
INDUCTION DE PROTECTION *IN VIVO* ET *IN VITRO* CONTRE L'ACTIVITE LETALE DU VENIN DE *BUTHUS* *OCGITANUS TUNETANUS* AVEC UNE PROTEINE RECOMBINANTE

K. BENKHADIR^{1*}, T. MEJRI¹, R. BEL HAJ RHOUMA¹, M. EL AYEB¹ ET H. KAROU¹

¹ Laboratoire des Venins et Toxines, Institut Pasteur de Tunis, B. P 74, 1002 Tunis-Belvédère,

* Auteur correspondant

RESUME

On rapporte l'utilisation d'une toxine de scorpion recombinante sous forme de protéine de fusion comme antigène pour l'immunisation de souris. Le but est de produire un sérum à capacité protectrice contre le venin du scorpion *Buthus occitanus tunetanus*, l'une des deux espèces les plus dangereuses en Tunisie et impliquées dans plusieurs cas d'envenimation scorpionnique. La partie codante de la toxine Bot III (la toxine la plus active du venin de *Buthus occitanus tunetanus*) a été exprimée sous forme d'une protéine de fusion couplée à deux domaines synthétiques de la protéine A de *Staphylococcus aureus* dans le périplasmе d'*E. coli*. L'hybride ZZ-Bot III a été purifié par chromatographie d'affinité, caractérisé par immunoblot et utilisé comme antigène pour générer des anticorps neutralisants chez la souris. Les anticorps produits neutralisent 10 LD₅₀/ml de la fraction toxique et confèrent une protection significative contre le challenge par des toxines apparentées.

Mos clés: *Buthus occitanus tunetanus*, protéine recombinante, *E. coli*, immunothérapie

INTRODUCTION

Les toxines de scorpions représentent une famille de polypeptides basiques qui désorganisent la fonction normale des tissus excitables des muscles et des neurones en causant des dommages respiratoires et circulatoires pouvant même aboutir à la mort^(1,2).

L'envenimation scorpionnique constitue un grave problème de santé publique dans plusieurs régions du

ABSTRACT

We report the use of recombinant scorpion toxin in the form of fusion protein as antigen for mice immunisation. The aim is to produce protective antisera against lethal activity of the venom from Tunisian scorpion *Buthus occitanus tunetanus*, responsible for several annually reported human cases of scorpion stings. The gene encoding Bot III (the most toxic alpha toxin of *Buthus occitanus tunetanus*) was fused to the sequence encoding synthetic ZZ domains of staphylococcal protein A. The construct ZZ-Bot III was expressed in the periplasm of *E. coli* as a fusion protein and purified by affinity chromatography. The recombinant fusion protein was characterized and used as antigen to generate antibodies in mice. The antibodies against the recombinant protein neutralize the toxic venom (10 LD₅₀/ml) and also confer protection for immunized mice against antigenically related mammal toxins.

Words keys: *Buthus occitanus tunetanus*, recombinant protein, *E. coli*, immunotherapy

monde. En Tunisie une étude épidémiologique effectuée par la Direction de Soins de Santé de Base (DSSB), entre 1986-1997, a rapporté de 30481 à 40000 cas des victimes de piqûre annuellement. La famille des Buthidae est largement incriminée, et les deux espèces les plus dangereuses en Tunisie, sont *Androctonus australis hector* et *Buthus occitanus tunetanus*. Les toxines identifiées, purifiées, séquencées et caracté-

térisées à partir de ces deux espèces appartiennent à trois groupes structuraux et d'homologie antigéniques représentés, respectivement, par les toxines Aah I, AahII et Bot I⁽⁶⁾.

Plusieurs études sur les toxines d'origine animale ont été d'une grande utilité dans l'amélioration de la sérothérapie et dans l'étude des relations structure-fonction. L'administration de sérum anti-scorpionique, élaboré chez le cheval, est l'une des approches utilisées pour neutraliser son effet. Cependant, l'obtention d'un sérum hautement spécifique et efficace est compliquée à cause de la toxicité élevée de l'antigène utilisé. Cette difficulté est due à plusieurs paramètres. Premièrement, l'efficacité du sérum est très faible quand les chevaux sont immunisés avec le venin brut commercialisé puisqu'il est composé par une variété de toxines et de protéines non toxiques⁽⁴⁾. Des anticorps polyclonaux neutralisant les toxines de scorpion peuvent être également obtenus. Mais, la purification des toxines à partir du venin brut récolté avant l'immunisation de chevaux est coûteuse et nécessite des quantités énormes de toxines pures. Aussi, l'injection d'antigène détoxifié avec un faible coût peut circonvier au problème d'immunisation avec un produit très toxique. Cependant, les propriétés antigéniques des toxines de scorpion sont largement dépendantes des éléments structuraux secondaires et les épitopes conformationnels⁽⁴⁾. Ainsi, les modifications chimiques utilisées pour altérer la toxicité des toxines de scorpion affectent également leurs conformations et par la suite leurs antigénicités. Aussi, le polymorphisme structural et antigénique des toxines de scorpion complique la conception d'un anti-venin polyvalent.

