

# Progrès récents dans la chimiotaxonomie des Scorpions

Phillipe Billiald\*, Geneviève Motta\*\* & Max Goyffon\*

\* LERAI, Museum National d'Histoire naturelle et CRSSA, 57 rue Cuvier, 75231 Paris Cédex 05. FRANCE.

\*\* Université d'Orléans et CNRS, 1 rue Haute, 45071 Orléans Cédex 2. FRANCE.

## Résumé:

Des anticorps monoclonaux dirigés contre diverses sous-unités de l'hémocyanine du scorpion Buthidé paléotropical Androctonus australis ont été préparés. Leurs réactivités croisées ont été testées avec les hémocyanines d'une dizaine d'espèces de scorpions appartenant à divers genres de Buthidés paléotropicaux ou néotropicaux.

Ces anticorps reconnaissent des sous-unités appartenant à un nombre limité d'hémocyanines d'origines différentes. Ils constituent des groupes phylogénétiques qui n'avaient pas été détectés par les méthodes biochimiques et immunochimiques précédemment utilisées. Ils valident des hypothèses qui reposaient exclusivement sur des caractères morphologiques externes des animaux. Ce travail clarifie ainsi la systématique de l'importante famille des Buthidés.

## Abstract:

Monoclonal antibodies were prepared against various hemocyanin subunits of the paleotropical scorpion Androctonus australis (Buthidae). Their cross-reactivities were tested with the hemocyanins of ten species of scorpions belonging to several genus of paleotropical or neotropical Buthidae.

These antibodies are capable of binding to subunits belonging to a limited number of hemocyanins from various origins. They make up evolutionary groups which could not be put into evidence by the biochemical and immunological methods previously used. They embody hypothesis which were exclusively predicated upon external morphological characters of animals. Consequently this study clarifies the systematics of the large family of Buthidae.

Les Scorpions forment un ordre très homogène, constitué d'un nombre d'espèces relativement restreint (environ un millier) réparties en sept familles: les Buthidés, les Scorpionidés, les Chactidés, les Bothriuridés, les Chaerilidés, les Diplocentridés, les Vaejovidés. La famille des Buthidés est la plus importante numériquement. Elle compte près de la moitié des espèces et ses caractéristiques l'opposent aux autres familles au point que certains auteurs distinguent deux sous-ordres, l'un comprenant exclusivement les Buthidés, l'autre les six familles restantes.

Les études chimiotaxonomiques concernent essentiellement les Buthidés. Elles reposent sur l'analyse des propriétés électrophorétiques et immunologiques de l'hémocyanine, cuproprotéine circulante de l'hémolymphe de scorpion, capable de fixer réversiblement l'oxygène (Goyffon et Lamy, 1973). Des anticorps monoclonaux dirigés contre l'hémocyanine du Buthidé Androctonus australis garzonii ont été produits récemment. Ce sont des sondes spécifiques d'un motif structural unique de

la molécule plus ou moins bien préservé au cours de l'évolution. L'étude des réactivités croisées des anticorps monoclonaux avec les hémocyanines de diverses espèces de Buthidés permet de préciser les résultats fragmentaires précédemment acquis au niveau de l'ordre, du genre ou de l'espèce.

## MATERIELS ET METHODES

### 1- SCORPIONS:

Tous les animaux sont des Buthidés, leurs origines sont rapportées dans le tableau 1.

Tableau 1: Origines et caractéristiques des scorpions Buthidés sélectionnés pour cette étude.

Genre	Espèce	Sous-espèce	Origine
<i>Androctonus</i>	<i>australis</i>	<i>garzonii</i>	Tunisie
<i>Androctonus</i>	<i>amoureuxi</i>		Algérie
<i>Androctonus</i>	<i>aeneas</i>		Tunisie
<i>Androctonus</i>	<i>crassicauda</i>		Arabie Saoudite
<i>Leiurus</i>	<i>quinquestriatus</i>		Arabie Saoudite
<i>Buthus</i>	<i>occitanus</i>	<i>tunetatus</i>	Tunisie
<i>Orthochirus</i>	<i>innesi</i>		Arabie Saoudite
<i>Buthotus</i>	<i>franzwernerii</i>	<i>gentili</i>	Maroc
<i>Parabuthus</i>	<i>liosoma</i>		Arabie Saoudite
<i>Centruroides</i>	<i>gracilis</i>		Colombie

