

## Du venin toxique à la découverte de nouveaux composés thérapeutiques, L. Quinton

### Introduction.

Plus de la moitié des principaux embranchements du monde animal est composée d'espèces produisant un venin dont les buts principaux sont d'immobiliser, de tuer et de pré-digérer les proies. Ces venins représentent une source exceptionnellement riche de molécules biologiquement actives et variées, tant dans leur structure que dans leurs effets. Même si certaines toxines organiques ont déjà été décrites (alkaloïdes, acylpolyamines), la majorité de ces molécules sont des peptides (7-77 acides aminés) fortement structurés par la présence de nombreux ponts disulfures qui leur confèrent non seulement la conformation adéquate pour se lier aux récepteurs mais aussi une certaine résistance aux enzymes de dégradation des proies. Certes, injectées à forte dose, les toxines induisent des effets nuisibles pour l'Homme comme des nausées, des hémorragies ou encore des paralysies, pouvant conduire à une mort plus ou moins rapide. Il a été cependant remarqué depuis l'Antiquité que les propriétés des venins pouvaient être exploitées à des fins bénéfiques pour l'Homme, et notamment d'un point de vue pharmaceutique et médical. Ainsi, déjà au IV<sup>ème</sup> siècle avant J-C, Hippocrate, considéré comme le père de la médecine, utilisait du venin d'abeille pour traiter l'arthrite et les problèmes d'articulations. Cette pratique est aujourd'hui toujours d'actualité et plus communément appelée « apithérapie ».

Les toxines agissent, en fait, avec efficacité et à faible dose sur des cibles moléculaires membranaires dont elles altèrent ou modulent le fonctionnement. Les cibles des toxines sont principalement localisées au niveau des systèmes nerveux et neuromusculaire (ex : dendrotoxines des mambas *Dendroaspis*) mais également au niveau du système cardiovasculaire (ex : sarafotoxines d'*Atractaspis*) ou plus généralement du système sanguin (ex : désintégrines de *Crotalus*). Ces propriétés remarquables permettent d'utiliser les toxines comme de véritables sondes d'étude spécifique de la distribution, de la structure et de la dynamique des récepteurs ciblés. Il a également été démontré à plusieurs reprises que leur action biologique peut être dérivée à des fins thérapeutiques et déboucher sur le développement de nouveaux médicaments. L'exemple le plus marquant est sans aucun doute celui du Prialt® commercialisé par Elan corporation. Le principe actif de ce médicament est du Ziconotide, l'analogue synthétique d'une conotoxine découverte dans le venin du cône marin *Conus magus* [1]. Son action analgésique puissante en fait un médicament de choix dans le traitement des douleurs intenses nécessitant une injection intrarachidienne. Nous pouvons également citer le Captopril, médicament dérivé d'une toxine trouvée dans le venin du serpent *Bothrops jararaca* [2]. Son activité d'inhibiteur de l'enzyme de conversion à l'angiotensine en fait un médicament efficace pour le traitement de l'hypertension artérielle. Une dizaine de toxines supplémentaires sont actuellement en phase de recherche clinique et pourrait conduire à l'émergence de nouveaux autres médicaments provenant des venins dans les prochaines années. Cette remarque prend de l'ampleur lorsque que l'on sait que les venins animaux représentent un banque d'environ 40.000.000 de composés bioactifs et que moins de 1% des toxines qui la composent ont été caractérisées [3]. La découverte de nouvelles

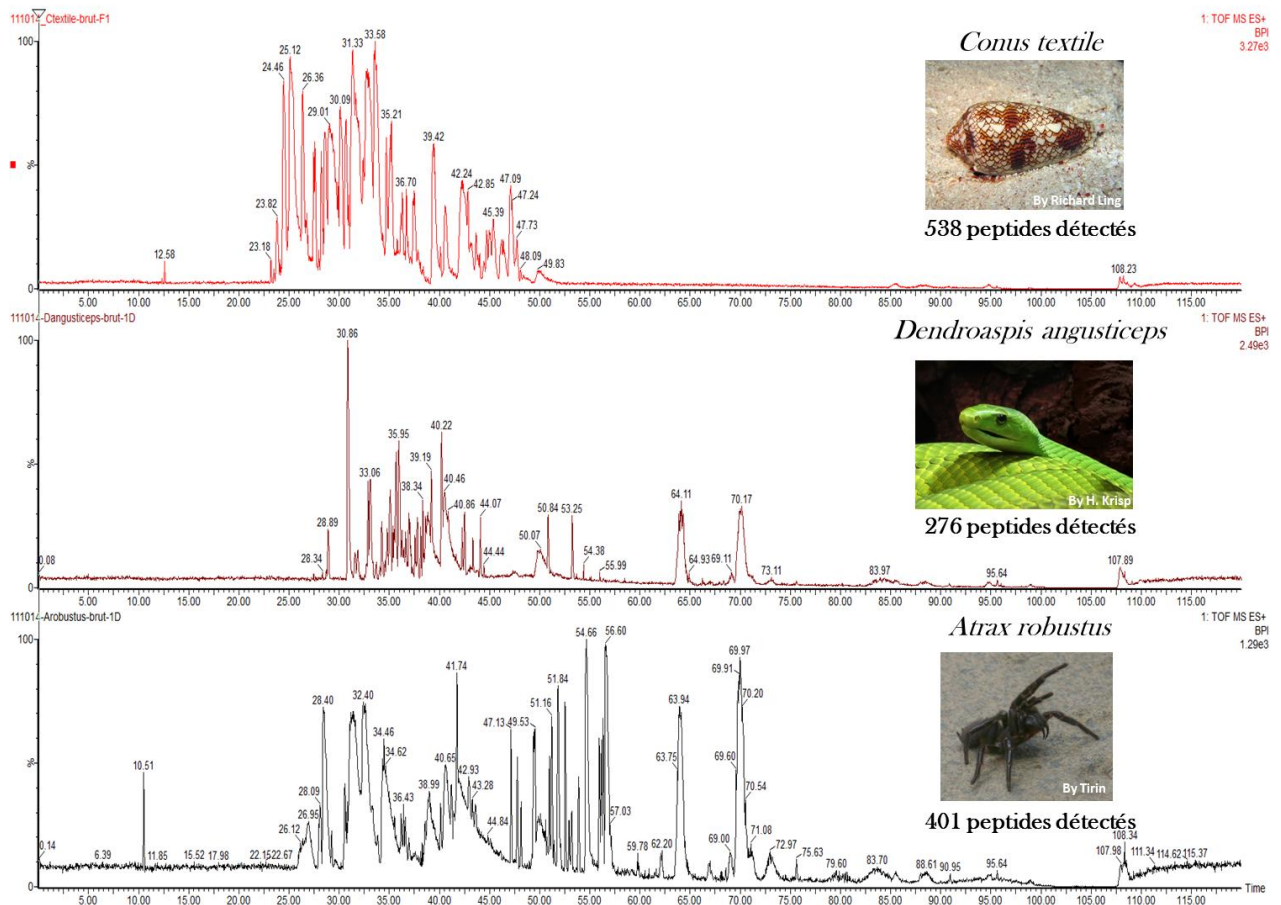
activités à partir de venins bruts repose en général sur une combinaison de tests pharmacologiques et d'analyses structurales physico-chimiques. La synthèse biomimétique de toxines permettant notamment de déterminer la nature des acides aminés impliqués dans la liaison au récepteur est également couramment rencontrée. Dans cet article, je propose de détailler les différentes étapes permettant, à partir d'un animal venimeux, de récupérer son venin et de déterminer les séquences peptidiques des toxines présentes dans le mélange.