Les protocoles d'application de l'immunothérapie ont été optimisés, afin d'améliorer la qualité des sérums préparés. Actuellement à l'Institut Pasteur de Tunis, les sérums élaborés chez le cheval sont spécifiques des fractions toxiques des venins de Aah et Bot. Ces sérums ne sont plus composés d'IgG entiers, mais de fragments d'anticorps F(ab')₂⁽⁵⁾ qui montrent une diffusion et une élimination plus rapide et donc une meilleure neutralisation du venin circulant. Cependant, les paramètres pharmacocinétiques du venin restent toujours plus rapides que celles des F(ab')₂. Concevoir donc des molécules recombinantes de taille plus faible serait intéressant. La possibilité de manipu-

ler génétiquement ces molécules pourrait ultérieurement permettre d'en améliorer encore les propriétés fonctionnelles et structurales avant de caractériser leurs propriétés antigéniques et pharmacocinétiques.

Des essais avec des molécules recombinantes clonées et exprimées chez *E. coli* ont donné des résultats prometteurs. En effet, l'immunisation des souris par la protéine de fusion ZZ/Bot XIV⁽⁶⁾ appartenant au groupe structural III, représenté par la toxine Bot I, a donné des résultats satisfaisants. Les protéines de fusion MBP-Aah I, MBP-Aah II et MBP-Aah III⁽⁷⁾ sont immunogéniques chez la souris et inductrices d'anticorps neutralisant le venin d'*Androctonus australis hector*.

Dans ce travail, on décrit l'expression et la production dans le périplasme d'*E. coli* de la toxine Bot III la plus active du venin du scorpion *Buthus occitanus tunetanus* et qui appartient au groupe structural II représenté par la toxine Aah II. La capacité de la protéine de fusion ZZ/Bot III à conférer une protection contre la fraction toxique du venin *Buthus occitanus tunetanus* chez la souris a été explorée.

MATERIEL ET METHODES

Construction du plasmide recombinant :

L'ADN plasmidique codant pour le gène de la toxine Bot III (Benkhadir et al., article soumis) a servi de matrice pour l'amplification par PCR de sa partie codante. Un couple d'amorces a été utilisé: une amorce aller: **5' CGGAGGGTACCCATG GTA AAA GAC GGT TAT ATT GTC GAC 3'** qui code pour les huit premiers acides aminés de la partie Terminale de la protéine Bot III, additionné du côté 5' d'une séquence ATG (codant pour une méthionine) précédé par un site de restriction de l'enzyme *NI* et une séquence de protection d'environ cinq bases pour stabiliser l'amorce. L'amorce retour : **5' GCGGCAGGATCC TTA ATG GCA TCT TCC TGG TCC 3'** correspond à la séquence complémentaire codant pour les acides aminés 59-64 de la partie Terminale de la toxine Bot III native (le résidu asparagine en position 64 est remplacé par un résidu histidine), un codon stop en aval de cette séquence, un site de restriction de l'enzyme *Bam HI* et une séquence de protection. Le programme PCR utilisé est à 30 cycles ; il comprend une étape de dénaturation à 94°C pendant une minute, une étape d'hybridation à 50°C pendant une minute et une étape d'élongation à 72°C pendant

une minute. Le produit de PCR a été purifié à partir du gel d'agarose et clivé par les deux enzymes de restriction Bam HI et NI. Par la suite, le produit de coupure est cloné au niveau des mêmes sites de restriction du vecteur pEZZ-18 pour construire le plasmide recombinant. Le produit de ligation est transformé dans les cellules compétentes HB101 (supE44 ara 14 galK2 lacY1 D(gpt-proA)62 rpsL20 (Strr) xyl-6mtl-1 recA13 D(mcrC-mrr) HsdS-(r-m-)). Les clones recombinants ont été vérifiés par digestion enzymatique. Les plasmides contenant un insert à la bonne taille ont été séquencés par la suite.

