

Modes d'action moléculaire des neurotoxines botuliques et tétanique

Florence Deloye
Giampietro Schiavo
Frédéric Doussau
Ornella Rossetto
Cesare Montecucco
Bernard Poulain

Les neurotoxines tétanique (TeNT) et botuliques (BoNT) sont responsables de deux maladies sévères : le tétanos et le botulisme. La TeNT bloque la libération de GABA et de glycine dans le système nerveux central alors que les BoNT agissent en périphérie en inhibant la libération d'acétylcholine. Elles sont composées de deux chaînes : la chaîne lourde est impliquée dans la liaison spécifique des toxines à des récepteurs neuronaux et dans la translocation de la chaîne légère dans le cytoplasme ; la chaîne légère est seule responsable de l'inhibition intracellulaire de la libération des neurotransmetteurs. La chaîne légère est une endopeptidase à zinc qui attaque spécifiquement trois protéines synaptiques impliquées dans l'exocytose des neurotransmetteurs. La TeNT et quatre sérotypes de BoNT (B, D, F et G) hydrolysent la VAMP/synaptobrevine, une protéine intégrale de la membrane des vésicules synaptiques. La BoNT/A et la BoNT/E attaquent SNAP25, une protéine associée au plasmalemme. Enfin, la BoNT/C hydrolyse la HPC1/syntaxine, une protéine intégrale de la membrane plasmique qui est associée aux canaux calciques impliqués dans la libération des neurotransmetteurs.

ADRESSE

F. Deloye, F. Doussau : *étudiants de troisième cycle, neurosciences, Paris-VI*. B. Poulain : *chargé de recherche au Cnrs*. Laboratoire de neurobiologie cellulaire, UPR-Cnrs 9009, centre de neurochimie, 5, rue Blaise-Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, France.
O. Rossetto : *chercheur postdoctoral*. G. Schiavo : *chargé de recherche*. C. Montecucco : *professeur de pathologie générale*. Centro CNR biomembrane and dipartimento di scienze biomediche, università di padova, via Trieste 75, 35121 Padova, Italie.

De nombreuses bactéries sont une menace pour l'homme par la production de toxines variées (diphthérique, cholérique, pertussique, clostridiales-tétanique et botuliques...). Malgré les programmes de vaccination, leurs victimes se comptent encore par millions. Elles sont au rang des premières causes de mortalité dans le monde. Pour la plupart des toxines, le mode d'action a été élucidé au niveau moléculaire [1]. Elles exploitent des stratégies variées qui affectent la

viabilité des cellules, soit par une action dirigée contre l'intégrité de la membrane plasmique, soit par une action intracellulaire. Le mode d'action moléculaire des neurotoxines clostridiales botuliques et tétanique a été récemment élucidé : elles réalisent l'attaque protéolytique de protéines impliquées dans l'exocytose. Le propos de cette synthèse est de faire le point sur les mécanismes moléculaires mis en œuvre par les neurotoxines clostridiales en relation avec les deux maladies neuromusculaires dramatiques qu'elles induisent,

le botulisme et le tétanos. Il ne s'agit pas d'une revue exhaustive; aussi, pour plus de détails, le lecteur est souvent renvoyé à des revues récentes.

Les neurotoxines clostridiales induisent des maladies distinctes

Le tétanos et le botulisme sont des paralysies sévères, souvent mortelles, qui présentent des symptômes très différents. Pour simplifier, le botulisme est caractérisé par une paralysie flasque de la musculature squelettique qui présente une analogie avec l'intoxication par le curare, alors que le tétanos est caractérisé par une paralysie spasmodico-tonique d'origine centrale ayant une forte analogie avec celle provoquée par la strychnine. Ces maladies sont provoquées par des toxines bactériennes qui affectent, *in vivo*, exclusivement le système nerveux. Les neurotoxines tétanique (un seul sérotype connu: TeNT) et botuliques (BoNT, sept sérotypes, de A à G) sont des protéines (≈ 150 kDa), sécrétées par des bactéries anaérobies du genre *Clostridium*: *C. tetani* et *C. botulinum*. La dose létale est de l'ordre de 0,1 ng/kg ce qui en fait les plus puissantes toxines connues. Certains sérotypes de BoNT sont aussi sécrétés par d'autres *Clostridia* [2]. Par exemple, la BoNT de type E peut être sécrétée par une souche de *C. butyricum*. Les protéines associées à ces neurotoxines et les autres toxines sécrétées par *C. botulinum* ou *C. tetani* (toxine C2, exoenzyme C3, tétanolysine, botulinolysines, hémagglutinines...) ne semblent pas concourir au développement de ces maladies. Le botulisme [3] est dû à une inhibition persistante de la transmission synaptique cholinergique au niveau des terminaisons motrices qui innervent la musculature squelettique (*figure 1*). Dans les formes sévères, le système nerveux autonome est aussi affecté. Cette maladie reste rare et est souvent non détectée. En France, l'occurrence annuelle serait d'environ soixante-dix cas d'origine alimentaire, dont seuls quelques-uns mèneraient à une hospitalisation [4]. La forme majeure est due à l'ingestion de nourriture contaminée (conserves...). Une autre forme est

due au développement de *C. botulinum* dans le tube digestif (botulisme néonatal); elle pourrait être impliquée dans la mort subite des nourrissons [3].

