

Toxines de venin : des armes biologiques redoutables au service de la santé humaine

Au cours de l'évolution, les animaux venimeux ont produit une panoplie de toxines peptidiques, armes redoutables de défense contre les prédateurs ou pour la capture des proies. Les cibles de ces toxines sont des protéines impliquées dans la conduction et la transmission nerveuse, principalement des canaux ioniques. Ces venins constituent une source inestimable d'agents

pharmacologiques très spécifiques pour la caractérisation de sous-types de canaux ioniques et de récepteurs membranaires. Par leur efficacité et leur sélectivité d'action, ils offrent un potentiel thérapeutique important comme l'attestent les toxines dont l'efficacité dans des troubles neurologiques est aujourd'hui testée dans des essais thérapeutiques.

Le venin de nombreux animaux (mollusques, scorpions, serpents, araignées, etc.) est une source de polypeptides toxiques appelés toxines qui constituent des armes redoutables de défense contre les prédateurs ou de capture des proies. Au cours de l'évolution, ces animaux ont développé des stratégies neuropharmacologiques extrêmement sophistiquées, aboutissant à la production d'une batterie de toxines, spécifiques de chaque espèce animale. Ces nombreux et divers polypeptides se caractérisent par une forte affinité et une très grande sélectivité pour leur cible respective. Comme la stratégie majeure de ces animaux consiste à immobiliser rapidement l'adversaire, les cibles de ces toxines sont principalement des protéines impliquées dans la conduction nerveuse et la transmission neuromusculaire, notamment des canaux ioniques. Les venins constituent ainsi une source inestimable d'agents pharmacologiques très spécifiques pour la caractérisation de sous-types de canaux ioniques et de récepteurs membranaires. Par leur efficacité et leur sélectivité d'action, ils offrent un potentiel thérapeutique important, et plusieurs toxines sont aujourd'hui en cours d'essai clinique pour des troubles du système nerveux.

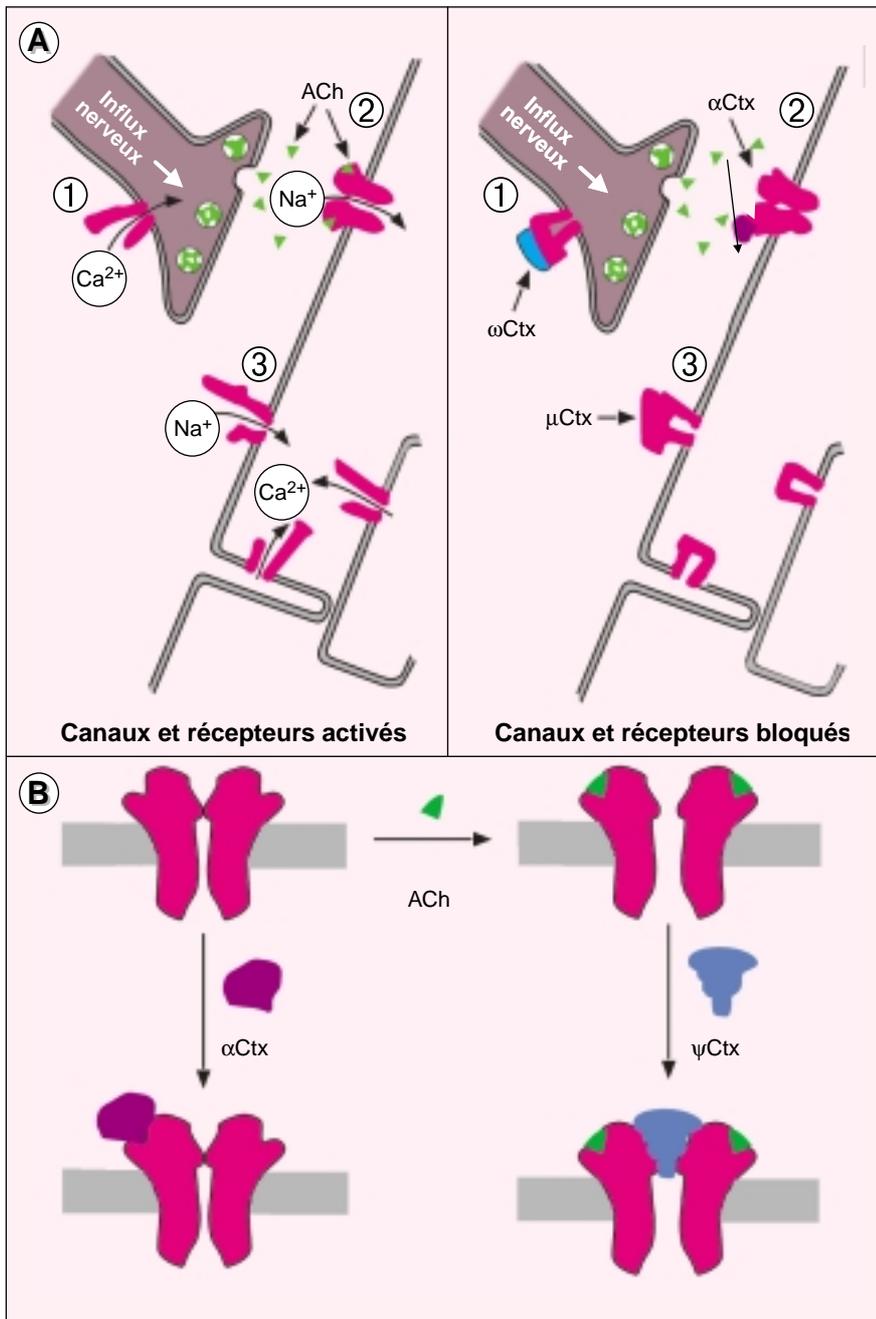
Nous proposons ici de résumer les principes généraux concernant les