Séquençage des clones recombinants sélectionnés :

Les séquences des clones sélectionnés ont été déterminées au sein du service de séquençage automatique de l'Institut Pasteur de Tunis, et analysées en utilisant le logiciel du programme protein analysis.

Expression et production des protéines hybrides dans le périplasma d'E. coli :

Pour produire l'hybride, le clone à exprimer est cultivé dans du milieu LB liquide supplémenté avec 200 µg/ml d'ampicilline et incubé une nuit à 37°C sous agitation. Les bactéries sont centrifugées à 4000 rpm, 15 min à 4°C. Le culot bactérien est repris dans 1/10 ème du volume initial avec le tampon de lyse: 30 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 20% saccharose contenant du PMSF (inhibiteur de protéase) et de la lysozyme à une concentration finale de 0.4 µg/ml. La solution est incubée 2 heures à 4°C puis centrifugée à 10 000 rpm pendant 15 min. Le surnageant contenant la fraction périplasmique est gardé.

Purification de la protéine hybride sur colonne d'immunoaffinité IgG Sépharose :

Le liquide périplasmique est déposé sur une colonne d'IgG Sépharose 6 FF (Pharmacia). La colonne est lavée avec une solution TST (Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05%) jusqu'à une adsorption protéique nulle à 280 nm. La colonne est lavée par la suite avec deux volumes d'acétate d'ammonium 5 mM pH 5. Les protéines fixées sont éluées par une solution d'acide acétique 0.5 M pH 3.4.

Electrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante et analyse des protéines par immunoblot :

L'échantillon protéique est fractionné par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 20[®]. A la fin de la

migration, le gel est coloré au bleu de Coomassie G-250 pendant 15 à 30 min et décoloré dans un mélange de méthanol 30% et acide acétique 10% ou transféré sur une membrane PVDF.

A la fin du transfert, la membrane est placée dans une solution de BSA 2% dans du PBS pendant 2 heures à température ambiante et sous agitation pour bloquer les sites de liaisons non spécifiques. La membrane est alors mise à réagir dans le tampon d'hybridation qui contient un anticorps monoclonal anti-protéine A ou polyclonal dirigé contre la fraction toxique Bot G-50 dilué à 1/50000 pendant deux heures sous agitation. L'anticorps n'ayant pas réagi sera éliminé par lavage de la membrane avec du PBS - Tween 20 deux fois pendant 10 min. La membrane est hybridée par la suite avec un anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase dilué à 1/5000, pendant deux heures sous agitation. Après lavage de la membrane avec du PBS - Tween 20 deux fois pendant 10 min, la révélation est effectuée par incubation de la membrane dans le diaminobenzidine tétrahydrochloride dans 25 ml de Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM et H₂O₂ 30 % jusqu'à apparition des bandes d'intérêt. La membrane est rincée rapidement dans du PBS-Tween puis séchée à l'air libre.

Immunsérum des souris avec la protéine hybride :

Des souris Swiss âgées de 6 semaines (plusieurs groupes de 8 souris) ont été immunisées avec des doses croissantes de la protéine de fusion à raison de 50 µg, 100 µg, 150 µg et 200 µg mélangée avec de l'hydroxyde d'alumine Al (OH)₃ selon un intervalle de temps régulier (J1, J8, J17, J35) et, à J42 la saignée des souris est effectuée. Des souris témoins négatifs ayant les mêmes caractéristiques ont été immunisées également dans les mêmes conditions avec l'hydroxyde d'alumine ou le PBS.

Titration de l'immunsérum :

L'immunsérum dirigé contre l'hybride est titré par un dosage ELISA, selon la méthode décrite par Chavez-Olortegui et al.⁽⁹⁾. 100 µl d'antigène (les fractions toxiques Bot G-50 et Aah G-50), à une concentration de 5 µg/ml, sont repris dans un tampon carbonate 5 mM, pH 9.5, puis adsorbés sur une plaque de microtitration pendant 2h à 37°C. Les puits sont saturés par la suite avec de la BSA ou du lait écrémé à 2%, pendant 1 h 30 à 37°C. Après, on dépose 100 µl d'une dilution

d'immun sérum adéquat pour une incubation de 2h à 37°C, suivie par un dépôt de 100 µl du conjugué couplé à la peroxydase diluée au millième puis incubé 1h30 à 37°C. Chaque étape citée précédemment est suivie de 5 lavages avec un tampon phosphate 50 mM, pH 7.4. A la fin, le complexe est révélé par l'addition de 100 µl de substrat chromogénique (0,04 % orthophénylène diamine: OPD, 30% H2O2). La réaction enzymatique est arrêtée par une solution H2SO4 2N. L'absorption à 492 nm est déterminée sur lecteur ELISA.

