou des familles d'animaux venimeux apparus au cours de l'évolution, comme les scorpions et myriapodes par exemple, qui figurent au nombre des arthropodes les plus anciens. De même, les serpents les plus anciens sont les viperidæ, alors que les serpents non venimeux représentent des formes évoluées de serpents (Vidal & Hedges, 2002). Mais selon Whittington *et al.* (2008), il apparaît clairement qu'il existe une convergence dans les familles de molécules apparaissant dans les venins de l'ornithorynque et des serpents (à l'intérieur des vertébrés), indépendamment de l'origine diversifiée des glandes à venin, comme l'avaient déjà montré certains travaux antérieurs (Dauplais *et al.*, 1997; Fry, 2005). On peut simplement noter que ce phénomène de convergence n'est pas un véritable obstacle à l'hypothèse de Dufton, que la fonction venimeuse apparaît très ancienne et que dans certains groupes (serpents venimeux), elle tend à s'effacer au cours de l'évolution : la fonction venimeuse serait-elle régressive de façon générale, comme par exemple chez les serpents ?

Au reste Cao *et al.* (2013) qui ont analysé le génome du buthidæ *Buthus martensii* estiment qu'il est vraisemblable que les toxines longues ont divergé d'abord d'un ancêtre commun aux toxines courtes et aux défensines, lesquelles se sont ensuite diversifiées et ont formé des familles séparées. Les gènes des toxines partagent une structure similaire avec les gènes de défensines. Ainsi les études génomiques confirment que l'analogie des structures entre les toxines du venin de scorpion et les défensines circulantes (un même schéma  $CS\alpha\beta$ ) découle de l'existence d'un ancêtre commun. Il apparaît ainsi qu'il est

difficile de différencier nettement les fonctions venimeuse et immunitaire innée, dès lors que les molécules de l'immunité et les toxines des venins partagent un ancêtre commun. Le paragraphe suivant, partant des venins de serpents et des inhibiteurs d'enzymes neurotoxiques (PLI) aboutira à une conclusion identique.

## 2 Les venins de serpents : PLA<sub>2</sub> et inhibiteurs de PLA<sub>2</sub> (PLI)

Depuis les premières observations de F. Fontana (1730–1805) qui avait constaté que les vipères résistent à leur propre venin, on a remarqué que les serpents venimeux et plus généralement les animaux venimeux résistent habituellement à leur venin (Ménez, 2003). Deux mécanismes non exclusifs peuvent expliquer cette résistance :

- soit les récepteurs du serpent ont une configuration différente de celles de leurs proies sensibles au venin. Cette modification d'un récepteur de la toxine, en général discrète et limitée, peut alors soulever divers problèmes théoriques de co-évolution proies-prédateurs (Ohana *et al.*, 1991; Ménez, 2003),
- soit les serpents possèdent dans leur sang des antagonistes circulants (inhibiteurs naturels) neutralisant les toxines les plus puissantes de leurs venins au nombre desquelles figurent les PLA<sub>2</sub> neurotoxiques (Faure, 1999). Ainsi ces inhibiteurs naturels protègent les serpents de « fuites » de leurs propres venins dans le système circulatoire (Kinkawa *et al.*, 2010). Ajoutons encore que cette équipe a montré que l'expression des PLI dans le foie du serpent *Gloydius brevicaudus* est augmentée par l'injection du venin de ce serpent ou celle de la PLA<sub>2</sub> extraite de ce venin.

Les PLA<sub>2</sub> EC 3.1.1.4. sont des enzymes qui, en présence de calcium, catalysent l'hydrolyse de la liaison acylester en position *sn*-2 des L-*sn*-3 glycérophospholipides, libérant un acide gras et un lysophospholipide. Les PLA<sub>2</sub> peuvent aussi se comporter en ligand et interagir avec de très nombreuses cibles protéiques (Kini et Evans, 1989; Faure *et al.*, 2010). En formant des complexes très spécifiques et de haute affinité, les PLA<sub>2</sub> exercent d'autres activités physiologiques et physiopathologiques et ces diverses fonctions peuvent être dépendantes ou indépendantes de l'activité enzymatique (Faure *et al.*, 2007; Rigoni *et al.*, 2008; Faure & Goyffon, 2010; Srihar et Krizaj, 2011). Les PLA<sub>2</sub> de serpents ont été classées en deux groupes structuraux I et II (Heinriksone *et al.*, 1977). Les PLA<sub>2</sub> neurotoxiques ( $\beta$ -neurotoxines) sont regroupées en trois classes : classe I – toxines monocaténaïres (comme l'ammodytoxine A); classe II – multicaténaïres, pouvant compter deux (crotoxine, vipoxine), trois (taipoxine) ou cinq (textilotoxine) sous-unités PLA<sub>2</sub>; et classe III –  $\beta$ -bungarotoxines (deux