toxines protéiques, leurs actions sur les canaux ioniques, et leur potentiel thérapeutique, sujet abordé lors du 11^e colloque annuel de l'Association Canaux Ioniques (Lalonde-les-Maures, septembre 2000). Nous illustrerons nos propos par des exemples principalement fournis par les escargots marins (cônes) et les scorpions, dont les venins ont été bien étudiés ces dernières années. Les lecteurs intéressés pourront trouver des informations détaillées dans plusieurs revues récentes [1-9].

Mode d'action des toxines

La composition du venin de chaque espèce est extrêmement complexe, contenant de nombreuses toxines différentes (entre 50 et 200 chez les cônes et scorpions). Outre la diversité des victimes potentielles, un des avantages remarquables fournis par cette complexité est l'effet complémentaire, voire synergique, qui résulte de la combinaison de peptides agissant sur différentes cibles. En ce sens, certains animaux ont largement anticipé le principe des thérapies multiples développées aujourd'hui pour certaines pathologies humaines. Cette multiplicité d'action permet d'augmenter considérablement l'efficacité du venin et de prévenir le développement de résistance aux toxines.

L'exemple des cônes marins piscivores illustre bien cette stratégie [1]. Ces organismes attrapent les poissons grâce à une dent en forme de harpon par laquelle ils injectent leur venin. Chez *Conus purpurascens*, le venin provoque l'immobilisation de la proie en deux phases : un choc électrique qui provoque d'abord une paralysie très rapide mais transitoire, puis le blocage de la transmission synaptique au niveau de la jonction neuromusculaire. L'électrocution quasi-instantanée est due à une dépolarisation massive des neurones sensoriels innervant le site d'injection du venin. Cet effet résulte de l'action de deux toxines [10]. La première empêche l'inactivation des canaux sodiques dépendants du voltage ($C_{Na,V}$), ce qui induit une entrée soutenue de Na^+ dans le neurone, et la seconde bloque l'activité de certains canaux potassiques dépendants du voltage ($C_{K,V}$), réduisant ainsi la sortie de K^+ . L'interruption de la transmission synaptique au niveau de la jonction neuromusculaire fait intervenir une autre série de toxines, chacune ayant une cible moléculaire spécifique. L'aspect synergique de ce blocage est tout à fait remarquable (figure 1). Un groupe de peptides inhibe la libération du neurotransmetteur acétylcholine en bloquant sélectivement les canaux calciques dépendants du voltage ($C_{Ca,V}$) des ter-