### **Collecte du venin.**

La première étape de l'étude d'un venin consiste en sa collecte. Certains grands animaux venimeux comme les scorpions ou les serpents peuvent être littéralement traités. L'extraction du venin s'effectue alors en appliquant une pression mécanique sur les glandes à venins afin de provoquer le suintement du liquide visqueux. L'intérêt majeur est que cette traite peut-être répétée plusieurs fois étant donné que les animaux sont évidemment capables d'en synthétiser à nouveau. La collecte de venins provenant d'animaux plus petits (guêpes, fourmis, cônes marins...) est en revanche plus problématique. Dans le cas des hyménoptères (abeilles, frelons, etc...), un stratagème ingénieux est utilisé afin de récupérer un maximum de venin tout en préservant l'intégrité des animaux. Une plaque de verre, recouverte d'un fin grillage métallique, est installée à proximité l'entrée de ruches ou de nids. Les insectes colonisent abondamment cette plaque en quelques minutes. De faibles impulsions électriques sont alors appliquées sur le grillage. Par contractions musculaires, ces impulsions provoquent une expulsion du venin qui se dépose, sous forme de petites gouttelettes, sur la plaque de verre située sous le grillage. Le venin, une fois séché, est directement récupéré sous forme de poudre. Enfin, d'autres animaux permettent ni de traire facilement leur venin, ni de le récupérer avec une méthode simple. C'est le cas notamment des cônes marins, gastéropodes venimeux rencontrés dans les mers et océans chauds. La récupération de leur venin, d'un extrême intérêt, nécessite malheureusement et dans la majorité des cas le sacrifice de l'animal. Ces précieux venins étant actuellement très recherchés, notamment par l'industrie pharmaceutique, des 'fermes à venin' fleurissent un peu partout dans le monde et ce, même en Belgique [4] ! Ces sociétés ont pour but d'élever un maximum d'animaux provenant d'espèces différentes, de récolter de grandes quantités de venin et les vendre pour la recherche.

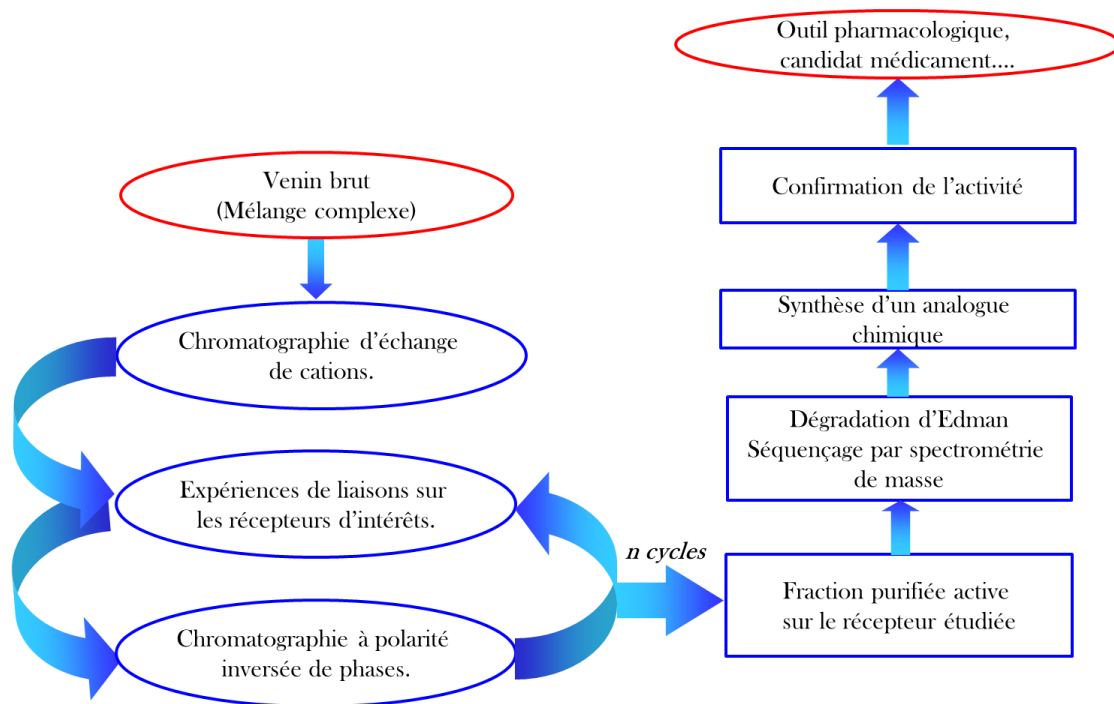
### **Découverte et séquençage de ligands.**

Les venins animaux sont des mélanges complexes composés de plusieurs centaines de toxines différentes (**Figure 1**). L'activité biologique de chacun de ces constituants ne peut donc pas être effectuée directement sur le venin brut. Les différents composés sont classiquement isolés par des techniques chromatographiques multidimensionnelles se basant sur les différences de propriétés physico-chimiques des composés, comme l'hydrophobicité ou bien encore le point isoélectrique.