sous-unités différentes reliées par un pont disulfure). Une PLA<sub>2</sub> monomérique,  $\beta$  neurotoxine de classe I comporte une chaîne de 120 à 130 amino-acides pour une masse molaire de 13 à 15 kDa, réticulée par 7 ponts disulfures. Six de ces ponts sont en position conservée commune aux groupes structuraux de PLA<sub>2</sub> I et II. Le septième pont permet de différencier les groupes I et II. Les PLA<sub>2</sub> des viperidæ appartiennent aux sPLA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub> sécrétées) et font partie du groupe IIA : elles sont structurellement homologues des PLA<sub>2</sub> inflammatoires et non pancréatiques des mammifères (figure 4). Les PLA<sub>2</sub> des elapidæ et des mammifères appartiennent aux sPLA<sub>2</sub> du groupe IB et sont homologues des PLA<sub>2</sub> pancréatiques des mammifères. Dans la classe II des toxines multimériques, au moins une sous-unité est active catalytiquement. Ces PLA<sub>2</sub> multimériques qui forment des complexes non covalents sont des  $\beta$ -neurotoxines très puissantes avec un mécanisme d'action sophistiqué (par rapport aux PLA<sub>2</sub> monomériques). Dans le cas de la crotoxine, la sous-unité acide composée de trois chaînes polypeptidiques augmente la toxicité de la sous-unité basique en stabilisant le complexe, mais inhibe partiellement son activité enzymatique (Faure & Saul, 2011). Dans le cas de la  $\beta$ -bungarotoxine (classe III des  $\beta$ -neurotoxines) du serpent venimeux *Bungarus multicinctus*, la sous-unité de type PLA<sub>2</sub> forme un pont disulfure avec une seconde sous-unité de type inhibiteur trypsique. L'activité enzymatique des PLA<sub>2</sub> est dépendante du calcium. Le centre actif très conservé est composé de deux domaines : la boucle de liaison du calcium contenant le motif consensus X-C-G-X-G-G d'une part, et le domaine catalytique d'autre part contenant la diade His48/Asp49 dans une séquence D-X-C-C-X-X-H-D. Certaines PLA<sub>2</sub> de venins de serpents ont une mutation Asp/Lys au niveau de la diade catalytique et sont alors enzymatiquement inactives (Faure, 1999; Faure & Goyffon, 2010). Les sPLA<sub>2</sub> se lient tout d'abord à une interface lipidique constituée d'une grande diversité de phospholipides (étape de liaison interfaciale) puis lient et hydrolysent le substrat dans leur centre actif (Faure *et al.*, 2012a et b).

Un grand nombre de PLA<sub>2</sub> des venins de serpents a été isolé et séquencé (plus de 200 molécules). Leur structure tridimensionnelle est riche en hélices  $\alpha$  et possède 10 % de feuillets  $\beta$  antiparallèles (figure 4).

Les PLA<sub>2</sub> des venins sont habituellement neurotoxiques et myotoxiques, mais elles peuvent aussi perturber la coagulation, notamment à son stade initial, celui de la formation du « clou plaquettaire » (Faure *et al.*, 2007). Certaines sPLA<sub>2</sub>, en interagissant avec le facteur Xa de la coagulation sanguine, inhibent efficacement le complexe prothrombinase. Le site anticoagulant de ces PLA<sub>2</sub> a été identifié et caractérisé (Faure & Saul, 2011). D'autre part, par un blocage présynaptique de la libération de neuromédiateurs, les



**Fig. 4.** Structure tridimensionnelle d'une phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxique, l'ammodytoxine du venin de *Vipera ammodytes ammodytes* (d'après Saul *et al.*, 2010).

PLA<sub>2</sub> des venins de viperidæ peuvent entraîner une paralysie flasque mortelle par asphyxie, consécutive à la paralysie du diaphragme. Des études récentes ont montré que certaines PLA<sub>2</sub> de viperidæ peuvent avoir des effets bénéfiques chez l'Homme : effets antimalarique, anticancéreux, antimucoviscidose (Faure *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Au total, les PLA<sub>2</sub> constituent une famille d'enzymes multifonctionnelles. La compréhension de leur mécanisme d'action à l'échelle moléculaire et cellulaire ainsi que l'identification de leurs diverses cibles protéiques et de leurs divers sites fonctionnels présentent un défi majeur en biochimie et en physiologie (Faure & Saul, 2012).

Les inhibiteurs naturels de PLA<sub>2</sub>, isolés à partir du sang des serpents, et purifiés pour la première fois par Kihara en 1976, sont habituellement désignés sous le sigle PLI (*Phospholipases Inhibitors*). Beaucoup de serpents venimeux, et parfois non venimeux, disposent d'un PLI circulant. Ces PLI, qui ne sont pas des anticorps, neutralisent les PLA<sub>2</sub> neurotoxiques de leur propre venin et assurent ainsi une protection du serpent venimeux. Ils ont été classés en trois catégories, les PLI  $\alpha$ , les PLI  $\beta$  et les PLI  $\gamma$  (Faure, 2000) sachant qu'une espèce de serpent venimeux, mais aussi des serpents non venimeux, peuvent héberger plusieurs types de PLI (Domont *et al.*, 1991; Okhura *et al.*, 1997; Faure & Goyffon, 2010).

#### Classification des PLI :

1) **Les PLI  $\alpha$**  (avec domaines CRD) : les PLI de ce type ont été trouvés dans le sang de plusieurs crotalinæ des genres *Protobothrops* sp., *Gloydius* sp., *Bothrops* sp., *Atropoides nummifer* mais aussi dans le sang du serpent non venimeux *Elaphe quadrivirgata* (Okumura *et al.*, 2003). Cette classe de

PLI est constituée de glycoprotéines oligomériques de 50 à 180 kDa comptant de 3 à 6 sous-unités de 18 à 25 kDa, identiques ou différentes, glycosylées ou non et liées de façon non-covalente. Les PLI  $\alpha$  présentent une région ayant une similitude significative avec les domaines CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*) de reconnaissance des sucres des lectines C dépendant du Ca<sup>++</sup>. Cette région peut couvrir jusqu'à 67 % de la séquence des sous-unités, et constitue la région la mieux conservée au sein des PLI de cette classe.