### 2- HEMOCYANINES:

L'hémocyanine du scorpion *Androctonus australis garzonii* est une macroprotéine constituée de 24 sous-unités monomériques d'environ 75 kDa. Ces sous-unités appartiennent à 8 types de chaînes polypeptidiques dénommées Aa 2, 3A, 3B, 3C, 4, 5A, 5B et 6 en fonction de leur mobilité électrophorétique croissante. Les sous-unités Aa 3C et Aa 5B sont associées en un hétérodimère appelé sous-unité Aa 1. L'agencement des sous-unités dans la molécule entière et sa structure quaternaire sont parfaitement connus (Lamy et al., 1985).

Le prélèvement des hémolymphe des diverses espèces de scorpion et la préparation des hémocyanines ont préalablement été décrits (Billiald et al., 1989).

### 3- ANTICORPS MONOCLONAUX:

Tous les anticorps monoclonaux ont été produits après immunisation de souris avec des produits de l'hémolymphe d'*Androctonus australis* (hémolymphe brute

ou sous-unités d'hémocyanine purifiées). Le protocole détaillé de leur préparation et leurs caractéristiques ont été rapportés par Billiald et al., 1988 et Lamy et al., 1990. Les sept anticorps désignés 6032, L4, L26, L100, L101, L102, L104 ont été utilisés.

#### 4- IMMUNOTRANSFERTS:

Les hémocyanines de scorpion ont été soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5 p. cent. Cette électrophorèse autorise la séparation des produits de dissociation des hémocyanines. Après transfert sur une membrane d'Immobilon PVDF (Millipore Laboratories) les protéines ont été incubées avec chacun des anticorps monoclonaux étudiés. Les immunocomplexes ont été révélés par une réaction immuno-enzymatique utilisant des anticorps anti immunoglobulines de souris marqués par une peroxydase (DAKO code P161). Le protocole complet a précédemment été décrit (Billiald et al., 1989).

### RESULTATS

Les résultats obtenus avec l'anticorps L101 ont été rapportés par Billiald et al., 1989. Ils démontrent que l'activité d'un anticorps monoclonal dirigé contre une sous-unité d'hémocyanine d'Androctonus australis n'est retrouvée qu'avec un nombre limité d'hémocyanines d'espèces différentes (tableau 2). Ce travail préliminaire nous a amenés à évaluer les réactivités croisées de six autres anticorps dirigés contre les sous-unités Aa 2, Aa 3B ou Aa 6 avec l'intention de mettre à jour des différences de spécificité d'espèces entre les clones. Comme précédemment les diverses hémocyanines ont été soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide qui conduit à la séparation des sous-unités libres. Un immunotransfert avec chacun des anticorps a ensuite été pratiqué. A titre d'exemple la figure 1 montre l'électrophorogramme des hémocyanines dissociées de sept espèces de Buthidés après coloration des protéines au bleu de Coomassie ou immunotransfert avec l'anticorps L102.

On note sur cette figure une très grande sélectivité de l'anticorps L102 qui ne produit une coloration positive qu'avec la sous-unité 6 de l'espèce Androctonus australis. Avec les autres anticorps monoclonaux, les résultats sont rassemblés sous forme schématique dans le tableau 2. On y constate une grande sélectivité de la réponse variable avec l'anticorps. Ainsi, les immunoglobulines L4 et L26 dont la spécificité de sous-unité diffère reconnaissent des épitopes communs aux hémocyanines de tous les scorpions étudiés.