Détermination de la capacité neutralisante de l'immunsérum :

Après la détermination du titre d'anticorps présent dans l'immunsérum par ELISA, 200 µl sont incubés 1h30 min à 37 °C avec des doses croissantes (x DL50) des fractions toxiques Bot G-50 (DL50 = 26,4 µg) et Aah G-50 (DL50= 11 µg), puis centrifugés 10 min à 4°C à 1000 rpm et injectés par voie sous cutanée à des souris Swiss de 20 g. Le volume d'injection est 200µl par souris. En contrôle négatif, la même quantité d'immunsérum de souris non immunisées est aussi injectée à des souris naïves. La capacité neutralisante est exprimée en nombre de DL50 neutralisée par ml d'immunsérum⁽¹⁰⁾.

$$\text{Capacité neutralisante } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{Nouvelle DL50} - 1 \text{ DL50}}{\text{Volume de l'immun sérum}}$$

Détermination du pouvoir protecteur de la ZZ-Bot III chez la souris Swiss :

Un mois après la fin du programme d'immunisation, la résistance de plusieurs groupes de 8 souris immunisées aux toxines par l'hybride ZZ-Bot III, l'hydroxyde d'Alumine ou le PBS, a été testée. Elle est estimée par injection en sous cutanée de plusieurs doses létales des fractions toxiques Bot G-50 et Aah G-50. La mortalité est enregistrée après 24 heures.

RESULTATS

Expression et purification de la toxine recombinante Bot III :

La partie codante de la toxine Bot III dont le gène a été cloné (Benkhadir et al., soumis pour publication), a été amplifiée par PCR, clonée dans le vecteur pEZZ-18 et exprimée dans le système E. coli sous forme d'une protéine de fusion couplée à deux domaines synthétiques de la protéine A de Staphylococcus

aureus⁽¹¹⁾. Cette fusion a le double avantage de permettre l'exportation de la toxine recombinante dans le périplasma d' E. coli et de purifier l'hybride par affinité sur colonne IgG-sépharose⁽¹²⁾. Son taux de production est satisfaisant ; il est estimé à 15 mg/l. La pureté de la protéine de fusion est supérieure à 90% ; ceci est vérifié sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices 20% (Figure 1A). Une bande majoritaire de 22 kDa correspondant au poids moléculaire de l'hybride a été obtenue. Par la suite, l'hybride ZZ/Bot III purifié a été testé en Immunoblot par hybridation de la membrane avec un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine A de Staphylococcus aureus (Figure 1B) et par l'anticorps polyclonal anti-Bot G-50.

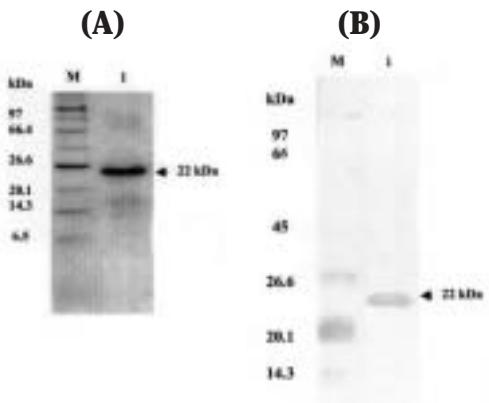


Figure 1. Profil électrophorétique de l'hybride ZZ/Bot III purifié par chromatographie d'affinité sur gel de polyacrylamide 20% en conditions dénaturantes et réductrices (A) et révélation de la protéine de fusion par Immunoblot (B) avec l'anticorps monoclonal dirigé contre la protéine A. (A) et (B) Piste 1, Hybride ZZ-Bot III purifié sur colonne d'immunoaffinité IgG sépharose. M, marqueur de poids moléculaire (6.5-97 kDa).

La capacité neutralisante de l'immun sérum ZZ-Bot III :

Plusieurs lots de souris Swiss (8 souris par lot) ont été immunisés avec 50, 100, 150 et 200 µg de la protéine de fusion ZZ/Bot III selon un intervalle de temps régulier. Un mois après la première injection, le sérum

Tableau I. Capacité protectrice de l'immunsérum anti-ZZ/Bot III *in vivo* et *in vitro* contre l'effet létal des fractions toxiques BotG-50 et AahG-50.