La protéine la plus proche structurellement de ces PLI- $\alpha$  est la protéine SP-A du surfactant pulmonaire humain (Okhura *et al.*, 1994). La protéine SP-A se lie avec une haute affinité et inhibe en outre l'activité de la PLA<sub>2</sub> du venin du crotalinæ *Trimeresurus flavoviridis*. La SP-A est une lectine de type C ayant un domaine CRD en position N-terminale, domaine qui est impliqué dans la protection de l'hôte. Elle inhibe aussi l'activité de la sPLA<sub>2</sub> murine (groupe II A) *in vitro* et *in vivo* et constitue donc un inhibiteur endogène de la sPLA<sub>2</sub> murine du groupe II A. Elle inhiberait la réaction inflammatoire d'une infection pulmonaire et pourrait avoir un rôle protecteur dans le maintien de l'intégrité du surfactant pulmonaire au cours du SDRA (Syndrome de Détresse Respiratoire Aigu) infectieux. Sur la base de la structure tridimensionnelle du SP-A de rat, Okumura *et al.* (2005) ont proposé un modèle structural du PLI  $\alpha$  de *Gloydius brevicaudis*. Ces auteurs en concluent que la région 13–36 de la séquence en amino-acides du SP-A, distincte du domaine CRD, serait importante pour l'activité inhibitrice du PLI- $\alpha$ , et pourtant la capacité d'interaction du motif CRD avec les PLA<sub>2</sub> est bien établie. Enfin, le récepteur M (musculaire) des PLA<sub>2</sub>, exprimé et cloné chez le lapin, est composé de huit domaines CRD, CRD5 étant impliqué dans la liaison des PLA<sub>2</sub> (Nicolas *et al.*, 1995) : la liaison des PLA<sub>2</sub> aux récepteurs M inhibe effectivement l'activité enzymatique.

L'existence d'une homologie entre les récepteurs tissulaires des PLA<sub>2</sub> et les PLI- $\alpha$  implique que l'identification de nouveaux PLI peut aussi conduire à la découverte de nouveaux récepteurs de PLA<sub>2</sub>, et ainsi apporter une contribution supplémentaire à la compréhension des effets physiopathologiques propres à ces enzymes. Au reste, l'existence d'un récepteur soluble de PLA<sub>2</sub> produit par le clivage d'un récepteur membranaire sous l'effet de métalloprotéases a été démontrée (Higashino *et al.*, 2002).

2) **Les PLI- $\beta$**  (avec domaines riches en leucine LRR, *Leucine-Rich Repeat*) sont des trimères de masse molaire d'environ 150 kDa. Ils possèdent en outre une homologie de structure avec l' $\alpha_2$ -globuline sérique humaine (LRG), une glycoprotéine qui contient également le motif LRR. La caractéristique principale des PLI- $\beta$  est la présence de neuf motifs

répétés LRR riches en leucine au sein de la séquence de chaque sous-unité de 50 kDa, comptant en outre 4 sites de N-glycosylation par sous-unité (Ohkura *et al.*, 1997). Chaque motif est composé de 24 amino-acides et la répétition du motif LRR représente 67 % de la séquence de chaque sous-unité. Ce type  $\beta$  d'inhibiteur a été décrit dans le plasma de *Gloydius brevicaudus* (*Agkistrodon blomhoffii siniticus*) mais aussi dans le plasma d'*Elaphe quadrivirgata* qui n'est pas venimeux. Il est sélectif pour les PLA<sub>2</sub> basiques du groupe II. Le motif LRR a été aussi identifié dans les récepteurs TLR (Bell *et al.*, 2003). Divers travaux ont montré que les PLI- $\beta$  contiennent un domaine riche en proline en position N-terminale qui pourrait également participer à la liaison des sPLA<sub>2</sub>. La protéine (LRG) humaine interagit avec le cytochrome C et le PLI- $\beta$  lie également le Cyt C (Shirai *et al.*, 2010) avec une affinité plus forte que son affinité pour la PLA<sub>2</sub> basique (KD =  $2,3 \times 10^{-12}$  M pour Cyt C et  $1,2 \times 10^{-9}$  M pour la PLA<sub>2</sub>). Ainsi le Cyt C est un ligand endogène de LRG et PLI- $\beta$ . Un rôle possible a été proposé par Shirai *et al.* (2010) : LRG et PLI- $\beta$  pourraient neutraliser le Cyt C qui est libéré de cellules mortes.

**3) Les PLI- $\gamma$**  (avec domaine de structure à 3 doigts, et trois feuilletts  $\beta$ ) constituent le groupe le plus abondamment représenté. Ils ont été identifiés dans le sérum de nombreux serpents, parfois de serpents non venimeux :

- Elapidæ : *Notechis* sp., *Oxyuranus* sp., *Pseudonaja* sp. (Australie); *Naja naja kaouthia* (Inde).
- Hydrophiidæ : *Laticauda* sp.
- Viperidæ : *Gloydius brevicaudus*; *Trimeresurus* sp.; *Crotalus* sp.; *Vipera* sp.
- Non venimeux : *Boidæ*; *Colubridæ*.

Les PLI- $\gamma$  sont des oligomères de masse molaire comprise entre 90 et 140 kDa composés de l'association non covalente de plusieurs sous-unités de 20 à 30 kDa parfois glycosylées. Deux sous-classes peuvent être distinguées, les PLI- $\gamma$ I et les PLI- $\gamma$ II. Les PLI- $\gamma$ I appartiennent principalement aux familles des Elapidæ, des Hydrophiidæ, des Colubridæ *sensu lato* : il s'agit d'hétérotrimères capables d'inhiber l'activité enzymatique des PLA<sub>2</sub> des groupes I, II, III. La sous-classe II des PLI- $\gamma$  de *Crotalus durissus terrificus*, *Trimeresurus flavoviridis*, *Python reticulatus* (espèce non venimeuse) semble être plus sélective.