Le tétanos présente une situation plus compliquée [3]. En effet, la TeNT est sécrétée en périphérie par *C. tetani*, dans des blessures nécrotiques, et a son site d'action dans le système nerveux central (*figure 1*). La TeNT, qui ne peut pas franchir la barrière hémato-encéphalique, entre dans les terminaisons nerveuses motrices sans affecter la libération d'acétylcholine. Elle gagne le système nerveux central par son transport axonal rétrograde vers les corps cellulaires des motoneurons [5]. La TeNT est alors libérée dans le milieu interstitiel de la moelle épinière. Elle bloque préférentiellement la transmission synaptique GABAergique ou glycinergique entre des interneurons inhibiteurs (cellules de Renshaw) et les motoneurons. Il en résulte un syndrome de désinhibition qui conduit à une activité de décharge dérégulée des motoneurons. Leur hyperactivité se traduit en périphérie par des spasmes musculaires plus ou moins généralisés qui mettent en jeu simultanément des couples de muscles antagonistes. Le degré de sévérité du tétanos varie avec la diffusion de la TeNT autour de la plaie infectée. Suivant qu'elle est locale ou générale (pore veineux), la TeNT peut affecter une aire limitée de la moelle épinière (tétanos local, limité à un membre par exemple) ou avoir une action généralisée. En effet, par une série de transcytoses successives, la TeNT peut gagner des régions variées du système nerveux central. Cette dernière propriété a été mise à profit en anatomie pour déterminer le trajet de voies neuronales, même multirelayées, en suivant le transport de la TeNT. Malgré les programmes de vaccination, le tétanos reste parmi les dix premières causes de mortalité dans le monde (environ 1 million de morts par an dans les pays du tiers monde, dont 450 000 enfants par tétanos néonatal dû à l'infection du cordon ombilical (*m/s n° 4, vol. 10, p. 470*) [6]). Dans la communauté européenne, il y aurait de l'ordre de 500 à 1 000 morts par an.

RÉFÉRENCES

1. Menestrina G, Schiavo G, Montecucco C. Molecular mechanisms of action of bacterial protein toxins. *Mol Asp Med* 1994; 15: 81-193.
2. Popoff MR. Ecology of neurotoxicogenic strains of Clostridia. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 195: 1-29.
3. Simpson LL. *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. San Diego: Academic Press, 1989.
4. Roblot P, Roblot F, Fauchère JL, Devilleger A, Maréchaud R, Breux JP, Grollier G, Becq-Giraudon B. Retrospective study of 108 cases of botulism in Poitiers, France. *J Med Microbiol* 1994; 40: 79-384.
5. Halpern JE, Neale EA. Neurospecific binding, internalization and retrograde transport. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 195: 221-41.
6. Whiteman C, Belgahrdi L, Gasse F, Toei C, Mattei V, Zoffmann H. Progress to world global elimination of neonatal tetanus. *World Health Statist Quart* 1992; 45: 248-56.
7. Van der Kloot W, Molgó J. Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiol Rev* 1994; 74: 899-991.
8. Südhof TC, DeCamilli P, Niemann H, Jahn R. Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins. *Cell* 1993; 75: 1-4.
9. Molgó J, Comella X, Angaut-Petit D, Pécot-Dechavassine M, Tabti N, Faille L, Mallart A, Thesleff S. Presynaptic actions of botulinum neurotoxins at vertebrate neuromuscular junctions. *J Physiol (Paris)* 1990; 84: 152-66.
10. Poulain B, Molgó J, Thesleff S. Quantal neurotransmitter release and the clostridial neurotoxin's targets. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 195: 243-55.
11. Diaz J, Molgó J, Pécot-Dechavassine M. Sprouting of frog motor nerve terminals after long-term paralysis by botulinum type A toxin. *Neurosci Lett* 1989; 96: 127-32.

RÉFÉRENCES

12. Soulayrol S, Caperan A, Penot-Ragon C, Beaulieu JP, Gastaut JL. Traitement par injections locales de toxine botulique en neurologie. *Presse Med* 1993; 22: 957-63.
13. Jankovic J, Hallett H. *Therapy with botulinum toxin*. New York: Marcel Dekker, Inc, 1994.
14. Habermann E, Dreyer F. Clostridial neurotoxins: handling and actions at the cellular and molecular level. *Curr Top Microbiol Immunol* 1986; 129: 93-176.
15. Niemann H. Molecular biology of clostridial neurotoxins. In: Alouf JE, Freer JH, ed. *Sourcebook of bacterial protein toxins*. San Diego: Academic Press, 1991: 303-48.
16. Penner R, Neher E, Dreyer F. Intracellularly injected tetanus toxin inhibits exocytosis in bovine adrenal chromaffin cells. *Nature* 1986; 324: 76-8.
17. Poulain B, Mochida S, Weller U, Högy B, Habermann E, Wadsworth JDF, Dolly JO, Shone CC, Tauc L. Heterologous combinations of heavy and light chains from botulinum neurotoxin A and tetanus toxin inhibit neuro-transmitter release in Aplysia. *J Biol Chem* 1991; 266: 9580-5.
18. Minton N. Molecular genetics of clostridial neurotoxins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 195: 161-94.
19. Poulain B. Mécanisme d'action moléculaire de la toxine tétanique et des neurotoxines botuliques. *Pathol Biol* 1994; 42: 173-82.
20. Dolly JO, DePaiva A, Foran P, Lawrence G, Daniels-Holgater P, Ashton AC. Probing the process of transmitter release with botulinum and tetanus neurotoxins. *Semin Neurosci* 1994; 6: 149-58.
21. Montecucco C, Papini E, Schiavo G. Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Lett* 1994; 346: 92-8.