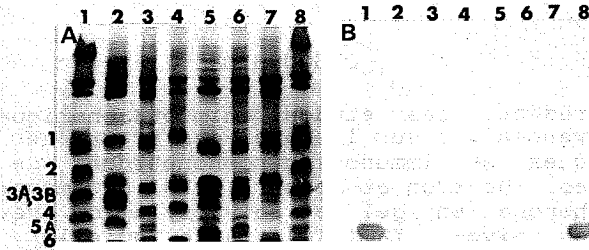


Figure 1: Electrophorèse en gel de polyacrylamide des hémocyanines dissociées de sept scorpions Buthidés après coloration au bleu de Coomassie (A) ou immunotransfert avec l'anticorps L102 (B)

Depot:

- 1) et 8) *Androctonus australis*    2) *Parabuthus liosoma*    3) *Buthus occitanus*  
 4) *Leiurus quinquestriatus*    5) *Androctonus crassicauda*    6) *Androctonus amoreuxi*  
 7) *Androctonus aeneas*

Anticorps	I	L4	L26	6032	L104	L101	L100	L102
Spécificité <u>Aa</u>	I	3B	6	2	6	6	6	6
Hémocyanine de:	I							
<i>Androctonus australis</i>	I	+	+	+	+	+	+	+
<i>Androctonus aeneas</i>	I	+	+	+	+	+	-	-
<i>Androctonus amoreuxi</i>	I	+	+	+	+	+	-	-
<i>Androctonus crassicauda</i>	I	+	+	+	+	+	-	-
<i>Leiurus quinquestriatus</i>	I	+	+	+	+	+	+	-
<i>Buthus occitanus</i>	I	+	+	+	+	+	-	-
<i>Orthochirus innesi</i>	I	+	+	+	+	+	+	-
<i>Buthotus franzwernerii</i>	I	+	+	+	+	-	-	-
<i>Parabuthus liosoma</i>	I	+	+	-	-	-	-	-
<i>Centruroides gracilis</i>	I	+	+	-	-	-	-	-

Tableau 2: Réactivités croisées en immunoblotting de 7 anticorps monoclonaux sur les hémocyanines de 10 espèces de scorpions.

A l'autre extrémité du tableau, l'épitope reconnu par l'anticorps L102 est présent sur la sous-unité 6 de l'espèce *Androctonus australis* uniquement. Entre ces deux extrêmes, l'épitope 6032 de la sous-unité Aa 2 et l'épitope L104 de la sous-unité Aa 6 sont détectés dans tous les genres à l'exception de *Parabuthus* et *Centruroides*. Le clone L101 se comporte de la même façon que les anticorps précédents à ceci près que son épitope est absent de l'espèce marocaine *Buthotus franzwernerii*. Enfin, outre son activité sur la sous-unité Aa 6, l'anticorps L100 réagit avec des épitopes localisés sur une sous-unité des hémocyanines

d'Orthochirus innesi et de Leiurus quinquestriatus sans reconnaître aucune des sous-unités des autres hémocyanines du genre Androctonus.

## DISCUSSION

Jusqu'à présent, les études chimiotaxonomiques des scorpions reposaient sur l'examen des propriétés électrophorétiques et immunoélectrophorétiques de leurs hémocyanines. Goyffon et Kovoov (1978) ont montré que l'électrophorèse en gel de polyacrylamide revêt un intérêt au niveau familial parce qu'elle révèle l'existence d'une bande de faible mobilité spécifique des hémocyanines dissociées de Buthidés. Cependant, ces travaux ne suffisent pas à établir la nature et la correspondance des protéines homologues. Ils doivent être complétés par des analyses immunologiques. En utilisant des antiserum polyclonaux, Lamy (1985) a établi des homologues antigéniques entre des sous-unités d'hémocyanines de diverses espèces qui diffèrent par leur mobilité électrophorétique. Ces travaux permettent une diagnose au niveau du subphylum, mais ils sont trop fragmentaires pour avoir une valeur précise au niveau de l'ordre, de la famille ou du genre. Une raison à cela est un manque de spécificité des antisérums utilisés qui, par définition, sont constitués d'une population hétérogène d'anticorps. En préparant des anticorps monoclonaux, nous avons isolé au sein de cette population hétérogène d'anticorps des sondes spécifiques d'un motif structural unique, capables de détecter la présence d'un épitope prédéterminé sur des antigènes différents. Ces sondes sont très sélectives. Toutes reconnaissent des épitopes communs à un nombre limité d'hémocyanines d'espèces différentes. Elles constituent des groupes évolutifs.