◀ **Figure 1. Mécanisme de blocage de la transmission neuromusculaire par les conotoxines.** **A.** Le groupe de toxines impliqué a pour cible plusieurs composants de la jonction neuromusculaire. Les conotoxines ω (ω Ctx, symboles bleus), α (α Ctx, violet) et μ (μ Ctx, rouges) se lient spécifiquement et respectivement aux canaux Ca^{2+} présynaptiques (1), récepteurs nicotinniques de l'acétylcholine (ACh) post-synaptiques (2), et canaux Na^+ -voltage-dépendants du muscle (3). Le cadre en haut à gauche présente des canaux préalablement ouverts (état « activé ») par la dépolarisation membranaire ou l'ACh (triangle vert) libéré par exocytose. Dans ces conditions, les canaux sont alors perméables aux ions Ca^{2+} ou Na^+ comme l'indique les flèches entrantes. La liaison de chacune des toxines sur leur cible (cadre de droite) empêche le passage de ces ions à travers les canaux préalablement activés. Ils sont alors dans un état dit « bloqué ». Remarque : le récepteur nicotinnique (2) et le canal sodique musculaire (3) sont bloqués alors que les deux canaux calciques situés plus loin de la jonction neuromusculaire sont dans un état fermé de « repos » non conducteur. Les expressions « activé » et « bloqué » ne valent que pour les cadres du haut. **B.** La synergie d'action des toxines d'un venin provient aussi de l'inhibition d'un seul composant sur différents sites de l'élément macromoléculaire. La liaison de deux conopeptides non homologues α (α -Ctx, symboles violet) et ψ (ψ Ctx, symboles bleus) aux récepteurs nicotinniques musculaires inhibe leur activité, respectivement en empêchant la fixation de l'acétylcholine (récepteur non activable) et en obstruant le canal ionique lui-même (récepteur bloqué). (D'après [1], avec permission.) Ctx: conotoxine.

minaisons nerveuses pré-synaptiques [11]. Un autre groupe de peptides inhibe les récepteurs cholinergiques nicotinniques post-synaptiques par une double action antagoniste (compétitive et non compétitive) [12]. Enfin, certaines toxines bloquent l'activité des $C_{Na,V}$ musculaires, empêchant la formation du potentiel d'action [13]. L'action coordonnée de ces toxines bloque avec une grande efficacité l'activité motrice.

De nombreuses toxines agissent également sur d'autres canaux ioniques, canaux $C_{Na,V}$, $C_{Ca,V}$, $C_{K,V}$, canaux K^+ activés par le Ca^{2+} intracellulaire ($C_{K,Ca}$), canaux Cl^- , ou encore canaux Ca^{2+} du réticulum endoplasmique (récepteur de la ryanodine) (*ms* 1999, n° 3, p. 338) ou canaux sensibles au pH. Les récepteurs ionotropiques des neurotransmetteurs sont aussi des cibles privilégiées, comme le récepteur nicotinnique bien sûr,

mais aussi le récepteur du glutamate de type NMDA ou de la sérotonine de type 5-HT₃ [2-4, 6-9].

Sélectivité et diversité des toxines

Un atout pharmacologique majeur des toxines réside dans leur capacité à discriminer différents sous-types de canaux ioniques. Une telle sélectivité apparaît essentielle à la fonction biologique de ces molécules. Ainsi, deux

toxines d'un même venin de cône ont des effets opposés sur deux sous-types de $C_{Na,V}$: la δ -conotoxine augmente l'ouverture des $C_{Na,V}$ des neurones et intervient dans le choc électrique instantané, tandis que la μ -conotoxine bloque spécifiquement les $C_{Na,V}$ du muscle squelettique, participant ainsi au blocage de la contraction musculaire [1, 13]. C'est la grande sélectivité de ces toxines pour les divers sous-types de canaux Na^+ qui permet l'action du venin ; en l'absence de discrimination de ces canaux, les effets activateurs et inhibiteurs s'annuleraient.

Un autre exemple de cette haute sélectivité est fourni par les α -conotoxines MI et MII [3], des antagonistes spécifiques des récepteurs nicotiques, respectivement musculaires et neuronaux. Le mécanisme de sélectivité moléculaire de l' α -conotoxine MII pour les récepteurs nicotiques neuronaux de sous-type $\alpha 3\beta 2$ a été bien étudié [14]. La toxine possède deux sites distincts d'interaction. Un premier site permet l'accrochage et l'ancrage de la toxine au récepteur et un second situé dans un axe perpendiculaire à celui du premier site permet le verrouillage de la toxine sur sa cible. C'est cette double interaction qui confère une sélectivité accrue à de nombreuses toxines de cônes, appelées ligands de type « Janus » (en mémoire du dieu romain à double face).