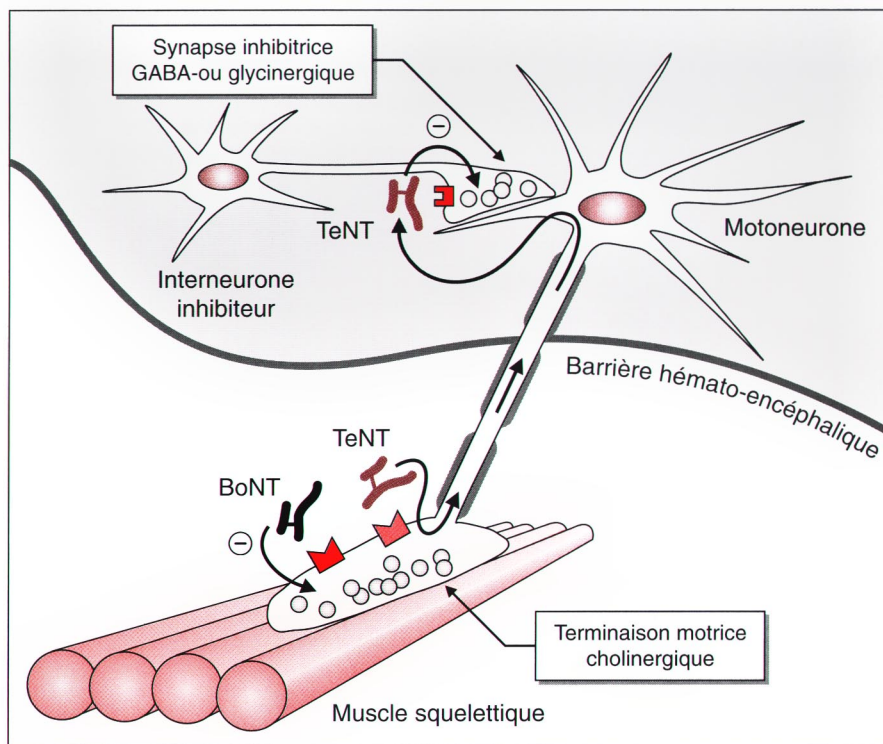


Figure 1. **Des neurones différents sont les cibles des neurotoxines botuliques et de la neurotoxine tétanique.** Les BoNT agissent préférentiellement sur les terminaisons cholinergiques motrices qui innervent la musculature squelettique. La TeNT est capturée en périphérie par les motoneurones. Elle gagne le système nerveux central (zone grisée) par transport axonal rétrograde axonal. Après sa libération dans le milieu interstitiel, la TeNT bloque préférentiellement la libération de GABA ou de glycine par les interneurons inhibiteurs qui régulent l'activité des motoneurones.

Action présynaptique des neurotoxines clostridiales

Lors de la transmission synaptique, la dépolarisation de la terminaison nerveuse par l'arrivée d'un potentiel d'action active des canaux calciques. L'entrée d'ions Ca^{2+} dans la terminaison déclenche la libération par exocytose du neurotransmetteur contenu dans les vésicules synaptiques [7, 8]. De nombreuses études ont montré que la TeNT et les diverses BoNT n'affectent ni les canaux ioniques présynaptiques ni les récepteurs postsynaptiques. Le blocage de la transmission synaptique par ces toxines est uniquement dû à l'inhibition de la libération des neurotransmetteurs. Cependant, ces neurotoxines n'agissent pas sur toutes les formes de libé-

ration [9, 10]. Elles bloquent la libération quantique des neurotransmetteurs, évoquée et spontanée, qui est due à l'exocytose du contenu des vésicules synaptiques. Elles n'affectent cependant ni la libération non quantique due à des transporteurs membranaires ni les événements quantiques géants indépendants de l'entrée de calcium.

Les caractéristiques temporelles de la récupération de l'action des BoNT ont été étudiées, soit chez la grenouille qui peut survivre longtemps à de fortes doses de ces toxines grâce à sa respiration cutanée, soit chez des mammifères par des injections locales de doses sub-létales. L'inhibition de la libération d'acétylcholine dure de quelques semaines à quelques mois selon les sérotypes [9]. Dans les formes sévères, la récupération fonctionnelle des synapses

RÉFÉRENCES

22. Montecucco C, Schiavo G. Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Quart Rev Biophys* 1995; in press.
23. Carillo S, Pariat M, Jariel-Encontre I, Steff A, Piechaczyk M. Le catabolisme protéique intracellulaire: une fonction biologique majeure. Partie I: Les mécanismes de dégradation. *médecine/sciences* 1995; 11: 723-34.
24. Schiavo G, Poulain B, Rossetto O, Benfenati F, Tauc L, Montecucco C. Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release depends on zinc. *EMBO J* 1992; 11: 3577-83.
25. Niemann H, Blasi J, Jahn R. Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 179-85.
26. Volkandt W. The synaptic vesicle and its targets. *Neuroscience* 1995; 64: 277-300.
27. Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Lauro P, DasGupta BR, Montecucco C. Tetanus toxin and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 1992; 359: 832-5.
28. Patarnello T, Bargelloni L, Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C. Neurotransmission and secretion. *Nature* 1993; 364: 581-2.
29. Poulain B, Rossetto O, Deloye F, Schiavo G, Tauc L, Montecucco C. Antibodies against rat-brain vesicle associated membrane protein (synaptobrevin) prevent inhibition of acetylcholine release by tetanus or botulinum neurotoxin type B. *J Neurochem* 1993; 61: 1175-8.
30. Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C, Poulain B, Deloye F, Lozzi L, Shone CC. SNARE motif recognized by neurotoxins. *Nature* 1994; 372: 415-6.
31. Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hata Y, Südhof TC, Niemann H. Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J* 1994; 13: 5051-61.
- empoisonnées nécessite une réinnervation par bourgeonnement de la terminaison nerveuse, soit au niveau de l'ancienne terminaison, soit à partir d'un nœud de Ranvier proche [11]. Cette étape est caractérisée par la forte augmentation de fréquence des quanta « géants » insensibles au calcium et aux BoNT [9, 10].
- A la suite des travaux d'Alan Scott au début des années 1980, aux USA, l'action de longue durée des BoNT et leur sélectivité pour la transmission cholinergique ont été utilisées pour relâcher des spasmes et contractures musculaires dus à l'hyperactivité de certains motoneurons (hyperactivité d'origine centrale ou périphérique). L'injection locale de certains sérotypes de BoNT (A principalement) constitue donc un traitement symptomatique non douloureux utilisé pour pallier divers troubles comme le strabisme, le blépharospasme et l'hémispasme facial ainsi que diverses dystonies focales (torticolis spasmodique, dystonie oromandibulaire, crampe de l'écrivain...) [12, 13]. Cependant, à cause de la réversibilité de l'action de ces toxines avec le temps, ce traitement est transitoire et doit être renouvelé. La distinction majeure entre la TeNT et les BoNT est qu'elles affectent des neurones différents. A faible concentration, les BoNT bloquent exclusivement la libération de l'acétylcholine alors que la TeNT bloque préférentiellement la libération de transmetteurs non cholinergiques (glycine, GABA...). Cependant, cette sélectivité n'est pas totale et, à forte dose, ces toxines peuvent bloquer la libération d'autres neurotransmetteurs (noradrénaline, glutamate, peptides...). Dans des conditions expérimentales, à une forte concentration, la TeNT peut induire un « botulisme » local en bloquant la libération d'acétylcholine en périphérie. La TeNT et les BoNT peuvent affecter d'autres cellules comme les cellules chromaffines [3, 14, 15]. Différentes expériences d'injection intracellulaire des neurotoxines clostridiales ont montré qu'une fois appliquées à l'intérieur des neurones elles perdent toute sélectivité d'action en bloquant indifféremment la libération d'acétylcholine ou de monoamines [16, 17]. Il en a été déduit que la cible de ces toxines est impliquée dans l'exocytose des neurotransmetteurs et qu'elle est présente dans différents types de neurones et de cellules endocrines. Leur action sélective d'un type neuronal donné est donc liée aux étapes membranaires de leur mécanisme d'action (liaison à des récepteurs différents) et à un ciblage intracellulaire différent.