**Figure 1 :** LC-MS de trois venins différents. On remarque que, bien que très différents, ces trois venins possèdent chacun plusieurs centaines de toxines, chacune étant potentiellement porteuse d'une activité biologique exploitable.

Afin de ne pas être dans l'obligation d'isoler les centaines de toxines présentes dans un venin, les purifications peuvent être guidées par l'activité biologique détectée dans les fractions chromatographiques, c'est-à-dire, au sein d'un nombre restreint de toxines. La technique la plus utilisée actuellement pour détecter l'activité dans des fractions chromatographiques reste sans aucun doute les expériences de liaisons en présence d'un ligand radioactif, aussi connu sous le nom d'expérience de déplacement de la liaison d'un ligand à l'équilibre (**Figure 2**). Le principal inconvénient de cette technique est qu'elles nécessitent de connaître un ligand radioactif qui se lie aux récepteurs étudiés. Ceci exclut de fait toute recherche de ligand sélectif de récepteurs orphelins, c'est-à-dire pour lesquels aucun ligand n'a encore été décrit. Lorsqu'une activité est détectée dans une fraction, cette dernière est sélectionnée puis purifiée à nouveau afin de générer des fractions secondaires. Chacune d'entre elle est de nouveau testée sur les récepteurs étudiés afin de déterminer laquelle est porteuse de l'activité détectée. Ce cycle de purification/expériences de liaisons est répété jusqu'à l'obtention d'une fraction chromatographiquement « pure » porteuse de l'activité biologique.



**Figure 2 :** Stratégie classique de découverte d'une activité biologique dans un venin, par expériences de liaisons.

La séquence de la toxine contenue dans la fraction isolée doit alors être déterminée afin de :

- (i) synthétiser des analogues chimiques en grosses quantités.
- (ii) vérifier que l'activité biologique est identique à la toxine naturelle.

Ces toxines synthétiques seront destinées à la description plus fine de l'activité biologique du composé qui permettra de répondre aux questions suivantes : la toxine se lie-t-elle à un seul et unique site du récepteur ? le composé possède-t-il des affinités différentes pour les sous-types de ce récepteur ? ou bien encore quels sont les acides aminés impliqués dans la liaison au récepteur ?

Généralement, la séquence des toxines peptidiques peut être obtenue par une combinaison de dégradation d'Edman et de techniques d'analyse protéomique. La dégradation d'Edman permet d'obtenir dans les meilleurs cas 40 à 50 acides aminés à partir de quelques picomoles tandis que la spectrométrie permet d'obtenir généralement les séquences complètes de toxines jusqu'à 8kDa, soit plus de 70 acides aminés. L'article se focalisera, par la suite aux techniques de spectrométrie de masse principalement utilisées pour déterminer les séquences des toxines de venins animaux.

### **Séquençage de toxines peptidiques par spectrométrie de masse.**

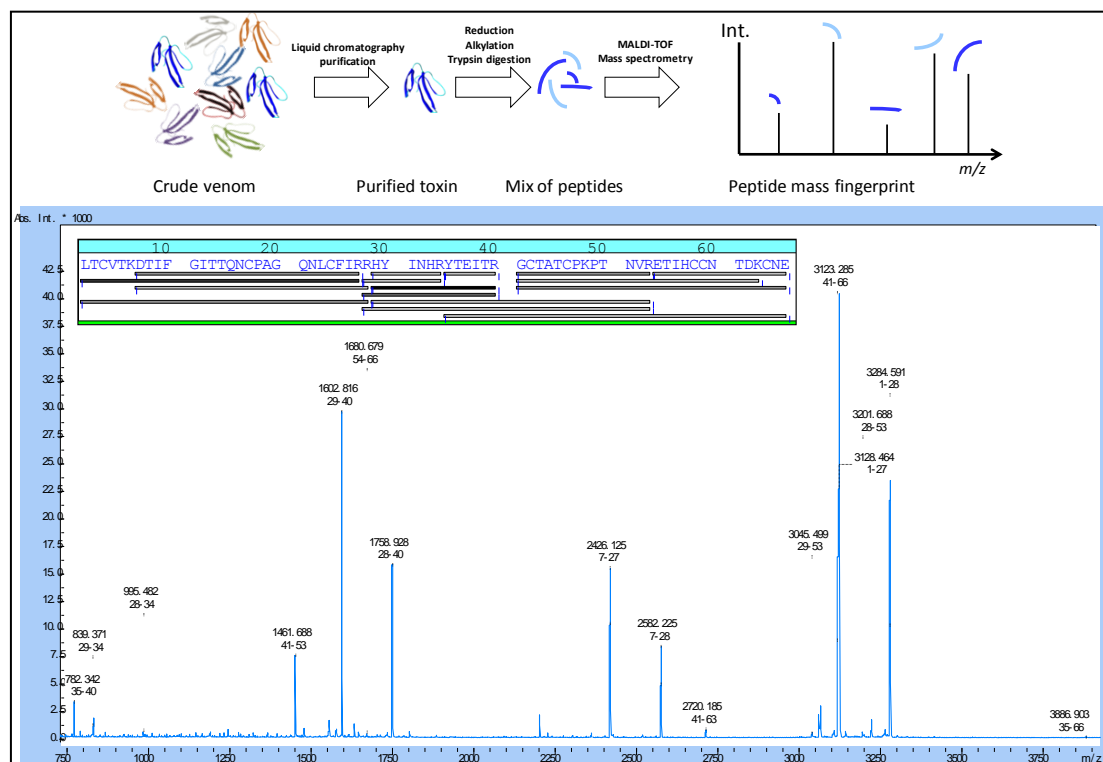
Deux principales techniques de spectrométrie de masse sont employées pour séquencer les toxines : le « Bottom-up » et « Top-down ».

**Approche «Bottom-Up».** L'approche « Bottom-up » s'applique principalement aux toxines de hauts poids moléculaires ( $M > 4\text{kDa}$ ). Dans ce cadre, la toxine est digérée par une enzyme

(très souvent, la trypsine), et les peptides générés sont fragmentés et séquencés via des expériences de spectrométrie de masse en tandem MS/MS.