On a trouvé dans le plasma du sang de crotale *Crotalus durissus terrificus* un inhibiteur naturel de la crotoxine, le CICS ou « *Crotoxine Inhibitor from Crotalus Serum* », encore appelé CNF (*Crotalus Neutralizing Factor*), qui a été identifié de façon indépendante par deux équipes (Fortes-Dias *et al.*, 1994; Perales *et al.*, 1995). Le CICS neutralise la toxicité de la phospholipase A<sub>2</sub> de la crotoxine et inhibe son activité enzymatique. Or la crotoxine est la neurotoxine

hétérodimérique principale du venin de ce serpent venimeux. Le CICS dissocie en fait l'hétérodimère de la crotoxine et se lie à sa sous-unité basique (CB) sans interaction avec la sous-unité acide (CA). Il s'agit là d'un processus particulier puisque la neutralisation de la crotoxine implique la dissociation du complexe hétérodimérique de la molécule. Ce mécanisme d'action du CICS s'apparente au processus de fixation de la crotoxine sur son récepteur membranaire présynaptique qui implique également la dissociation de la crotoxine. On observe une véritable homologie fonctionnelle entre deux mécanismes, celui de la fixation sur le récepteur et celui de l'action du CICS. De là est née l'hypothèse que le CICS pourrait être la forme soluble d'un récepteur dont la fonction principale serait de bloquer la crotoxine dans le système vasculaire et de l'empêcher d'agir sur le récepteur membranaire (Faure *et al.* 2000; Faure & Goyffon, 2010). Le récepteur présynaptique de la crotoxine a été isolé, purifié et caractérisé à partir des membranes présynaptiques de la torpille *Torpedo* sp, mais sa structure primaire n'a pas été déterminée (Faure *et al.*, 2003) : aurait-il aussi une homologie structurale avec les PLI- $\gamma$  ?

En effet, le CICS peut neutraliser *in vitro* et *in vivo* l'effet toxique d'autres PLA<sub>2</sub> de venins de serpents appartenant notamment à la famille des viperinæ (Ohkura *et al.*, 1994; Faure *et al.*, 2000). Le test *in vivo* consiste à évaluer la perte de l'effet léthal de la toxine (ou du venin) en présence du CICS, et le test *in vitro* à analyser la formation d'éventuels complexes entre différentes  $\beta$ -neurotoxines, la crotoxine et l'inhibiteur par résonance plasmonique de surface.

Les PLI- $\gamma$  possèdent une nette similitude structurale dans l'organisation des cystéines avec plusieurs protéines de mammifères comme l'u-PAR (urokinase-récepteur de l'activation du plasminogène) et la famille des protéines Ly-6 phylogénétiquement et structurellement proches d'une superfamille de neurotoxines et cytotoxines présentes dans les venins de serpents, les xénoxines. Les structures de la protéine CD59 et des protéines de la famille Ly-6 sont proches également de celle de l' $\alpha$ -bungarotoxine, elle-même protéine à « 3 doigts » (Fleming *et al.*, 1993; Noël *et al.*, 1998).

Face à cette diversité de structure des PLI, la question s'est posée de savoir si d'autres inhibiteurs analogues au CICS sont présents dans le sang des serpents venimeux. Des analyses par résonance plasmonique de surface (RPS) ont effectivement conduit à la détection puis à l'identification d'un PLI- $\gamma$  dans le sérum de *Vipera ammodytes ammodytes* (Sribar *et al.*, 2007).

En résumé, l'étude des PLI a montré que chacune des catégories de PLI, PLI- $\alpha$ , PLI- $\beta$ , PLI- $\gamma$  assure une fonction de protection interne du serpent venimeux, qui se rattache donc bien à une fonction immunitaire.



De plus, les PLI présentent des affinités de structure avec des récepteurs TLR, ou des protéines appartenant à la fonction immunitaire innée telles que les lectines, ou encore se rattachent à des structures de protection de l'organisme (Domont *et al.*, 1991; Faure & Goyffon, 2010) : serait-ce que, chez les serpents, les PLI s'intégreraient dans les protéines du complément ? Au total, les PLI assurent en effet un rôle autoprotecteur vis-à-vis des toxines synthétisées par le serpent venimeux, sans qu'ils soient structurés comme des anticorps. Les serpents ont développé un système d'autoprotection contre leur propre venin où les composants du venin autorégulent l'expression de protéines anti-venins produites par leur foie, et qui ne sont pas des anticorps, mais dont les structures se rapportent à celles de protéines de l'immunité innée, de la même manière que défensines et toxines semblent bien avoir une origine phylogénétique commune (Cao *et al.*, 2013). De plus, la forte homologie structurale de la SP-A avec la protéine CD59 et les TLR suggère que les PLI pourraient jouer non seulement un rôle de détoxification, mais encore un rôle de protection des serpents contre des pathogènes microbiens. Perales & Domont dès 2002 n'hésitent pas à affirmer que les PLI et les protéines voisines se rattachent au système immunitaire inné : nous les rejoignons donc, non sans ajouter qu'étudier la fonction venimeuse c'est clairement aussi étudier la fonction immunitaire innée.