Rôles des chaînes des neurotoxines clostridiales

Au mécanisme d'action similaire de la TeNT et des diverses BoNT correspond une organisation structurale commune. Ces neurotoxines possèdent toutes des séquences apparentées [15, 18]. Toutes possèdent une chaîne légère d'environ 400 acides aminés liée par un pont disulfure à une chaîne lourde d'environ 800 acides aminés [15]. Le mode d'action cellulaire des BoNT et de la TeNT suit quatre grandes étapes (figure 2) à l'instar de plusieurs autres toxines bactériennes binaires: (1) liaison à la membrane neuronale; (2) internalisation par endocytose; (3) transfert de la fraction active de la toxine du compartiment endosomal vers le cytosol et, enfin, (4) action sur une cible intracellulaire. Les trois premières étapes sont évoquées brièvement dans les lignes qui suivent. Le lecteur est invité à consulter les revues [1, 3, 15, 19-22] pour plus de détails.

L'étape de liaison à la membrane est assurée par la chaîne lourde des toxines et implique des récepteurs localisés sur les régions amyéliniques des neurones (figure 1). Schématiquement, la liaison impliquerait des gangliosides et des protéines. Les gangliosides permettraient par leurs charges négatives une première liaison des toxines à la membrane; les récepteurs proprement dits sont des protéines non encore identifiées. Pour tenir compte des aspects contradictoires rapportés dans la littérature, il faut probablement distinguer la liaison membranaire à très forte affinité des neurotoxines clostridiales sur les terminaisons des motoneurons de celle qui a lieu dans le système nerveux central pour la TeNT. En effet, lors de l'intoxication par ces neurotoxines, la concentration de toxine circulante en périphérie est très faible (~ femto à pico-molaire);