La diversité des toxines est immense. Toutes espèces confondues, le nombre total de peptides est estimé respectivement à 50 000 et 100 000 dans les venins de cônes et de scorpions, et moins de 1 % ont été identifiés. Les mécanismes de genèse d'une telle variété de toxines si spécifiques restent mal compris. Là encore, l'étude des cônes nous apporte des indications intéressantes [8, 15]. Les quelques dizaines de milliers de peptides existant dans les venins de cônes proviennent seulement d'une demi-douzaine de superfamilles de gènes. Les peptides actifs, qui forment la partie carboxy-terminale de leur précurseur, sont clivés par des enzymes protéolytiques (figure 2). La partie N-terminale de ces précurseurs est très conservée, alors que la partie C-terminale présente une hypervariabilité

responsable de la divergence exceptionnelle des peptides. Seules les cystéines formant des ponts disulfures dans le polypeptide mature sont conservées dans une même famille, imposant ainsi une structure tridimensionnelle relativement rigide. La diversité semble provenir de la formation de bibliothèques combinatoires de peptides avec des contraintes de conformations (les ponts disulfures), et des boucles hautement variables responsables de la sélectivité (figure 2). Les peptides inactifs seraient écartés par sélection naturelle. La vitalité et la diversité du groupe des escargots marins, la plus grande famille d'invertébrés marins, constituent une belle démonstration de l'efficacité d'une telle stratégie.

Intérêt thérapeutique des toxines

Les toxines ont souvent été une source d'inspiration dans la décou-

verte de nouveaux médicaments. Par exemple la tubocurarine et la toxine botulinique, qui sont des poisons bloquant la transmission synaptique au niveau des jonctions neuromusculaires, se sont avérées être d'excellents myorelaxants utilisés respectivement comme anesthésique et anti-contractionnant. Si de nombreux médicaments utilisés dans les maladies neurologiques ont aussi pour cibles des canaux ioniques, leur absence fréquente de sélectivité est responsable d'effets secondaires qui limitent leur utilisation. Diminuer ces effets secondaires implique un ciblage beaucoup plus précis des nombreux sous-types de canaux ioniques. Des molécules présentant une grande sélectivité pharmacologique pour les $C_{Na,V}$ sont actuellement en essai clinique afin de développer de nouveaux analgésiques, anticonvulsivants et anti-arythmiques ayant une fenêtre thérapeutique plus restreinte [16].

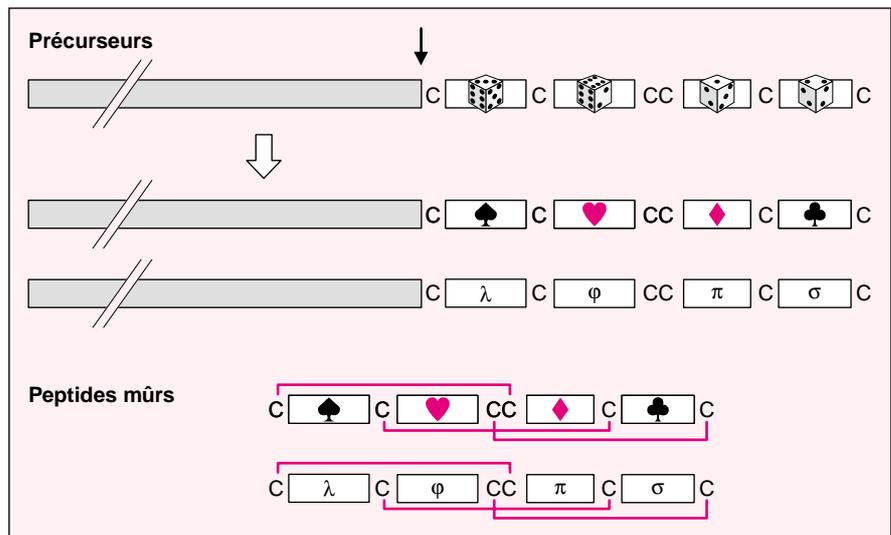


Figure 2. Diversification des toxines peptidiques au cours de l'évolution des Conus. Ce schéma propose un mécanisme de changement de séquence de peptide précurseur lors de l'évolution de nouvelles espèces. Les peptides matures, qui forment la partie C-terminale du précurseur, sont produit par clivage protéolytique (flèche). Au cours de l'évolution des nouvelles espèces, la partie N-terminale et les résidus cystéine du peptide mûr restent conservés, tandis que les autres régions indiquées par les différents symboles (cœur, pique, carreau, trèfle, lettres grecques) sont « hyper-mutées ». Le résultat est l'obtention d'un panel de peptides dont la structure est imposée par les ponts disulfures conservés, entre lesquels on trouve des séquences d'acides aminés « hyper-mutées » (deux exemples sont montrés dans la figure). L'apparition de nouvelles séquences pourrait ne pas être complètement aléatoire. La structure représentée correspond aux ω - et δ -conotoxines. (D'après [15], avec permission.)