## Références

- Bell, J.K., Mullen, G.E., Leifer, C.A., Mazzoni, A., Davies, D.R., and Segal, D.M. (2003). Leucine rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol*, 24, 528-533.
- Bert, P. (1865). Contribution à l'étude des venins (venins de scorpion). *CR Soc Biol*, 17, 136-137.
- Bert, P. (1885). Venin du scorpion. *CR Soc Biol*, 27, 574-575.
- Blanc, E., Hassani, O., Meunier, S., Mansuelle, P., Sampieri, F., Rochat, H., and Darbon, H. (1997). <sup>1</sup>H-NMR-derived secondary structure and overall fold of a natural anatoxin from the venom from the scorpion, *Androctonus australis hector*. *Eur J Biochem*, 247, 1118-1126.
- Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Ménez, A., and Toma, F. (1991). Refined structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. *Science*, 254, 1521-1523.
- Bosmans, F., and Tytgat, J. (2007). Sea anemone venom as a source of insecticidal peptides acting on voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Toxicon*, 49, 550-560.
- Buisine, E., Wieruszkeski, J.M., Lippens, G., Wouters, D., Tartar, A., and Sautière, P. (1997). Characterization of a new family of toxin-like peptides from the venom of *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. <sup>1</sup>H-NMR structure of leiuropeptide II. *J Peptide Res*, 49, 515-555.
- Bulet, P., Stöcklin, R., and Menin, L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*, 198, 169-184.
- Cao, Z., Yu, Y., Wu, Y., Hao, P., Di, Z., He, Y., Chen, Z., Yang, W., Shen, Z., He, X., Sheng, J., Xu, X., Pan, B., Feng, J., Yang, X., Hong, W., Zhao, W., Li, Z., Huang, K., Li, T., Kong, Y., Liu, H., Jiang, D., Zhang, B., Hu, J., Hu, Y., Wang, B., Dai, J., Yuan, B., Feng, Y., Huang, W., Xing, X., Zhao, G., Li, X., Li, Y., and Li, W. (2013). The genome of *Mesobuthus martensii* reveals a unique adaptation model of arthropods. *Nat Commun*, 4, 2602-2612.
- Cestele, S., Sampieri, F., Rochat, H., and Gordon, D. (1996). Tetrodotoxin reverses brevetoxin allosteric inhibition of scorpion alpha-toxin binding on rat brain sodium channels. *J Biol Chem*, 270, 15153-15161.
- Choumet, V. (2010). Scorpionisme: épidémiologie et immunothérapie. In: *Aspects cliniques et thérapeutiques des envenimations graves*, Mion, G., Larréché, S., Goyffon, M. (Eds.), pp. 178-191.
- Clot-Faybesse, O., Guieu, R., Rochat, H., and Devaux, C. (2000). Toxicity during early development of the mouse nervous system of a scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *Life Sci.*, 66, 185-192.
- Cociancich, S., Goyffon, M., Bontems, F., Bulet, P., Bouet, F., Menez, A., and Hoffmann, J. (1993). Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4 kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. *Biochem Biophys Res Commun*, 194, 17-22.
- Couraud, F., and Van Rietschoten, J. (1982). Les toxines de scorpions: un exemple d'utilisation des sécrétions venimeuses. *Biochimie*, 64, V-VIII.
- Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., Roumestand, C., Vita, C., de Medeiros, C.L., Rowan, E.G., Harvey, A.L., and Ménez, A. (1997). On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structure. *J Biol Chem*, 272, 4302-4309.
- DeBin, J.A., and Strichartz, G.R. (1991). Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon*, 11, 1403-1408.
- DeBin, J.A., Maggio, J.E., and Strichartz, G.R., (1993). Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Amer J Physiol*, 264, C361-C369.
- Domont, G.B., Perales, J., and Moussatché, H. (1991). Natural anti-snake venom proteins. *Toxicon*, 29, 1183-1194.
- Dufton, M. (1992). Venomous mammals. *Pharmacol Ther.*, 53, 199-215.
- Du Plessis, L.H., Elgar, D., and Du Plessis, J.L. (2008). Southern African toxins: an overview. *Toxicon*, 51, 1-9.
- Ehret-Sabatier, L., Löew, D., Goyffon, M., Fehlbaum, P., Hoffmann, J.A., van Dorsselaer, A., and Bulet, P. (1996). Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J Biol Chem*, 271, 29537-29544.