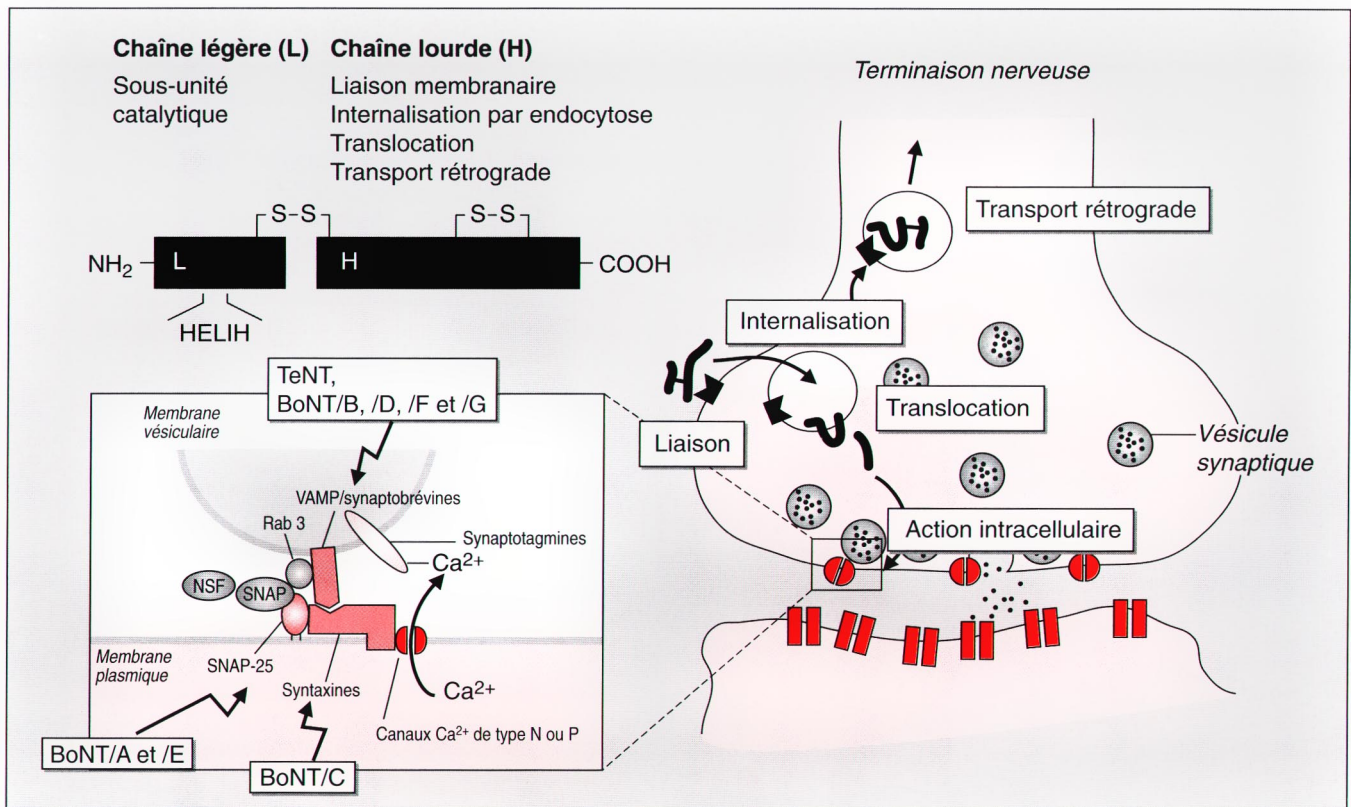


Figure 2. **Rôle des chaînes des neurotoxines clostridiales.** La chaîne lourde (H) assure les étapes de liaison membranaire, internalisation par endocytose et de translocation de la chaîne légère du compartiment endosomal vers le cytosol. La chaîne légère (L) est une endopeptidase caractérisée par le motif de liaison du zinc HELIH (His-Glu-Leu-Ileu-His). Selon le sérotype de neurotoxine, leur cible unique est la VAMP/synaptobrévine, HPC1/syntaxine ou SNAP-25. Ces trois protéines forment avec les SNAP (soluble NFS attachment proteins) et les NSF (N-ethylmaleimide-sensitve fusion) un complexe impliqué dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique.

la capture des toxines par les terminaisons des motoneurones implique des récepteurs à forte affinité ($K_m < 0,1$ nM). Dans ce cas, la liaison membranaire des toxines serait assurée par la partie C-terminale de la chaîne lourde puisque la délétion de cette partie détoxifie la TeNT et les BoNT. Dans le système nerveux central, lors du processus de transcytose, la TeNT libérée dans le milieu interstitiel de la moelle épinière pourrait atteindre des concentrations plus fortes (nano-molaires). Dans ce cas, la présence de la partie C-terminale de la chaîne lourde ne serait pas nécessaire. Ainsi qu'il a été mentionné plus haut, l'identité des accepteurs membranaires impliqués dans la capture neuronale des toxines n'est pas encore connue. Cependant, le spectre d'action différent de ces toxines est dû à l'existence de récep-

teurs distincts pour la TeNT et les BoNT; pour preuve, une chimère constituée d'une chaîne lourde de type botulique et d'une chaîne légère tétanique affecte préférentiellement la libération d'acétylcholine alors que la chimère réciproque agit sélectivement sur les neurones non cholinergiques.

L'internalisation des neurotoxines *via* le compartiment endosomal est indiquée morphologiquement par la présence de toxines marquées dans des vésicules d'endocytose ou dans des structures endosomiques. L'étape suivante implique la translocation de la chaîne légère des neurotoxines à travers la membrane endosomique. Celle-ci dépend de l'établissement d'un gradient de pH entre la lumière de l'endosome (acide) et le cytosol [23]. En effet, l'action des neurotoxines clostridiales est

fortement inhibée par des agents (chloroquine, méthylamine, bafilomycine) qui empêchent l'acidification des endosomes. A pH acide, la moitié N-terminale de la chaîne lourde de la TeNT et des BoNT forme des pores cationiques dans des bicouches lipidiques. Cette découverte a suggéré que cette partie de toxine est impliquée dans la translocation de la chaîne légère. Cependant la faible conductance (~ 40 pS) des pores formés par la moitié N-terminale de la chaîne lourde n'est pas en faveur de l'implication de ces canaux transmembranaires dans le mécanisme de translocation.

La dernière étape implique seulement la chaîne légère. Son application intracellulaire par injection dans des neurones, par lipofection de terminaisons motrices ou par perméabilisation de cellules neuroendocrines,

RÉFÉRENCES

32. Rothman JE. Mechanism of intracellular protein transport. *Nature* 1994; 372: 55-63.

33. Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993; 362: 318-24.

34. Pécot-Dechavassine M, Molgó J, Thesleff S. Ultrastructure of botulinum type A poisoned frog motor nerve terminals after enhanced quantal transmitter release caused by carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone. *Neurosci Lett* 1991; 130: 5-8.

35. Hunt JH, Bommert K, Charlton MP, Kistner A, Habermann E, Augustine GJ, Betz H. A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion. *Neuron* 1994; 12: 1269-79.

36. Mellanby J, Beaumont MA, Thompson PA. The effect of lanthanum on nerve terminals in goldfish muscle after paralysis with tetanus toxin. *Neuroscience* 1988; 25: 1095-106.

37. Niemann H, Binz T, Grebenstein O, Kuzazono H, Kalkuhl A, Yamasaki S, Eisel U, Polhner J, Schneider G, Krivan V, Kozaki S, Mochida S, Tauc L, Poulain B. Dissecting the L chain of Clostridial neurotoxins. In: BR DasGupta (ed). *Botulinum and Tetanus Neurotoxins: Neurotransmission and Biochemical Aspects*, Plenum 1993; 361-76.

38. Ashton AC, Li Y, Doussau F, Weller U, Dougan G, Poulain B, Dolly JO. Tetanus toxin inhibits neuroexocytosis even when its Zn²⁺-dependent protease activity is removed. *J Biol Chem* 1995; 270: 31386-90.