Immunogène	Fractions toxiques	La quantité d'antigène en (DL50)	Protection <i>in vivo</i> des souris vaccinées (%)	Capacité neutralisante du sérum (DL50/ml)	Protection <i>in vivo</i> des souris témoins (-) (%)
ZZ- Bot III	Bot G50	2	100	10	0
		3	100	N.D	N.D
		4	100	N.D	N.D
	Aah G50	2	100	5	0
		3	100	N.D	N.D
		4	50	N.D	N.D

N.D.: non déterminé

Témoin (-) : PBS ou hydroxyde d'alumine (Adjuvant utilisé)

DL50 (Bot G-50) = 26,4µg

DL50 (Aah G-50) = 11µg

récolté de plusieurs souris immunisées a été titré. Le titre obtenu par ELISA est représenté sur la figure 2.

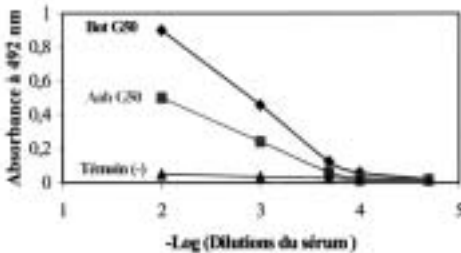


Figure 2. Réactivité antigénique du sérum anti hybride ZZ-Bot III. Le test ELISA est établi avec 5µg/ml des fractions toxiques BotG-50 et AahG-50 préadsorbés sur des plaques de titration en utilisant une gamme de dilution du sérum de l'hybride ZZ-Bot III (pool de sérums de 8 souris). La révélation de la réaction est effectuée par un couplage avec un anticorps anti-souris couplé à la peroxydase. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 492 nm.

Les sérums produits par les souris immunisées avec la protéine recombinante Bot III (fusionnée avec deux domaines ZZ) produisent des titres différents contre les fractions toxiques Bot G-50 et Aah G-50 (qui contient la toxine Aah II qui est antigéniquement reliée à la toxine Bot III). Le sérum des souris témoins (immunisées ou non avec l'hydroxyde d'alumine ou

le PBS) n'induit pas de réaction avec les fractions toxiques du venin.

L'immun sérum anti-ZZ-Bot III a une capacité neutralisante de 264µg/ml (10 DL50/ml de sérum) et 55 µg/ml (5 DL50/ml de sérum) vis à vis des fractions toxiques Bot G-50 et Aah G-50, respectivement, (Tableau I). Ceci indique que les anticorps induits par l'hybride ZZ-Bot III ont une capacité neutralisante spécifique vis à vis du venin de *Buthus occitanus tunetanus*.

La protection *in vivo* des souris immunisées par la protéine hybride ZZ-Bot III :

Un mois après la fin du programme d'immunisation avec la protéine de fusion ZZ-Bot III, en utilisant l'hydroxyde d'alumine comme adjuvant, les souris (8 souris par lot) ont été challengées avec des doses croissantes des fractions toxiques Bot G-50 et Aah G-50 (Tableau I). Elles ont été complètement protégées contre 2 DL50 des fractions Bot G-50 et Aah G-50. Cette protection persiste jusqu'à 4 DL50 vis à vis de Bot G-50 et 3 DL50 et Aah G-50. Ces valeurs correspondent approximativement à 105.6 µg de Bot G-50 (4 DL50) et 211.2 µg du venin de *Buthus occitanus tunetanus*, 33 µg de Aah G-50 (3 DL50) et 165 µg du venin d'*Androctonus australis hector* (Bot G-50 et Aah G-50 représentent approximativement 50 % et 20% du venin brut, respectivement). Cette protection persiste au delà de trois mois. Par contre, pour les souris (8 souris par groupe) immunisées avec le PBS ou l'hydroxyde d'alu-

mine, une mortalité immédiate contre 2 DL50 des fractions toxiques Aah G-50 et Bot G-50 a été observée.