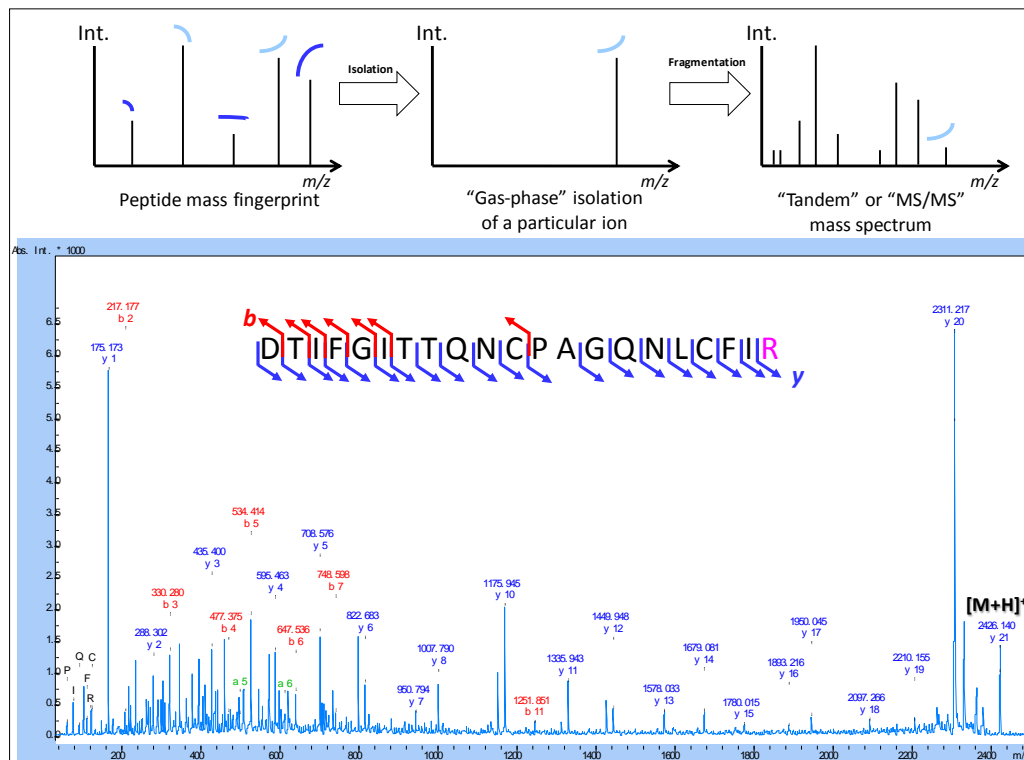
**Étape 1.** La première étape de cette approche consiste à réduire les ponts disulfures des toxines par du dithiothreitol avant d'alkyler les groupements sulfhydryl libérés par de l'iodoacetamide. Cette première étape a pour but de dénaturer les toxines et de prévenir de la reformation des ponts, afin d'augmenter l'efficacité de la digestion à venir. Puisque chaque cystéine réduite/alkylée entraîne une augmentation de la masse du peptide de 57 uma, il est possible, via cette étape de dénombrer le nombre de pont disulfures présents initialement dans la toxine analysée en comparant les masses de peptides avant et après réduction/alkylation. Cette information est parfois primordiale dans l'analyse de toxines animales puisque la gamme de masse ainsi que le nombre de ponts peut nous donner une information sur les récepteurs biologiques ciblés par la toxine.

**Étape 2.** Les toxines alkylées sont ensuite digérées par la trypsine générant idéalement des peptides de masses < 3500 Da. Le mélange de peptides est analysé par spectrométrie de masse (MALDI-TOF, ESI-Q-TOF, ESI-IT) dans le but d'enregistrer l'emprunte massique de la toxine (en anglais, 'PMF' pour *Peptide Mass Fingerprint*). A titre d'exemple, la Figure 3 représente le PMF obtenu par MALDI-TOF pour la toxine  $\rho$ -Da1b (M= 7507,5 Da, 4 ponts disulfures, 66 acides aminés) découverte dans le venin du mamba vert, *Dendroaspis angusticeps* [5].



**Figure 3.** Carte peptidique de la toxine  $\rho$ -Da1b découverte dans le venin de *Dendroaspis angusticeps*. Après réduction, alkylation et digestion par la trypsine,  $\rho$ -Da1b a été analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (matrice: 2,5-DHB). Au dessus de chaque pic est indiqué le rapport m/z de chaque ion et la position du peptide identifié dans la séquence. L'insert montre l'alignement de la séquence de la toxine avec les peptides détectés, démontrant que l'entièreté de la séquence est caractérisées.

Le spectre montre d'intenses signaux qui peuvent être attribués aux peptides théoriques résultant de la digestion *in silico* de  $\rho$ -Da1b. Dans cet exemple, 100% de la séquence de la toxine est retrouvée. La génération de ce type de spectre permet de valider les données de séquençage obtenues par la dégradation d'Edman ou bien encore le contrôle de séquences de toxines provenant de synthèses peptidiques ou d'expressions biochimiques. Dans le cadre d'études protéomiques classiques, l'interrogation avec ces spectres des bases de données de séquences protéiques conduit à l'identification de la protéine entière, et cela, même à partir d'un nombre réduit de pics détectés. Cependant, dans le cas des venins animaux, seul un nombre restreint de génomes d'espèces est actuellement accessible (*Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis*, *Hydra magnipapillata*, *Nematostella vectensis*) et seulement 1500 toxines ont été jusqu'à présent séquencées. Les séquences des toxines doivent donc, la plupart du temps, être déterminées avec l'aide d'aucune autre information que les spectres de fragmentation obtenus par spectrométrie de masse. Cette approche est communément appelée « *de novo sequencing* ». La **Figure 4** montre le spectre de fragmentation obtenu par MALDI-TOF/TOF pour le peptide détecté à  $m/z$  2426,1 dans le spectre de  $\rho$ -Da1b (**Figure 3**). Une large série d'ions de type y (porteurs du côté C-terminal) et quelques ions de type b (coté C-terminal) sont détectés et permettent de déterminer de manière non-ambigüe la séquence du peptide.