39. Yamasaki S, Hu Y, Binz T, Kalkuhl A, Kuzazono H, Tamura T, Jahn R, Kandel ER, Niemann H. Synaptobrevin/vesicle-associated membrane protein (VAMP) of *Aplysia californica*: Structure and proteolysis by tetanus toxin and botulinum neurotoxins type D and F. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4688-92.

40. Facchiano F, Luini A. Tetanus toxin potentially stimulates tissue transglutaminase. A possible mechanism of neurotoxicity. *J Biol Chem* 1992; 267: 13267-71.

41. Facchiano F, Benfenati F, Valtorta F, Luini A. Covalent modification of synapsin I by a tetanus toxin-activated transglutaminase. *J Biol Chem* 1993; 268: 4588-91.

42. Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 1993; 259: 780-5.

a montré qu'elle est impliquée, seule, dans l'étape de blocage intracellulaire de la libération des neurotransmetteurs.

Pour résumer, les neurotoxines clostridiales sont des protéines modulaires à trois domaines fonctionnels où chacun des domaines assure une des principales étapes du processus d'intoxication. Cette structure fonctionnelle recouvre la structure dans l'espace à trois grands domaines qui a été proposée à partir de la comparaison des quelques données structurales disponibles sur les neurotoxines clostridiales à celles concernant d'autres toxines bactériennes [1, 21, 22].

La chaîne légère des neurotoxines clostridiales est une métallo-endopeptidase

La comparaison de la séquence des chaînes légères des neurotoxines clostridiales montre une région fortement conservée d'environ 20 acides aminés [24, 25] qui contient le motif de liaison du zinc HExxH* caractéristique des endopeptidases à zinc (figure 2). De fait, les neurotoxines clostridiales sont des métalloprotéines à zinc: un atome de zinc est lié à leur chaîne légère (Km ~ 50-150nM) [24]. La présence de ce zinc est nécessaire à leur activité intracellulaire. Comme dans d'autres endopeptidases à zinc, la coordination du métal est assurée par les deux histidines du motif HExxH et une molécule d'eau polarisée par le glutamate du même motif. L'identité des autres ligands est encore discutée. Ces résultats – ajoutés au fait que des inhibiteurs des métalloprotéases comme le phosphoramidon, le captopril ou le thiorphan, inhibent l'activité intracellulaire de ces toxines – ont permis d'établir que les neurotoxines clostridiales sont des endopeptidases à zinc (pour une discussion détaillée voir [22]).

* Où H = His, E = Glu et x = n'importe quel acide aminé.

Les neurotoxines clostridiales clivent des protéines essentielles au processus d'exocytose

L'identification des neurotoxines clostridiales comme des métalloprotéases qui bloquent le mécanisme d'exocytose impliquait que leur(s) cible(s) intracellulaire(s) fût(ssent) une (ou des) protéine(s) impliquée(s) dans ce processus. Le caractère quantique de la libération des neurotransmetteurs est dû à l'exocytose du contenu des vésicules synaptiques en réponse à une entrée de calcium dans le neurone [7, 8]. La membrane des vésicules présente diverses protéines [26] intégrales à la membrane (VAMP (*vesicle-associated membrane protein*)/synaptobrevine, synaptophysine, synaptotagmine) ou associées (synapsine, Rab3...) (*m/s n° 6-7, vol. 9, p. 802*). C'est donc tout naturellement que les protéines vésiculaires ont été examinées comme des substrats possibles pour les neurotoxines clostridiales (figure 2). La première cible identifiée a été la VAMP/synaptobrevine (figures 2 et 3). C'est une protéine intégrale de la membrane vésiculaire de 18-20 kDa, très conservée chez tous les eucaryotes. Elle est coupée sélectivement par la TeNT et la BoNT/B en un site spécifique: le pont Gln75-Phe76 de l'isoforme 2 de VAMP de rat (*m/s n° 10, vol. 8, p. 1128*) [27]. Chez le rat et le poulet, l'isoforme 1 de VAMP/synaptobrevine n'est pas clivable par ces deux toxines du fait d'une mutation ponctuelle Gln → Val au niveau du site de clivage [27, 28]. Cette mutation unique est à rapprocher de la résistance notoire du rat et du poulet à la TeNT par rapport à l'homme et la souris dont les deux isoformes de VAMP/synaptobrevine sont clivables par la TeNT et la BoNT/B. Le fait que des peptides dérivés du site de clivage de la VAMP/synaptobrevine ou que des anticorps anti-VAMP inhibent fortement l'effet de la TeNT ou de la BoNT/B sur la libération des neurotransmetteurs a indiqué que le blocage de la transmission synaptique par ces deux neurotoxines résultait du clivage de la VAMP et non d'autres protéines synaptiques [27, 29]. Très rapidement, les cibles des autres toxines clostridiales ont été identi-