La toxine de cône ω -conotoxine MVIIA (*Conus magus*) a une très grande sélectivité pour les $C_{Ca,V}$ de type N [11]. Ces canaux sont particulièrement abondants dans les neurones sensoriels nociceptifs de la corne dorsale de la moelle épinière. Leur activité est modulée par les opioïdes comme la morphine. Des essais cliniques en phase III montrent que l' ω -conotoxine MVIIA (ou ziconotide) a une meilleure affinité et efficacité que la morphine, sans les effets secondaires de cette dernière. Sa commercialisation est prévue prochainement aux États-Unis pour le traitement des douleurs chroniques, résistantes aux thérapeutiques, d'origine neurologique ou inflammatoire [8].

Une approche similaire a été utilisée pour développer de nouveaux médicaments anticonvulsivants dans le traitement de l'épilepsie. L'hyperactivité du système glutamatergique central est un des mécanismes impliqués dans la genèse des crises d'épilepsie [17]. Des antagonistes des différents récepteurs du glutamate sont donc des anticonvulsivants potentiels. Parmi ceux-ci, le récepteur ionotropique de type NMDA a fait l'objet d'une attention particulière. Ce récepteur existe sous différentes formes, en fonction de la nature des sous-unités qui le composent. Cependant, la plupart des antagonistes spécifiques de ces récepteurs ne distinguent pas les différentes isoformes, et tous les essais thérapeutiques réalisés ont démontré l'existence d'effets secondaires intolérables. Les conantokines, extraites du venin de cônes, sont des antagonistes sélectifs d'une sous-population de récepteurs NMDA. Des études cliniques sont en cours pour évaluer les avantages thérapeutiques de ce groupe de peptides dans le traitement de l'épilepsie, notamment la conantokine G de *Conus geographus* qui cible sélectivement les récepteurs contenant la sous-unité NR2B [8, 18].

Certaines toxines de scorpions ou d'anémone pourraient également être d'intéressants immunosuppresseurs, par leur action sur certains $C_{K,V}$ et/ou $C_{K,Ca}$ [19]. L'activité de ces canaux ioniques provoque une hyperpolarisation membranaire, et favorise ainsi un influx important de Ca^{2+} à

travers des canaux calciques activés par la vidange des stocks intracellulaires (I_{CRAC}). L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire est indispensable à l'activation cellulaire, à la sécrétion de cytokines, et à la prolifération des lymphocytes T. La suppression sélective de l'activité de ces $C_{K,V}$ par la kaliotoxine du scorpion *Androctonus mauretanicus mauretanicus* sur des modèles cellulaires et animaux est une voie d'étude intéressante qui pourrait aboutir à la découverte de nouveaux immunosuppresseurs utiles dans le traitement de certaines maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques [20, 21].

Enfin, la chlorotoxine, issue du scorpion *Leiurus quinquestriatus*, inhibe l'activité de canaux Cl^- des cellules gliales. Cette toxine, actuellement en phase I d'essai clinique, est un excellent inhibiteur de la prolifération anarchique de cellules gliales dans des tumeurs (gliomes) du système nerveux central [22].

Conclusions

Au cours de l'évolution, les animaux venimeux ont créé une formidable panoplie d'agents pharmacologiques avec une affinité et une sélectivité remarquables pour leur cible protéique. Nombre de ces cibles sont des canaux ioniques. Comme souvent dans la nature, le bien n'est jamais très loin du mal, et ces armes chimiques mortelles se révèlent être aussi des outils incomparables pour la recherche et la médecine. Le venin de ces prédateurs a commencé à fournir de nombreuses substances dont la sélectivité dépasse largement celle de la majorité des agents pharmacologiques, et à ce titre apporte un grand espoir pour la santé publique. Cet espoir est d'autant plus grand que seule une infime partie de la composition des venins est aujourd'hui connue (moins de 1 %).