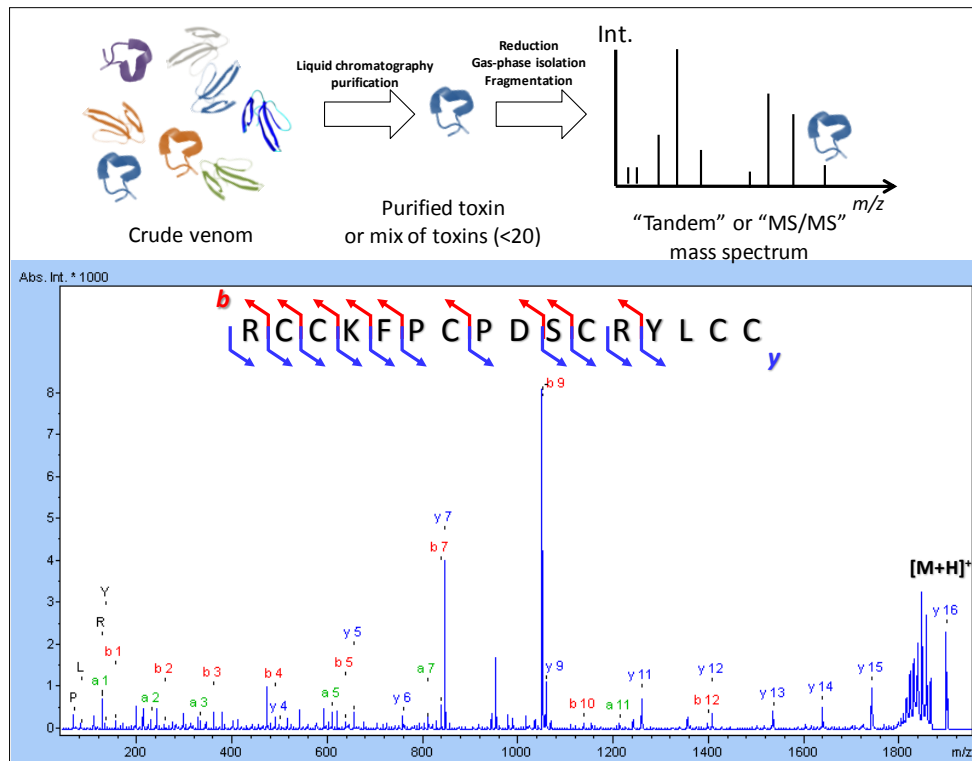
**Figure 4.** Spectre de masse en tandem (MS/MS) obtenu par MALDI-TOF/TOF pour le peptide de  $\rho$ -Da1b détecté à  $m/z$  2426.1 – Les ions y et b détectés pour les différents peptides ont permis, avec l'aide de résultats de la dégradation d'Edman, d'obtenir la séquence complète de cette toxine ( $M=7507,5$  Da). Spectromètre : Ultraflex II (Bruker Daltonics), matrice: acide 2,4-dihydroxybenzoïque, mode réflectron.

Cependant, l'approche Bottom-up souffre de plusieurs limitations. Tout d'abord, la toxine doit être purifiée avant d'entamer la préparation de l'échantillon (réduction/ alkylation digestion) afin de générer des résultats non-ambigus. Ensuite, il est souvent difficile de

déterminer la séquence complète du fait : (i) de la perte de certains peptides durant la préparation de l'échantillon, (ii) des digestions partielles, (iii) du manque de résidus lysines et arginines (sites de clivages de la trypsine), (iv) une mauvaise ionisation etc... De plus, les expériences de MS/MS ne permettent pas de manière universelle de déterminer la totalité de la séquence en acides aminés, certains ions fragments pouvant manquer rendant l'interprétation du spectre partielle. Enfin, il est important d'appuyer sur le fait que la combinaison des informations provenant du PMF et des spectres de fragmentation ne permet pas toujours de déterminer des séquences non ambiguës. En effet, même si tous les peptides détectés sur le PMF sont séquencés, il est parfois impossible de savoir dans quel ordre les lier entre eux. Dans ce type de cas, des expériences de digestions partielles ou bien l'utilisation d'une autre enzyme vont permettre de générer des séquences de peptides qui se chevauchent, permettant ainsi la reconstruction de la totalité de la séquence de la toxine, à la manière d'un véritable puzzle

**Approche “Top-Down”.** Le séquençage Top-Down (TDS) est basé sur la fragmentation des peptides et des protéines entières, c'est-à-dire sans digestion enzymatique [6]. L'intérêt majeur de cette technique est que la séquence des toxines est totalement accessible à l'analyse, sans aucune contraignante préparation d'échantillon qui conduit inévitablement à la perte d'une partie du matériel initial.