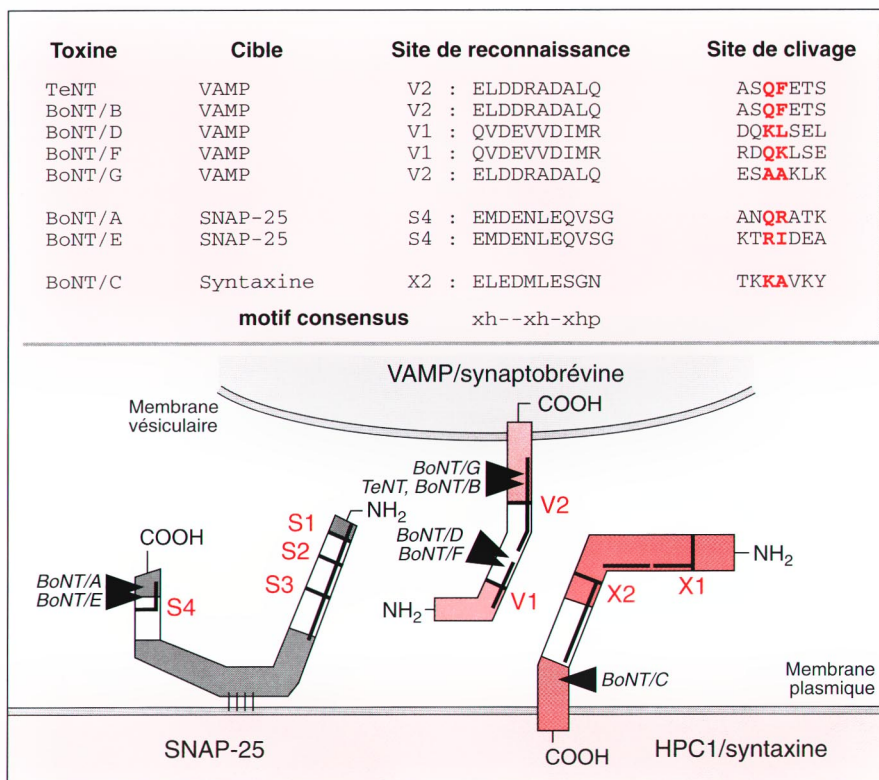


Figure 3. **Sites de reconnaissance et de clivage des cibles des neurotoxines clostridiales.** Excepté la TeNT et la BoNT/B qui attaquent la VAMP/synaptobrevine au même site, les neurotoxines clostridiales clivent leur cible en des sites distincts (triangles). La reconnaissance du substrat est assurée par l'existence d'un site de reconnaissance (identifié en rouge) situé en amont (N-terminal) du site de clivage [30]. Des motifs équivalents existent en plusieurs autres endroits des cibles. Les aires blanches correspondent aux domaines protéiques impliqués dans la formation d'un complexe ternaire comprenant la VAMP/synaptobrevine, SNAP-25 et HPC1/syntaxine; les régions de ces protéines susceptibles de former des hélices α impliquées dans des interactions protéine-protéine sont identifiées par un trait noir [31].

fiées (figures 2 et 3). La VAMP/synaptobrevine est attaquée aussi par les BoNT/D, /F et /G en des sites distincts de celui de la TeNT et de la BoNT/B. Ces mêmes toxines ainsi que la BoNT/B et la TeNT attaquent aussi la cellubrevine, une isoforme ubiquitaire des VAMP/synaptobrevines. Les BoNT/A et /E clivent spécifiquement, chacune en un site distinct, SNAP25 (*synaptosome associated protein*), une protéine de 25 kDa associée à la membrane plasmique (*m/s n° 6-7, vol. 9, p. 802*). Enfin, la BoNT/C coupe HPC1/syntaxine, une protéine intégrale à la membrane plasmique qui est associée aux canaux calciques impliqués dans la libération des neurotransmetteurs (*m/s n° 6-7, vol. 9, p. 802*). Le site de

clivage de HPC1/syntaxine est proche de son domaine d'ancrage dans la membrane plasmique. (Pour des revues récentes, voir [22] et [25].) Comme le clivage de ces protéines synaptiques est étroitement corrélé au blocage de la libération des neurotransmetteurs, il a été déduit que la VAMP/synaptobrevine, SNAP25 et HPC1/syntaxine jouent un rôle majeur dans le processus d'exocytose.

Reconnaissance des cibles des neurotoxines clostridiales

Les trois protéines synaptiques – VAMP/synaptobrevine, SNAP25 et

HPC1/syntaxine – sont les seuls substrats protéolytiques des neurotoxines clostridiales. La spécificité d'action de ces toxines n'est pas due au site de clivage qui diffère pour chaque sérotype (excepté pour la TeNT et la BoNT/B), mais résulte de la présence d'un site de reconnaissance sur chaque cible (figure 3). Ce déterminant, commun aux trois cibles, est toujours en position N-terminale par rapport au site de clivage (figure 3). L'incubation de diverses neurotoxines clostridiales avec des peptides mimant ce déterminant les détoxifie *in vitro* et *in vivo* [30]. Ces motifs doivent être présents pour que des substrats synthétiques dérivant des cibles des toxines soient clivables. La VAMP/synaptobrevine, HPC1/syntaxine et SNAP25 peuvent s'associer en un complexe ternaire résistant aux neurotoxines clostridiales [31]. Cette résistance aux toxines est probablement due à l'implication des motifs de reconnaissance dans des interactions entre ces trois protéines qui enroulent ces motifs au cœur du complexe.

Rôle des cibles des neurotoxines clostridiales dans la libération des neurotransmetteurs

Il existe une forte analogie entre le processus d'exocytose des neurotransmetteurs et les phénomènes impliqués dans les transports de protéines entre différents compartiments des cellules eucaryotes (par exemple fusion de vésicules issues du réticulum endoplasmique avec les citernes du *cis*-Golgi). De nombreuses protéines nécessaires aux étapes de fusion ont été identifiées. C'est le cas des NSF (*N-ethyl maleimide-sensitive fusion protein*) qui hydrolysent l'ATP et des SNAP, protéines associées aux NSF [32]. Les NSF et les SNAP ne sont pas spécifiques d'une fusion donnée. J. Rothman et ses collaborateurs ont fait l'hypothèse suivante (*m/s n° 6-7, vol. 9, p. 802*): la spécificité de la fusion d'une vésicule issue d'un compartiment donneur (*trans*-Golgi par exemple) avec un compartiment accepteur (membrane plasmique par exemple) serait due à l'appariement correct des récepteurs des SNAP (appelés SNARE pour