Ainsi, la réponse aux anticorps anti-sous-unités Aa 2 (6032) et anti-sous-unité Aa 6 (L104) confirme l'intérêt de caractères morphologiques difficiles à établir, comme la disposition des trichobotries dorsales des bras des Buthidés. Parabuthus et Centruroides sont les seuls Buthidés étudiés dont les trichobotries dorsales des bras sont dans une orientation  $\alpha$  selon les observations de Vachon. Cette corrélation des caractères immunochimiques et morphologiques autorise la distinction de deux sous-ensembles au sein de la famille des Buthidés qui pourraient être élevés au rang de sous-famille (Goyffon et al., en préparation).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux soulève également de nouvelles questions. L'anticorps L100 qui reconnaît un épitope commun aux hémocyanines d'Androctonus australis, de Leiurus quinquestriatus et d'Orthochirus innesi ne réagit avec aucune autre hémocyanine du genre Androctonus. Cette apparente parenté de l'hémocyanine d'Androctonus australis plus proche des genres Leiurus

et Orthochirus que des autres scorpions du genre Androctonus illustre la difficulté du choix des critères morphologiques dans la définition du genre. Ces résultats encore préliminaires devraient conduire les systématiciens à compléter les examens morphologiques par des études chimiotaxonomiques pour la notion de genre. La préparation d'un plus grand nombre d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'hémocyanine d'Androctonus australis, mais aussi contre d'autres espèces de Buthidés devrait y contribuer. Enfin, l'étude des séquences nucléotidiques des gènes codant pour l'hémocyanine pourrait, à l'avenir, revêtir un grand intérêt, comme cela a préalablement été démontré chez les Vertébrés (O'Brien et al., 1985). Elle compléterait les données immunologiques qui ne prennent une réelle signification que lorsqu'elles trouvent d'autres éléments qui corroborent les conclusions auxquelles elles conduisent.

Remerciements: Nous sommes très reconnaissants à Madame M.C. Gonzales (CNRS, Orléans) et Monsieur M. Mercier-Balaz (Muséum, Paris) pour l'excellente aide qu'ils nous ont apportée dans la réalisation de cette étude.

#### REFERENCES

- Billiard P., Lamy J., Taveau J.C., Motta G., Lamy J., 1988. - Mapping of six epitopes on haemocyanin subunit Aa 6 by immunoelectron microscopy. *Eur. J. Biochem.*, 175, 423-431.
- Billiard P., Lamy J.N., Motta G., Goyffon M., 1989. - Cross-reactivity of a monoclonal antibody to the haemocyanin of various scorpion species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 93B, 67-71.
- Goyffon M., Lamy J.N., 1973. - Une nouvelle sous-espèce d'Androctonus australis L. (Scorpion Buthidae): Androctonus australis garzanoi N. SSP. Caractéristiques morphologiques, écologiques et biochimiques. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 98, 137-144.
- Goyffon M., Kovoov J., 1978. - Chactoid venoms in Bettini S. Ed, Handbook of Experimental Pharmacology, 48, Springer-Verlag, Berlin, pp 395-417.
- Lamy J., 1985. - Electrophorèse et immunochimie: Un outillage de précision pour la taxonomie, in Goyffon M., d'Hondt J.L. Eds. Electrophorèse et taxonomie, Mémoire Soc. Zool. Fr., 42, pp 41-72.

Lamy J., Lamy J., Billiard P., Sizaret P.Y., Cavé G., Frank J., Motta G., 1985. - Approach to the direct intramolecular localization of antigenic determinants in *Androctonus australis* hemocyanin with monoclonal antibodies by molecular immunoelectron microscopy. *Biochemistry*, 24, 5532-5542.

Lamy J., Billiard P., Taveau J.C., Boisset N., Motta G., Lamy J.N., 1990. - Topological mapping of 13 epitopes on a subunit of *Androctonus australis* hemocyanin. *J. Struct. Biol.*, 103, 64-74.

O'Brien S.J., Nash W.G., Wildt D.E., Bush M.E., Benveniste R.E., 1985. - A molecular solution to the riddle of the giant panda's phylogeny. *Nature*, 317, 140-144.

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 Buthidae Simon. *C. R. Acad. Sci. Paris Série D*, 281, 1597-1599.

---