DISCUSSION

La production de molécules de venins de scorpion non toxiques, immunogènes et inductrices d'anticorps protecteurs est d'une grande utilité pour pallier au problème de santé publique causé par l'envenimation scorpionique. L'une des approches de lutte a consisté à explorer la possibilité d'une immunoprévention anti-scorpionique, c'est à dire l'élaboration, sur un modèle animal, en l'occurrence la souris, d'une réponse immune potentiellement protectrice contre les venins de scorpions. Les préparations testées sont de nature synthétique. Leurs utilisations présentent l'avantage d'être non toxiques. Des anticorps neutralisants ont été produits avec des peptides synthétiques mimant les régions accessibles des toxines de scorpion. Cependant, une telle approche n'a pas protégé les souris immunisées⁽¹³⁾. L'administration à des souris de doses croissantes de peptides synthétiques non toxiques (Abu) 8 Aah II (toutes les demi-cystines sont converties en acide amino-butérique) a été testée^(14,15). En effet, les souris immunisées avec ces peptides ont présenté une capacité protectrice. Cependant, les modifications chimiques utilisées pour détruire ou diminuer la toxicité des toxines de scorpions peuvent altérer leurs conformations et par conséquent leurs antigénicités. Aussi, le polymorphisme structural et antigénique des toxines de scorpion complique la conception d'un anti-venin polyvalent. Dans *E. coli*, le rendement élevé de la production des protéines recombinantes à faible coût, a initié les études basées sur le développement d'une approche vaccinale utilisant des molécules recombinantes. En effet, cette technologie offre des avantages pour un développement vaccinal facile et peu onéreux. Les faibles coûts de production des protéines recombinantes et la relative facilité de leur production sont des avantages non négligeables par rapport à la production de sérum anti-scorpionique.

Dans ce travail et dans le but d'exprimer, de produire en quantités suffisantes la toxine Bot III la plus active du venin de *Buthus occitanus tunetanus* et de tester sa capacité à induire la production d'anticorps neutralisants, notre choix s'est porté sur le système *E. coli*, auparavant testé pour sa capacité à exprimer avec succès les toxines de scorpion^(6,7,16,17,18).

Considérant les difficultés de production de petites molécules dans le cytoplasme d'*E. coli* où les dégradations protéolytiques sont plus fréquentes⁽¹⁹⁾, notre stratégie était de produire la protéine recombinante Bot III⁽²⁰⁾ sous forme d'une protéine de fusion. La toxine Bot III appartient au groupe structural et immunologique II et présente 98 % d'homologie avec la toxine Aah II. Le taux de production est amélioré par la fusion d'un gène eucaryote avec un gène bactérien⁽²¹⁾. Ainsi, la toxine Bot III a été exprimée dans le périplasma d'*E. coli* sous forme d'une protéine de fusion couplée à deux domaines synthétiques de la protéine A de *Staphylococcus aureus*^(6,12,22,23).

Approximativement, 15 mg/l d'hybride pur sous forme monomérique ont été obtenus après purification par immunoaffinité. Ce taux de production est très satisfaisant et comparable à celui rapporté dans la littérature par Bouhaouala et al.⁽⁶⁾, avec un rendement de 10,5 mg/l en erlen d'un litre. Un rendement de production de 15-40 mg/l d'un mélange de formes monomériques et multimériques a été rapporté par Legros et al.⁽⁷⁾.

La protéine de fusion ZZ-Bot III a été reconnue en immunoblot en présence de l'anti-Bot G-50 et l'anticorps monoclonal anti-protéine A. Elle est ensuite utilisée pour immuniser les souris Swiss. La protéine de fusion a été caractérisée *in vivo* par injections de doses croissantes en ICV jusqu'à des doses supérieures à 2 µg. Aucune toxicité n'a été induite. Ceci peut être expliqué par la présence des deux domaines ZZ de la protéine A qui entraîne un encombrement stérique de la protéine recombinante lors de son exposition à son site de fixation et par l'absence de la formation des ponts disulfures correctement repliés menant à une altération du site toxique et une perte de la toxicité. Toutefois, même avec ces altérations, la structure de la toxine Bot III est suffisamment bien préservée pour induire la production d'anticorps spécifiques.

Le sérum prélevé de souris immunisées avec la protéine de fusion ZZ/Bot III a été analysé par ELISA. Il a été testé pour son antigénicité croisée avec les fractions toxiques de *Buthus occitanus tunetanus* et d'*Androctonus australis hector*; il apparaît clairement que les souris ont développé une réponse immune significative. L'anti-ZZ-Bot III reconnaît spécifiquement les fractions G-50 de Bot et de Aah. Ainsi, la toxine Bot