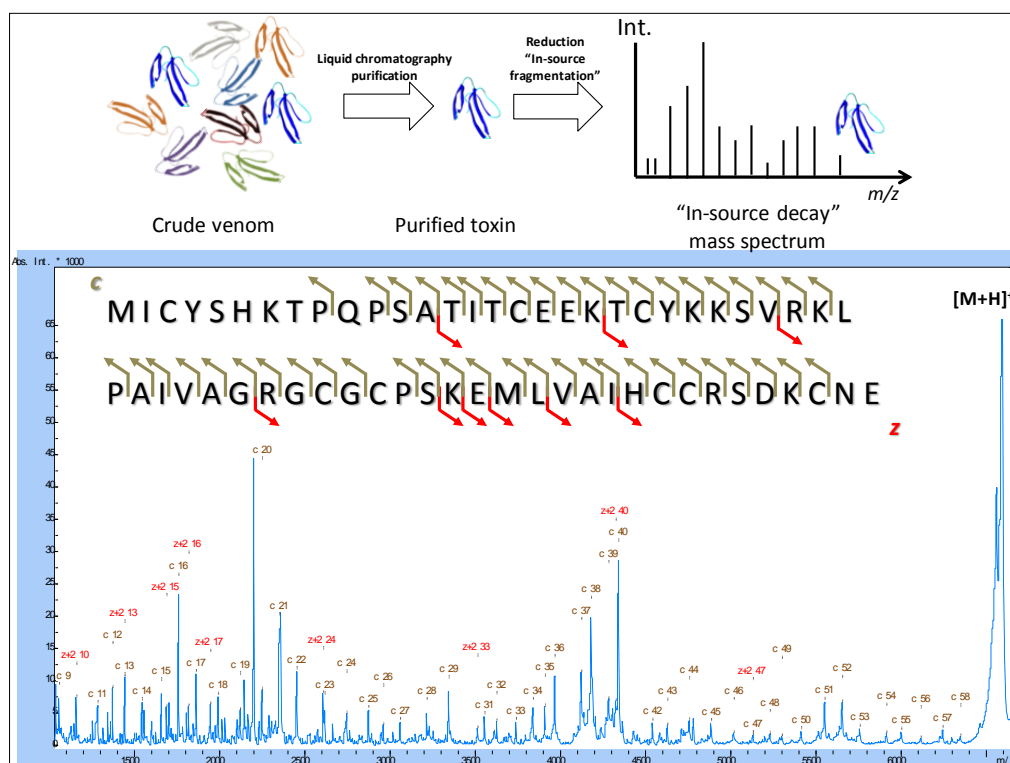
Le TDS de toxines peut être effectué grâce à différentes techniques de fragmentation. Nous pouvons tout d'abord nous limiter aux toxines de faibles poids moléculaires, c'est-à-dire jusqu'à 4kDa. Dans ce cas, les toxines préalablement réduites, sont fragmentées en phase gazeuse par collision avec un gaz inerte (CID pour « *Collision induced dissociation* »). Plusieurs exemples de séquençage de toxines peptidiques par CID sont décrits dans la littérature. Citons notamment l'analyse haut-débit des toxines présentes dans le venin de *Conus victoriae* (Jakubowski and Sweedler, 2004) ou bien encore le séquençage de toxines du venin de *Conus virgo* par spectrométrie de masse FT-ICR à haute résolution (Quinton *et al.*, 2006). Les peptides provenant de venins de cônes marins ne sont cependant pas les seuls toxines à pouvoir être séquencés par cette stratégie. En effet, de petites toxines provenant de venins de serpents comme par exemple des analogues d'endothélines (sarafotoxines, Hayashi *et al.*, 2004; Quinton *et al.*, 2005) ou de bradykinines (BPP, Soares *et al.*, 2005) ont été séquencées par TDS employant le CID. La **Figure 5** représente le spectre de masse obtenu lors de la fragmentation de la toxine Tx3.5a (M=1889.7 Da), provenant du venin de *Conus textile*. De belles séries d'ions de types a-, b- et y- sont observées et permettent la caractérisation d'une grande partie de la séquence de la toxine. Ce spectre est particulièrement facile à interpréter puisque les ions fragments détectés sont très intenses et nombreux. Malheureusement, ce type de résultat ne constitue évidemment pas la majorité des cas pour lesquels il n'est pas rare d'observer des séries d'ions très incomplètes rendant le séquençage basé sur cette unique technique totalement impossible.



**Figure 5.** Spectre MS/MS obtenu pour la toxine Tx3.5a, une conotoxine découverte dans le venin du cône textile. Après avoir réduit les ponts disulfures, la toxine a été fragmentée par MALDI-TOF/TOF [Spectromètre: Ultraflex II (Bruker Daltonics), matrice: 2,5-DHB, mode reflectron]. La séquence complète de la toxine a été obtenue avec l'aide de la séquence du précurseur présent dans les bases de données (code d'accès dans ExPASy : POC1N7).

L'emploi de techniques complémentaires est alors indispensable pour conclure sur la séquence des toxines. La complémentarité des techniques de fragmentation par CID et de celles par dissociation en source MALDI (MALDI-MSD) a été démontré lors de l'analyse de différentes conotoxines (Quinton *et al.*, 2007). MALDI-MSD est une technique de fragmentation efficace et rapide, qui s'effectue dans la source MALDI. Elle est initiée soit par collision et mène alors à la formation majoritaire d'ions de type y, ou bien alors par réactions radicalaires causées par la libération de radicaux hydrogène à partir de la matrice MALDI. Ce deuxième mécanisme mène à la formation d'ion de type c- et z-, porteurs respectifs des extrémités N- et C-terminales du peptide. Une seconde approche élégante, basée sur la complémentarité d'expériences de CID et d'ETD (*Electron Transfer Dissociation*) a été appliquée avec succès à l'analyse de conotoxines (Ueberheide *et al.*, 2009). L'ETD est une méthode de fragmentation possible pour les ions multichargés, donc ionisés par électrospray. Un électron est transféré d'un anion réactif aux toxines multichargées créant ainsi des cations radicalaires. Ces cations se dissocient alors en ions de type c- et de type z-, comparables à ceux obtenus par MALDI-MSD. Dans leur étude, les auteurs ont fait réagir les groupements sulfhydryl provenant des cystéines réduites avec du N,N-diméthyl-2-chloro-éthylamine. Cette réaction a eu pour conséquence de fixer une charge sur chacune des cystéines présente dans les peptides, et ainsi augmenter considérablement l'efficacité de fragmentation de la technique ETD. L'analyse du venin de *Conus textile* par cette approche a permis le séquençage non ambigu de 31 toxines.