A travers l'histoire des toxines de venins, la nature nous donne ici une leçon d'efficacité dans la conception de composés pharmacologiques et la stratégie médicamenteuse. Les chercheurs et l'industrie pharmaceutique ont déjà commencé à suivre ses conseils ■

Remerciements

Nous remercions chaleureusement Mireille Passama pour son aide dans l'élaboration des figures.

RÉFÉRENCES

1. Olivera BM EE. Just Lecture, 1996. Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol Biol Cell* 1997; 8: 2101-9.
2. Harvey AL. Twenty years of dendrotoxins. *Toxicon* 2001; 39: 15-26.
3. McIntosh JM, Santos AD, Olivera BM. Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 59-88.
4. Grishin E. Polypeptide neurotoxins from spider venoms. *Eur J Biochem* 1999; 264: 276-80.
5. Darbon H. Toxines animales et canaux ioniques. *J Soc Biol* 1999; 193: 445-50.
6. Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na^+ channels. *Eur J Biochem* 1999; 264: 287-300.
7. Possani LD, Merino E, Corona M, Bolivar F, Becerril B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. *Biochimie* 2000; 82: 861-8.
8. Jones RM, Bulaj G. Conotoxins – New vistas for peptide therapeutics. *Curr Pharm Des* 2000; 6: 1249-85.
9. Escoubas P, Diochot S, Corzo G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie* 2000; 82: 893-907.
10. Terlau H, Shon KJ, Grilley M, Stocker M, Stühmer W, Olivera BM. Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature* 1996; 381: 148-51.
11. Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω -conotoxins and ω -agatoxins. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 823-67.
12. Shon KJ, Grilley M, Jacobsen R, et al. A noncompetitive peptide inhibitor of the nicotinic acetylcholine receptor from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry* 1997; 36: 9581-7.
13. Cruz LJ, Gray WR, Olivera BM, et al. *Conus geographus* toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J Biol Chem* 1985; 260: 9280-8.
14. Shon KJ, Koerber SC, Rivier JE, Olivera BM, McIntosh JM. Three-dimensional solution structure of α -conotoxin MII, an $\alpha 3b 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor-targeted ligand. *Biochemistry* 1997; 36: 15693-700.
15. Olivera BM, Hillyard DR, Marsh M, Yoshikami D. Combinatorial peptide libraries in drug design: lessons from venomous cone snails. *Trends Biotechnol* 1995; 13: 422-6.
16. Clare JJ, Tate SN, Nobbs M, Romanos MA. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. *Drug Discov Today* 2000; 5: 506-20.

17. Chapman AG. Glutamate receptors in epilepsy. *Prog Brain Res* 1998; 116: 371-83.
18. Williams AJ, Dave JR, Phillips JB, Lin Y, McCabe RT, Tortella FC. Neuroprotective efficacy and therapeutic window of the high-affinity *N*-methyl-D-aspartate antagonist conantokin-G: *in vitro* (primary cerebellar neurons) and *in vivo* (rat model of transient focal brain ischemia) studies. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 378-86.
19. Chandy KG, Cahalan M, Pennington M, Norton RS, Wulff H, Gutman GA. Potassium channels in T lymphocytes: toxins to therapeutic immunosuppressants. *Toxicon* 2001; 39: 1269-76.
20. Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, *et al.* Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* 2000; 275: 37137-49.
21. Beeton C, Barbaria J, Giraud P, *et al.* Selective blocking of voltage-gated K⁺ channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *J Immunol* 2001; 166: 936-44.
22. Soroceanu L, Gillespie Y, Khazaeli MB, Sontheimer H. Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. *Cancer Res* 1998; 58: 4871-9.

François Tiaho

Canaux et Récepteurs Membranaires; Cnrs-UMR 6026, Campus de Beaulieu, Bât. 13, Université de Rennes I, 35042 Rennes Cedex, France.
Email: francois.tiaho@univ-rennes1.fr

Frédéric Becq

Physiologie des Régulations Cellulaires, Cnrs-UMR 6558, Université de Poitiers, 40, avenue du Recteur-Pineau, 86022 Poitiers Cedex, France.

Nicolas Hussy

Biologie des Neurones Endocrines, Cnrs-UMR 5101, CCIPE, 141, rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 5, France.

Les auteurs font partie du comité d'organisation du colloque Canaux Ioniques.
Site web : <http://physio.univ-lyon1.fr/canaux/canaux.htm>

TIRÉS A PART

F. Tiaho.

m/s n° 8-9, vol. 17, août-septembre 2001