- Eitan, M., Fowler, E., Herrmann, R., Duval, A., Pelhate, M., and Zlotkin, E. (1990). A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affects sodium current inactivation: purification, primary structure, and mode of action. *Biochemistry*, 29, 5941-5947.
- Faure, G. (1999). Les phospholipases A<sub>2</sub> des venins de serpents. *Bull Soc Zool Fr*, 124, 149-168.
- Faure, G. (2000). Natural inhibitors of toxic phospholipases A<sub>2</sub>. *Biochimie*, 82, 833-840.
- Faure, G., Villela, C., Perales, J., and Bon, C. (2000). Interaction of the neurotoxic and non-toxic secretory phospholipases A<sub>2</sub> with the crotoxin inhibitor from *Crotalus* serum. *Eur J Biochem*, 267, 4799-4808.
- Faure, G., Copic, A., Le Porrier, S., Gubensek, F., Bon, C., and Krizaj, I. (2003). Crotoxin acceptor protein isolated from *Torpedo* electric organ: binding properties to crotoxin by surface plasmon resonance. *Toxicon*, 41, 509-517.
- Faure, G., Gowda, V.T., and Maroun, R.C. (2007). Characterization of a human coagulation factor Xa-binding site on Viperidæ snake venom phospholipases A<sub>2</sub> by affinity binding site studies and bioinformatics. *BMC Structural Biol*, 7, 82.
- Faure, G., and Goyffon, M. (2010). Inhibiteurs naturels de phospholipases A<sub>2</sub> (PLI) du sang de serpent. Homologie structurale avec des protéines de la réponse immunitaire. In: *Aspects cliniques des envenimations graves*, Mion, G., Larréché, S., Goyffon, M. (Eds.), pp. 22-33.
- Faure, G., Xu, H., and Saul, F. (2010). Anticoagulant phospholipases A<sub>2</sub> which bind to the specific soluble receptor coagulation factor Xa. In: *Toxins and hemostasis: from bench to bedside*, Kini, R.M., Clemetson, K., Markland, F.S., Mc Lane, M.A., Morita, T. (Eds.), Chap 13, Springer Science and Business Media, pp. 201-217.
- Faure, G., and Saul, F. (2011). Structural and functional characterization of anticoagulant FXa-binding Viperidæ snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. *Acta Chim Slov*, 58, 671-677.
- Faure, G., Bakouh, N., Saul, F., Xu, H., Planelles, G., Ollero, M., and Edelman, A. (2012). CFTR as a new target for crotoxin: potential application for cystic fibrosis. *Toxicon*, 60, 105-106.
- Faure, G., and Saul, F. (2012). Crystallographic characterization of functional sites of crotoxin and ammodytoxin, potent  $\beta$ -neurotoxins from Viperidæ venoms. *Toxicon*, 60, 531-538.
- Fleming, T.J., O'Uigin, C., and Malek, T.R. (1993). Characterization of two novel Ly-6 genes. Protein sequence and potential similarity to alpha-bungarotoxin and other neurotoxins. *J Immunol*, 150, 5379-5390.
- Fortes-Dias, C.L., Lin, Y., Ewell, J., Diniz, C.R., and Liu, T.Y. (1994). A phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *J Biol Chem*, 269, 15646-15651.
- Fry, B.G. (2005). From genome to "venome": molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res*, 15, 403-420.
- Fry B.G., Scheib, H., van der Weerd, L., Young, B., McNaughtan, J., Ramjan, S.F., Vidal, N., Poelmann, R.E., and Norman, J.A. (2008). Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Cænophidia). *Mol Cell Proteomics*, 7, 215-246.
- Goyffon, M. (1983). Panchronisme et résistance aux agressions de l'environnement chez le scorpion. *Bull Soc Zool Fr*, 108, 585-592.
- Goyffon, M., and Billiard, P. (2002). Apport de l'immunochimie structurale et immunochimie de l'hémocyanine à la systématique des Buthidæ (Scorpions). *Mém Soc Entomol Fr*, 6, 65-72.
- Goyffon, M., and Landon, C. (1998). Toxines et défensines de scorpions. Scorpion toxins and defensins. *CR Soc Biol*, 192, 445-462.
- Goyffon, M., and Roman, V. (2001). Radioresistance of scorpions. In: *Scorpion Biology and Research*, Brownell, P., Polis, G. (Eds.), Vol. 1, Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 393-405.
- Goyffon, M., and Tournier, J.N. (2014). Scorpions: a presentation. *Toxins*, 6, 2137-2148.
- Harvey, A. (2014). Toxins and drug discovery. *Toxicon*, 92, 193-200.
- Heinrikson, R.L., Krueger, E.T., Keim, P.S. (1977). Amino-acid sequence of phospholipase A<sub>2</sub> -alpha from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipases A<sub>2</sub> based upon structural determinants. *J Biol Chem*, 252, 4913-4921.
- Higashino, K., Yokota, Y., Ono, T., Kamitani, S., Arita, H., and Hanasaki, K. (2002). Identification of a soluble form phospholipase A<sub>2</sub> receptor as a circulating endogenous inhibitor for secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *J Biol Chem*, 277, 13583-13588.
- Inceoglu, B., Lango, J., Jing, J., Chen, L., Doymaz, F., Pessah, I.N., and Hammock, B.D. (2003). One scorpion, two venoms: pre venom of *Parabuthus transvaalicus* acts as an alternative type of venom with distinct mechanism of action. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 922-927.
- Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1997). Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Ann Rev Neurosci*, 20, 91-123.
- Jeram, A.J.J. (1989). The micropalæontology of paleozoic scorpions. PhD, Univ. Manchester, 1 vol., 398 p.
- Kaplan, N., Morpurgo, N., and Linial, M. (2007). Novel families of toxin-like peptides in insects and mammals: a computational approach. *J Mol Biol*, 369, 553-566.
- Kaser, H., Winklmayr, M., Lepperdinger, G., and Kreil, G. (2003). The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep*, 4, 469-473.
- Kihara, H. (1976). Studies on phospholipase A in *Trimeresurus flavoviridis* venom. III Purification and some properties of phospholipase A inhibitor in Habu serum. *J Biochem*, 80, 341-349.
- Kini, R.M., and Evans, H.J. (1989). A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon*, 27, 613-635.