III fusionnée à deux domaines ZZ induit la formation d'anticorps neutralisants les composants toxiques du venin. La capacité neutralisante de l'anti-Bot III chez la souris est équivalente à 10 DL50/ml, ce qui correspond à 264 µg du venin brut de Bot et confère une protection *in vivo* aux souris immunisées. Ceci montre que la structure adoptée par la protéine de fusion ZZ-Bot III ressemble à celle des toxines natives. Toutefois, la toxine Bot XIV recombinante[®] a été capable d'induire des anticorps neutralisants la fraction toxique Bot G-50. L'immun sérum neutralise jusqu'à 105,6 µg (4 DL50) de la fraction toxique. Par contre, l'immunsérum n'a pas de capacité neutralisante vis à vis de 23 µg (2 DL50) de Aah G-50. Ceci est dû à la spécificité de l'anti-Bot XIV vis à vis du groupe antigénique de Bot I.

Les immunsérums anti-MBP-AahI ou anti-MBP-AahII[®], préalablement incubés avec 3 DL50 de toxines natives correspondantes, AahI ou AahII, puis injectés par voie sous cutanée à des souris Swiss de 20 g, induisent une protection partielle (50%) mais significative. Une protection complète est observée lorsque 2 DL50 de la fraction toxique Aah-G50 sont préincubés avec un antiserum anti-mélange d'hybrides MBP-AahI + MBP-AahII ou MBP-AahI + MBP-AahII + MBP-AahIII. Le titre neutralisant minimal est estimé à 10DL50/ml.

L'utilisation de la ZZ-Bot III en tant qu'immunogène nous ouvre de nouveaux champs de recherche-développement dans le domaine de la sérothérapie anti-scorpionnique s'appuyant notamment sur le choix et la combinaison d'immunogènes à utiliser et leurs productions en grandes quantités grâce aux techniques de fermentation. Cette protéine hybride perd son caractère toxique en conservant un bon pouvoir immunogène. Il serait donc intéressant d'élaborer un vaccin protecteur contre l'effet du venin de *Buthus occitanus tunetanus*, puisque la ZZ-Bot III et la ZZ-Bot XIV appartiennent au deuxième et troisième groupe antigénique, respectivement[®]. De plus, il existe des différences quantitatives dans la représentation de chacune de ces molécules dans les venins d'une même espèce provenant de régions différents. Elles vont donc contribuer différemment dans l'effet de l'envenimement scorpionnique.

En conclusion, on a décrit les propriétés immunogéniques et protectrices en modèle animal de la toxine la

plus active du venin du scorpion *Buthus occitanus tunetanus*, fusionnée avec deux domaines synthétiques de la protéine A de *Staphylococcus aureus*. Pour atteindre un niveau élevé d'anticorps protecteurs contre la toxine native, un nombre de facteurs doit être optimisé, en particulier, la nature et la dose des antigènes. Comme ces protéines de fusion immunologiquement actives peuvent être produites en large quantité, elles constituent une alternative à l'utilisation du venin de *Buthus occitanus tunetanus* comme immunogène pour la production de sérum et pour conférer une immunoprotection contre les piqûres de scorpions.

RÉFÉRENCES

- 1 M. Goyffon, M. Vachon and N. Broglio** (1982). Epidemiological and clinical characteristics of the scorpion envenomation in Tunisia. *Toxicon*, **20**, 337-344.
- 2 M. Goyffon** (2002). Scorpion stings in sub-Saharan Africa. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **95**, 191-193.
- 3 H. Rochat, C. Rochat, C. Kopeyan, F. Miranda, S. Lissitzky and P. Edman** (1970). The amino acid sequence of neurotoxin I of *Androctonus australis* Hector. *Eur. J. Biochem.*, **17**, 262-266.
- 15 R. Kharrat, I. Zenouaki, Z. Ben Lasfar, K. Miled and M. El Ayeb** (1997). Molecular characterization, antigenicity and immunogenicity of anatoxic polymeric forms conferring protection against scorpion venoms. *Toxicon*, **35**, 915-930.
- 14 I. Zenouaki, R. Kharrat, JM. Sabatier, C. Devaux, H. Karoui, J. Van Rietschoten, M. El Ayeb and H. Rochat** (1997). *In vivo* protection against *Androctonus australis* hector scorpion toxin and venom by immunization with a synthetic analog of toxin II. *Vaccine*, **15**, 187-194.
- 5 MN. Krifi, H. Kharrat, K. Zghal, M. Abdouli, F. Abroug, S. Bouchoucha, K. Dellagi and M. El Ayeb**, (1998) Development of an ELISA for the detection of scorpion venoms in sera of humans envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot): correlation with clinical severity of envenoming in Tunisia. *Toxicon*, **36**, 887-900.
- 6 B. Bouhaouala-Zahar, F. Ducancel, I. Zenouaki, R. Ben Khalifa, L. Borchani, M. Pelhate, J. Boulain, M. El Ayeb and M. Karoui** (1996). A recom-