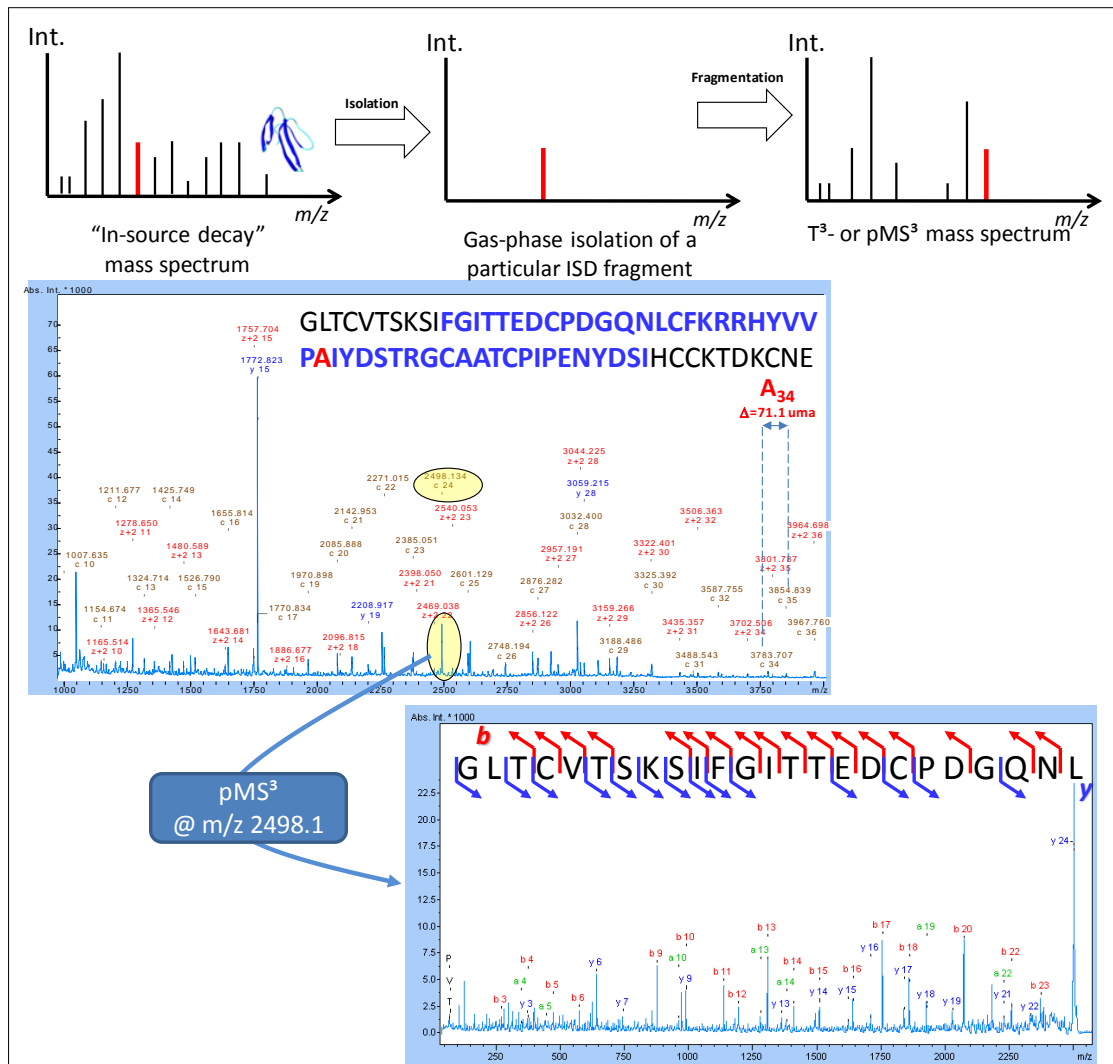
Le séquençage Top-Down peut également s'effectuer sur des plus gros peptides ( $M > 4\text{kDa}$ ) en utilisant des techniques employant la dissociation induite par des électrons (ex : ETD) ou par des radicaux (MALDI-ISD). Tandis que les techniques d'ETD et d'ECD permettent la sélection de l'ion en phase gazeuse avant sa fragmentation, ce qui est un avantage certains lors d'analyse de mélanges, l'ISD ne permet malheureusement pas cette sélection. En effet, étant donné que la fragmentation s'effectue en source, il n'y a aucun moyen d'isoler les espèces avant le processus de fragmentation. Cependant, et contrairement aux expériences d'ETD/ECD, les spectres MALDI-ISD sont composés uniquement d'ion monochargés, ce qui rend la lecture du spectre, et donc le séquençage, beaucoup plus facile et efficace. A titre d'illustration, la **Figure 6** montre le spectre de fragmentation MALDI-ISD de la toxine TA2 réduite ( $M=6593.1\text{Da}$ , 4 ponts disulfures à l'état natif, 60 acides aminés) extraite du venin du mamba vert *Dendroaspis angusticeps*. La matrice MALDI utilisée dans cette expérience est le 1,5-diaminonaphtalène ; décrite comme très efficace pour libérer des radicaux hydrogène lors du processus MALDI et ainsi induire des fragmentations ISD (Demeure *et al.*, 2007; Fukuyama *et al.*, 2006). Le spectre montre une très large série d'ion c (de  $c_9$  to  $c_{58}$ ), permettant l'assignement de 49 acides aminés sur les 60 de la toxine. Dans ce type d'expérience, et en simplifiant quelque peu, il est possible de séquencer aisément la toxine en mesurant l'écart de masse observé entre deux fragments consécutifs et d'identifier le résidu d'acide aminé correspondant. Par exemple, en mesurant la masse séparant les deux fragments noté  $c_{52}$  et  $c_{53}$ , on trouve 103 Da. Cette différence de masse correspond à un résidu cystéine, la cystéine en position 52 pour être précis. Nous pouvons ensuite continuer en mesurant la masse séparant les ions  $c_{53}$  et  $c_{54}$ . Dans ce cas, on relève une masse de 156 Da, correspondant à un résidu arginine, l'arginine 53. Il est possible de réitérer cette technique jusqu'à l'obtention d'un maximum de résidus juxtaposés. Dans ce cas précis, le spectre présenté permet la caractérisation de 49 acides aminés sur 60, soit une couverture de séquence de 81,7%.



**Figure 6.** Spectre MALDI-MS obtenu pour la toxine TA2 provenant du venin de *Dendroaspis angusticeps* [Spectromètre: Ultraflex II (Bruker Daltonics), matrice: 1,5-DAN, mode linéaire]. Le spectre montre une large série d'ions de type c qui permettent de caractériser 81,7% de la séquence de la toxine. La séquence complète de la toxine a été obtenue par une combinaison d'approches « bottom-up », « top-down » et de dégradation d'Edman.

Nous pouvons cependant remarquer que deux types d'ion c- manquent. Les premiers sont les ions  $c_{10}$ ,  $c_{30}$  et  $c_{41}$ . Ces ions sont absents du spectre car ils caractérisent un résidu de type de proline. En effet, le processus MALDI-MS crée des ions de type c- et z- par fragmentation de la liaison N-C $\alpha$ . Du fait de la nature cyclique du résidu proline, la rupture de cette liaison n'entraîne pas la dissociation du peptide en morceaux distincts, et ne conduit donc pas l'observation de l'ion c attendu. Cependant, étant donné le caractère généralisable de cette observation, un trou dans une série d'ion c- générée par MALDI-MS pourra être interprété comme indiquant la présence d'une proline à cette position, proline suivie d'un second acide aminé qui pourra être identifié en retranchant la masse de la proline à la masse de l'écart observé. Ainsi, si nous mesurons l'écart de masse entre les ions  $c_{40}$  et  $c_{42}$ , nous trouvons une masse de 200 Da, qui ne correspond à aucun acide aminé connu, et peut-être attribué à un « proline gap ». En retranchant la masse de la proline (97 Da) à celle du trou observé (200), nous obtenons alors 103 Da, caractérisant parfaitement un résidu cystéine vicinal. La cystéine en position 40, et la proline en position 41 ont alors été parfaitement identifiées.