- Kinkawa, K., Shirai, R., Watanabe, S., Toriba, M., Hayashi, K., Ikeda, K., and Inoue, S. (2010). Up-regulation of the expressions of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors in the liver of a venomous snake by its own venom phospholipase A<sub>2</sub>. *Bioch Biophys Res Commun*, 395, 377-381.
- Kobayashi, Y., Takashima, H., Tamaoki, H., Kyogoku, Y., Lambert, P., Kuroda, H., Chino, N., Watanabe, T.X., Kimura, T., Sakakibara, S., and Luis, M. (1991). The cystine-stabilized  $\alpha$ -helix: a common structural motif of ion-channel blocking neurotoxic peptides. *Biopolymers*, 31, 1213-1220.
- Kopeyan, C., Mansuelle, P., Martin-Eauclaire, M.F., Rochat, H., and Miranda, F. (1993). Characterization of toxin III of the scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*: a new type of alpha toxin highly toxic both to mammals and insects. *Nat Toxins*, 1, 308-312.
- Landon, C. (1997). Détermination de la structure tridimensionnelle d'une toxine de scorpion et d'une protéine de défense d'insectes par résonance magnétique nucléaire et modélisation moléculaire. Ph.D., Univ. Orléans, Vol. 1, 314 p.
- Landon, C., Barbault, F., Legrain, M., Guennegues, M., and Vovelle, F. (2008). Rational design of peptides active against the Gram positive bacteria *Staphylococcus aureus*. *Proteins*, 72, 229-239.
- Legros, C., and Goyffon, M. (2010). Aspects moléculaires des interactions entre les toxines de venin de scorpions et les canaux ioniques. In: *Aspects cliniques et thérapeutiques des envenimations graves* (G. Mion, S. Larréché, M. Goyffon, Eds.), Urgence Pratique, Ganges (France), pp. 3-21.
- Leulier, F., and Lemaître, B. (2002). Les récepteurs de la famille Toll et l'activation de la réponse immunitaire. *Bull. AAEIP*, 171, 79-84.
- Little, M.J., Wilson, H., Zappia, C., Cestèle, S., Tyler, M.I., Martin-Eauclaire, M.F., Gordon, D., and Nicholson, G.M. (1998)  $\alpha$ -Atracotoxins from Australian funnel-web spiders compete with scorpion  $\alpha$ -toxin binding on both rat brain and insect sodium channels. *FEBS Lett*, 439, 246-252.
- Ménez, A. (2003). The subtle beast. Snakes, from myth to medicine. 1 Vol., Taylor & Francis, London, UK, 163 p.
- Mion, G., Larréché, S., and Goyffon, M. (2010). *Aspects cliniques et thérapeutiques des envenimations graves*. Urgence Pratique, Ganges (France), 255 p.
- Miranda, F., and Lissitzky, S. (1958). Purification de la toxine du venin de scorpion (*Androctonus australis* L) *Bioch Biophys Acta*, 30, S217-S218.
- Miranda, F., Rochat, H., and Lissitzky, S. (1960). Sur la neurotoxine du venin de scorpion. 2. Purification à partir de deux espèces de scorpion. *Bull Soc Chim Biol*, 42, 379-391.
- Miranda, F., Kopeyan, C., Rochat, H., Rochat, C., and Lissitzky, S. (1970). Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterisation of eleven neurotoxins from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector* and *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *Eur J Biochem*, 16, 514-523.
- Moreira-Ferreira, A.M.B., Kalapothakis, E., Diniz, C.R., and Chávez-Olórtegui, C. (1998). *In vivo* protection against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization of mice with a non-toxic protein. *Toxicon*, 1998, 36, 333-339.
- Nicolas, J.P., Lambeau, G., and Lazdunski, M. (1995). Identification of the binding domain for secretory phospholipases A<sub>2</sub> on their M-type 180 kDa receptor. *J Biol Chem*, 270, 28869-28873.
- Noël, L.S., Champion, B.R., Holley, C.L., Simmons, C.J., Morris, D.C., Payne, J.A., Lean, J.M., Chambers, T.J., Zaman, G., Lanyon, L.E., Suva, L.J., and Miller, L.R. (1998). RoBo-1, a novel member of the urokinase plasminogen activator receptor/CD59/Ly-6/snake toxin family selectively expressed in rat bone and growth plate cartilage. *J Biol Chem*, 273, 3878-3883.
- Ogúura, N., Boni-Mitake, M., and Rádis-Baptista, G. (2005). New view on crotoamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. *Toxicon*, 46, 363-370.
- Ohana, B., Fraenkel, Y., Navon, G., and Gershoni, J.M. (1991). Molecular dissection of cholinergic binding sites: how do snakes escape the effect of their own toxins? *Biochem Biophys Res Commun*, 179, 648-654.
- Ohkura, N., Inoue, S., Ikeda, K., and Hayashi, K. (1994). The two subunits of the phospholipase inhibitor from the plasma of Thailand cobra having structural similarity to urokinase-type plasminogen activator receptor and Ly-6 related proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 204, 1212-1218.
- Ohkura, N., Okuhara, H., Inoue, S., Ikeda, K., and Hayashi, K. (1997). Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from the blood plasma of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. *Biochem J*, 325, 527-531.
- Okumura, K., Inoue, S., Ikeda, K., and Hayashi, K. (2003). Identification and characterization of serum protein homologous to alpha-type phospholipases A<sub>2</sub> inhibitor (PLI alpha) from a non venomous snake *Elaphe quadrivirgata*. *IUBMB Life*, 55, 539-545.
- Okumura, K., Ohno, A., Nishida, M., Hayashi, K., Ikeda, K., and Inoue, S. (2005). Mapping the region of the alpha-type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor responsible for its inhibitory activity. *J Biol Chem*, 280, 37651-37659.
- Olamendi-Portugal, T., Gómez-Lagunas, F., Gurrola, G.B., and Possani, L.D. (1998). Two similar peptides from the venom of the scorpion *Pandinus imperator*, one highly effective blocker and the other inactive on K<sup>+</sup> channels. *Toxicon*, 36, 759-770.
- Perales, J., Villela, C., Domont, G.B., Choumet, V., Saliou, B., Moussatché, H., Bon, C., and Faure, G. (1995). Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. *Eur J Biochem*, 227, 19-26.
- Perales, J., and Domont, G.B. (2002). Are inhibitors of metalloproteinases, phospholipases A<sub>2</sub> and myotoxins members of the innate immunity system? In: *Perspectives in molecular toxicology*, Ménez, A. (Ed.),