SNAP receptors), le SNARE issu du compartiment donneur ou v-SNARE (vésiculaire) s'appariant avec le SNARE correspondant (t-SNARE) porté par la membrane cible (*target*). Les cibles des diverses neurotoxines clostridiales (VAMP/synaptobrevine, SNAP-25 et HPC1/syntaxine) ont été identifiées comme des SNARE [33]. Dans les terminaisons nerveuses, l'association de SNAP-25 et de la HPC1/syntaxine à la membrane plasmique indique qu'elles sont des t-SNAREs (ou qu'elles forment à elles deux un t-SNARE), alors que la VAMP/synaptobrevine est le v-SNARE des vésicules synaptiques. Cependant, ces SNARE ne sont pas neurospécifiques; ils sont présents dans des cellules de tissus variés [22]. A ce propos, il faut rappeler que la neurospécificité des neurotoxines clostridiales n'est pas conférée par la distribution de leurs cibles intracellulaires mais par la présence d'accepteurs sur la membrane plasmique neuronale qui permettent leur capture seulement par certains neurones. Le rôle des cibles des neurotoxines clostridiales dans le processus de l'exocytose n'est pas encore clair. En effet, l'examen morphologique des terminaisons nerveuses affectées par la TeNT qui clive la VAMP/synaptobrevine ou par la BoNT/A qui coupe SNAP-25 ne révèle aucune altération majeure si ce n'est une augmentation (~ 20-30 %) du nombre de vésicules synaptiques accostant la membrane plasmique [34-36]. En apparence, le clivage des SNARE n'empêche donc pas l'arrimage des vésicules synaptiques mais prévient leur fusion avec la membrane plasmique.

Autres activités intracellulaires des neurotoxines clostridiales

L'implication des cibles des neurotoxines clostridiales au cœur du processus d'exocytose fait de la TeNT et des BoNT des outils spécifiques de plus en plus utilisés en biologie cellulaire. Cependant, il est probable que les neurotoxines clostridiales ont une autre activité intracellulaire que l'attaque protéolytique de protéines impliquées dans la libération des neurotransmetteurs. En effet, l'injection intraneuronale d'ARNm codant pour des chaînes légères de TeNT mutées

sur le site de coordination du zinc conduit à une inhibition de la libération des neurotransmetteurs [37, 38] alors même que l'activité protéolytique, *in vitro*, de ces mêmes mutants est abolie [38, 39]. Le mécanisme d'action de cette voie secondaire n'est pas encore identifié. Une hypothèse séduisante est l'implication de transglutaminases intracellulaires puisque Facchiano et Luni [40] ont rapporté leur activation par le TeNT. Comment relier cette activation à une inhibition de la libération des neurotransmetteurs? La présence de transglutaminases dans les neurones a été rapportée et la synapsine – une protéine associée à la membrane des vésicules synaptiques – est substrat des transglutaminases [41].

La synapsine joue un rôle majeur dans la régulation de la libération des neurotransmetteurs; par son interaction avec le cytosquelette, elle gèrerait la disponibilité des vésicules pour l'exocytose [42]. La TeNT – *via* l'activation des transglutaminases – induirait l'immobilisation des vésicules synaptiques dans la terminaison nerveuse par le pontage covalent des synapsines au cytosquelette. Cette action pourrait rendre compte de l'accumulation des vésicules synaptiques dans les terminaisons nerveuses après action des BoNT et des TeNT. La diminution du nombre de vésicules synaptiques disponibles entraînerait une inhibition de la libération évoquée. Cette deuxième action des toxines s'ajouterait au blocage rapide (protéolytique) de la libération des neurotransmetteurs par les neurotoxines clostridiales; elle pourrait peut-être expliquer l'effet inhibiteur de longue durée (plusieurs semaines) des neurotoxines clostridiales, action qui excède de loin le temps nécessaire au renouvellement de leurs cibles.

Conclusion

Certaines bactéries du genre *Clostridium* ont développé des armes moléculaires qui attaquent, *via* leur chaîne légère, un des mécanismes fondamentaux de la cellule eucaryote, l'exocytose. Cependant, l'efficacité redoutable des neurotoxines clostridiales provient de leur vectorisation particulière: leur chaîne lourde les adresse spécifiquement à certaines

populations neuronales liées à la motricité.

Du fait de leur neurosélectivité extracellulaire, les toxines clostridiales sont devenues des outils thérapeutiques; le nombre restreint de leurs cibles intracellulaires leur a permis aussi de devenir des outils d'investigation en biologie cellulaire ■

Summary

Molecular mechanisms of tetanus and botulinum neurotoxins

Tetanus (TeNT) and botulinum (BoNTs, seven serotypes A-G) neurotoxins are the causal agents of two severe diseases, tetanus and botulism. TeNT blocks preferentially GABA or glycine release in the central nervous system whereas, BoNTs inhibit acetylcholine release in periphery. These neurotoxins are proteins constituted of a heavy and a light chains. The heavy chain mediates specific binding of toxins to neurone and translocation of light chain into the cytoplasm. The light chain alone is responsible for the intraneuronal blockade of neurotransmitter release. Recently, the light chain was found to be a zinc-endopeptidase. It attacks specifically synaptic proteins of the neuro-exocytotic apparatus. TeNT and BoNT/B, D, F and /G cleave VAMP/synaptobrevin an integral protein of the synaptic vesicle membrane. BoNT/A and BoNT/E attack specifically SNAP-25, a protein associated to the plasma membrane. BoNT/C cleaves HPC1/syntaxin, an integral protein of the plasma membrane that is associated to the calcium channels implicated in neurotransmitter release.

Remerciements

Le travail des auteurs a bénéficié d'une aide de l'Association Française contre les Myopathies, de la Direction des Recherches et Études Techniques, du Telethon-Italia (contrat 473) et du MURST.

TIRÉS À PART

B. Poulain.