Le second type d'ion c manquant sont ceux qui nous empêchent d'obtenir 100% de couverture de séquence, à savoir les ions  $c_1$  à  $c_8$ . Ces ions sont, en fait, masqué par la présence d'intenses agrégats de matrice présents dans les faibles rapports m/z. Le début de la séquence de la toxine semble alors inaccessible (MICYSHKTP). Cette limitation est due au fait que, comme nous l'avons vu précédemment, il est impossible d'isoler l'ion avant de le fragmenter en MALDI-MS. Les signaux de la matrice utilisée sont alors parfaitement visibles. Cependant, une technique hybride appelée « T<sup>3</sup>-sequencing » permet de dissoudre cette limitation (Raska *et al.*, 2002; Suckau and Resemann, 2003). Puisque les fragments MS sont fragmentés en source, ils peuvent être isolés et fragmentés en seconde dimension (MS/MS) par CID, comme n'importe quel autre peptide. Si l'ion sélectionné est un ion de type c, alors le spectre MS/MS obtenu caractérisera la partie N-terminale manquante de la toxine. De la même façon, il est possible de sélectionner puis de fragmenter un ion de type z afin d'élucider la partie C-terminale. Un exemple de cette stratégie d'analyse est illustré **Figure 7**. L'expérience a pour but de caractériser la séquence complète d'un mutant d'une toxine naturelle, nommé A $\alpha$ 1-K34A. La partie haute représente le spectre MALDI-MS obtenu pour le mutant. Comme prévu, une large séquence d'ion c est détectée et permet de séquencer 68% de la toxine, avec notamment une mise en évidence nette de la mutation en position en 71. Cependant, les extrémités C- et le N-terminus sont manquants. L'ion  $c_{24}$ , détecté à m/z 2498.1, a alors été isolé puis fragmenté. Le spectre MS/MS obtenu (spectre du bas) permet la caractérisation de la partie N-terminale du peptide. La sélection d'un ion de type z, permettrait quand à elle, la détermination de la partie C-terminale du peptide



**Figure 7.** Exemple d'une expérience "pseudo-MS<sup>3</sup>" appliquée à l'Adtx1-K34A (matrice: 2,5-DHB). Après réduction, la toxine est tout d'abord fragmentée dans la source par « In-source Decay ». Afin d'obtenir la séquence des 10 premiers acides aminés cachés par le signal intense de la matrice, un ion ISD est isolé puis fragmenté par CID. L'analyse du spectre MS/MS ainsi obtenu caractérise l'extrémité N-terminale ou C-terminale selon que l'ion précurseur était de type c- ou z-, respectivement.

## Conclusion

Les venins animaux font l'objet d'un intérêt croissant de la recherche et des industries pharmaceutiques du fait de leur possible utilisation en tant que nouveaux médicaments. Avec des quantités suffisantes de matériel, la dégradation d'Edman reste une méthode de séquençage fiable pour les toxines, tout en étant conscient que certaines toxines modifiées au niveau de l'extrémité N-terminale, ne seront totalement inertes au regard des réactifs d'Edman. Cependant, les coûts expérimentaux, le faible débit et les quantités importantes de toxines purifiées nécessaires sont des limitations sérieuses à l'application de cette technique à des projets de séquençage de grande envergure. C'est précisément le cas de la « vénomique » qui propose des échantillons complexes, contenant de faibles concentrations de nombreuses toxines. Dans ce contexte, les méthodes de séquençage par spectrométrie de masse offrent des solutions puissantes aux problématiques liées à l'obtention de novo de séquences de peptides.

Les récentes innovations au niveau de la sensibilité des instruments, de leur vitesse et de leur précision permettent d'envisager le remplacement de la dégradation d'Edman par le séquençage par spectrométrie de masse. Même si de nombreux efforts restent à effectuer pour envisager des séquençages totalement automatisés et fiables à haut débit, il n'est pas idiot de penser que dans un futur proche émergera un spectromètre tellement efficace qu'il permettra de séquencer de nombreux peptides à haut débit.

Dans ce contexte générale, un projet européen FP7 nommé « Venomics » a été imaginé puis financé \$\$\$. Le projet repose sur l'analyse, via des approches haut-débits, de la diversité moléculaire présente dans 200 venins différents dans le but de découvrir de nouvelles molécules candidats médicaments. Dans le projet, les résultats de transcriptomique (séquençage des ARN messagers présents dans les glandes à venins) seront confrontés aux résultats du séquençage de novo de toxines par spectrométrie de masse afin de caractériser les séquences de nombreuses toxines. Ces toxines seront alors synthétisées en grande quantité soit par des méthodes chimiques (synthèse peptidique sur phase solide), soit de biologie moléculaire (expression des toxines dans des organismes). Leur activité biologique sera alors recherchée sur une large gamme de récepteurs, notamment des récepteurs couplés aux protéine-G. Si un composé apparaît alors comme potentiellement intéressant pour le développement d'un nouveau médicament, le support d'une industrie pharmaceutique est également prévu.

[1] Schmidtko A. et al., Ziconotide for treatment of severe chronic pain, 2010, *Lancet.*, 375 (9725), 1-7.

[2] Smith C.G. and Vane J.R., The Discovery of Captopril, 2003, *FASEB J.*, 17(8), 788-789.

[3] Escoubas P. and King G.F., Venomics as a drug discovery platform, 2009, *Expert Rev. Proteomics*, 6(3), 221-224.

[4] <http://www.alphabiotoxine.be>

[5] Rouget C. et al., Identification of a novel snake peptide toxin displaying high affinity and antagonist behaviour for the  $\alpha_2$ -adrenoreceptors, 2010, *Br. J. Pharmacol.*, 161, 1361-1374.

[6] Kelleher N.L., Top-Down proteomics, 2004, *Anal. Chem.*, 76(11), 197A-203A.

[www.venomics.eu](http://www.venomics.eu)