- Vol. 1, John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp. 435-456.
- Possani, L.D., Martin, B.M., and Swensden, I. (1982). The primary structure of noxiustoxin: a K<sup>+</sup> channel blocking peptide purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res Commun*, 47, 285-289.
- Possani, L.D., Becerril, B., Delepierre, M., and Tytgat, J. (1999). Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem*, 264, 287-300.
- Prendini, L., and Wheeler, W.C. (2005). Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. *Cladistics*, 21, 446-494.
- Rigoni, M., Paoli, M., Milanese, Caccin, P., Rasola, A., Bernardi, P., and Montecucco, C. (2008). Snake phospholipase A2 neurotoxins enter neurons, bind specifically to mitochondria, and open their transition pores. *J Biol Chem*, 283, 34013-34020.
- Rochat, H., Bernard, P., and Couraud, F. (1979). Scorpion toxins: chemistry and mode of action. *Adv Cytopharmacol*, 3, 325-334.
- Rosso, J.P., Bougis, P.E., and Martin-Eauclaire, M.F. (2009). Le point sur les chlorotoxines des venins de scorpion. In: *Toxines et signalisation*, Benoit, E., Goudey-Perriere, F., Marchot, P., Servent, D. (Eds.), Vol. 1, SFET Editions, Paris, pp. 155-158.
- Shirai, R., Gotou, R., Hirano, F., Ikeda, K., and Inoue, S. (2010). Autologous extracellular cytochrome c is an endogenous ligand for leucine-rich alpha2-glycoprotein and beta-type phospholipase A2 inhibitor. *J Biol Chem*, 285, 21607-21614.
- Sitges, M., Possani, L.D., and Bayón, A. (1986). Noxiustoxin, a short-chain toxin from the Mexican scorpion *Centruroides noxius*, induces transmitter release by blocking K<sup>+</sup> permeability. *J Neurosci*, 6, 1570-1574.
- Sribar, J., Kovacic, L., Draskovic, P., Faure, G., and Krizaj, I. (2007). The first phospholipase inhibitor from the serum of *Vipera ammodytes ammodytes*. *FEBS J.*, 274, 6055-6064.
- Sribar, J., and Krizaj, I. (2011). Secreted phospholipases A<sub>2</sub> – not just enzymes. *Acta Chim Slov*, 58, 678-688.
- Stockmann, R., and Ythier, E. (2010). Scorpions du monde. NAP Editions, Verrières-le-Buisson, France, 565 p.
- Torres, A.M., and Kuchel, P.W. (2004). The  $\beta$ -defensin-fold family of polypeptides. *Toxicon*, 44, 581-588.
- Tytgat, J., Chandry, K.G., Garcia, M.L., Gutman, G.A., Martin-Eauclaire, M.F., van der Walt, J.J., and Possani, L.D. (1999). A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-K-Tx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol Sci*, 20, 444-447.
- Vachon, M. (1973). Etude des caractères utilisés pour classer les familles et les genres de Scorpions (Arachnides). I. La trichobothriotaxie en Arachnologie. Sigles trichobothriaux et types de trichobothries chez les scorpions. *Bull Mus Natl Hist Nat*, Paris (3), 140, Zool 104, 857-958.
- Vachon, M. (1975). Sur l'utilisation de la trichobothriotaxie du bras des pédipalpes des Scorpions (Arachnides) dans le classement des genres de la famille des Buthidæ Simon. *CR Acad Sci Paris*, 281, 1597-1599.
- Vidal, N., and Hedges, S.B. (2009). The molecular evolutionary tree of lizards, snakes and amphisbænians. *C.R. Biologies*, 332, 129-139.
- Wang, X., Venable, J., LaPointe, P., Hutt, D.M., Koulov, A.V., Coppinger, J., Gurkan, C., Kellner, W., Matteson, J., Plutner, H., Riordan, J.R., Kelly, J.W., Yates, J.R. 3rd, and Balch, W.E. (2006). Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell*, 127, 803-815.
- Whittington, C.M., Papenfuss, A.T., Bansal, P., Torres, A.M., Wong, E.S., Deakin, J.E., Graves, T., Alsop, A., Schatzkamer, K., Kremitzki, C., Ponting, C.P., Temple-Smith, P., Warren, W.C., Kuchel, P.W., and Belov, K. (2008). Defensins and the convergent evolution of platypus and reptile venom genes. *Genome Res*, 18, 986-994.
- Whittington, C.M., Koh, J.M., Warren, W.C., Papenfuss, A.T., Torres, A.M., Kuchel, P.W., and Belov, K. (2009). Understanding and utilising mammalian venoms via a platypus venom transcriptome. *J Proteom*, 72, 155-164.
- Whittington, C.M., and Belov, K. (2014). Tracing monotreme venom evolution in the genomics era. *Toxins*, 6, 1260-1273.
- Zhu, S., Gao, B., and Tytgat, J. (2012). Evolution of a neurotoxin from a defensin. *Toxicon*, 60, 120 (abstr).
- Zhu, S., Peigneur, S., Gao, B., Umetsu, Y., Ohki, S., and Tytgat, J. (2014). Experimental conversion of a defensin into a neurotoxin: implications for origin of toxin function. *Mol Biol Evol*, 31, 546-559.
- Zimmermann, G.R., Legault, P., Selsted, M.E., and Pardi, A. (1995). Solution structure of bovine neutrophil beta-defensin-12: the peptide fold of the beta-defensins is identical to that of the classical defensins. *Biochemistry*, 34, 13663-13671.