- binant insect-specific alpha-toxin of *Buthus occitanus tunetanus* scorpion confers protection against homologous mammal toxins. *Eur. J. Biochem.*, **238**, 653-660.
- 9 C. Chavez-Olortegui, D. Ait Amara, H. Rochat, C. Diniz and C. Granier** (1991). In vivo protection against scorpion toxins by liposomal immunization. *Vaccine*, **9**, 907-910.
- 13 C. Devaux, P. Fourquet, and C. Granier** (1996). A conserved sequence region of scorpion toxins rendered immunogenic induces broadly cross-reactive, neutralizing antibodies. *Eur. J. Biochem.*, **242**, 727-735
- 20 F. Ducancel, J.C. Boulain, O. Tremeau and A. Menez** (1989). Direct expression in *E. coli* of functionally active protein A-snake toxin fusion protein. *Protein Eng.*, **3**, 139-143.
- 20 M. El Ayeb, P. Delori and H. Rochat** (1983). Immunochemistry of scorpion alpha toxins, antigenic homologues checked with radio immunoassays (RIA). *Toxicon*, **21**, 709-716.
- 18 SCF. Guatimosim, E. Kalopothakis, CR. Diniz and C. Chavez-Olortegui** (2000). Induction of neutralizing antibodies against *Tityus serrulatus* toxins by immunization with a recombinant non-toxic protein. *Toxicon*, **38**, 113-121.
- 4 C. Granier, J. Novotny, JC. Fontecilla-Camps, P. Fourquet, M. El Ayeb and E. Bahraoui** (1989). The antigenic structure of a scorpion toxin. *Mol. Immunol.*, **26**, 503-513. Review.
- 23 D. Hodgson, S. Gasparini, P. Drevet, F. Ducancel, F. Bouet, J-C. Boulain, J.B. Harris and A. Menez** (1993). Production of recombinant notechis 11'2L, an enzymatically active mutant of a phospholipase A2 from *Notechis scutatus scutatus* venom, as directly generated by cleavage of a fusion protein produced in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **212**, 441-446.
- 8 U. K. Laemmli** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 21 S. A. Lazos and A.S. Tsiftoglou** (1998). Production and purification of recombinant human cytokines (rhIL-4, rhGM-CSF and rhIL-1beta) from engineered *E. coli* cells bearing pMAL expression vector constructs. *J. Protein Chem.*, **17**, 517.
- 7 C. Legros, H. Kaabi, M. El Ayeb, B. Céard, H. Vacher, PE. Bougis and M-F. Martin-Eauclaire**, (2002). Use of fusion protein constructs to generate potent immunotherapy and protection against scorpion toxins. *Vaccine*, **20**, 934-942.
- 19 F. A. O. Marston** (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **240**, 1-12.
- 11 B. Nilsson, T. Moks, B. Jansson, L. Abrahamson, A. Elmlblad, E. Holmgren, C. Henrichson, T.A. Jones and M. Ulhén** (1987). A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Prot. Eng.*, **1**: 107-113.
- 10 World Health Organization (W. H.O.)** (1981). Progress in the characterization of venoms and standardisation of antivenoms. Geneva: *World Health Organization*, **58**.
- 12 O. Trémeau, C. Lemaire, P. Drevet, S. Pinkasfeld, F. Ducancel, J-C. and A. Boulain, Ménez** (1995). Genetic engineering of snake toxins: the functional site of erabutoxinA, as delineated by site-directed mutagenesis, includes variant residues. *J. Biol.Chem.*, **270**, 9362-9369.
- 16 M. Turkov, S. Rashi, Z. Noam, D. Gordon, R. Ben Khalifa, M. Stankiewicz and M. Gurevitz** (1997). In vitro folding and functional analysis of an anti-insect selective scorpion depressant neurotoxin produced in *Escherichia coli*. *Protein Exp. Purif.*, **10**, 123-131.
- 17 N. Zilberberg, O. Froy, E. Loret, S. Cestele, D. Arad, D. Gordon and M. Gurevitz** (1997). Identification of structural elements of a scorpion alpha-neurotoxin important for receptor site recognition. *Biol. Chem.*, **272**, 14810-14816.