



Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales

Evelyne Benoit, Françoise Goudey-Perriere, Pascale Marchot, Denis Servent

► To cite this version:

Evelyne Benoit, Françoise Goudey-Perriere, Pascale Marchot, Denis Servent (Dir.). Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales. SFET Publications, Châtenay-Malabry, France, pp.160, 2008. <hal-00738646>

HAL Id: hal-00738646

<https://hal.science/hal-00738646v1>

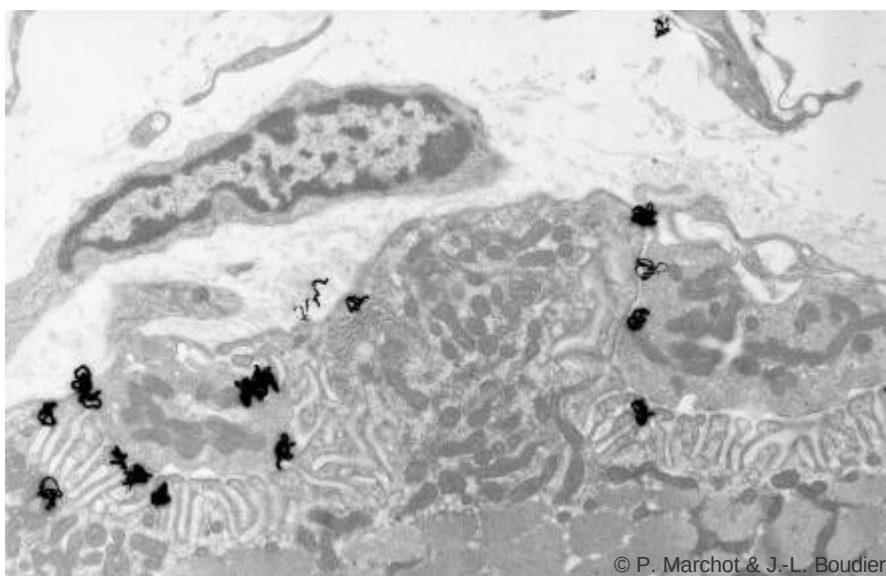
Submitted on 21 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

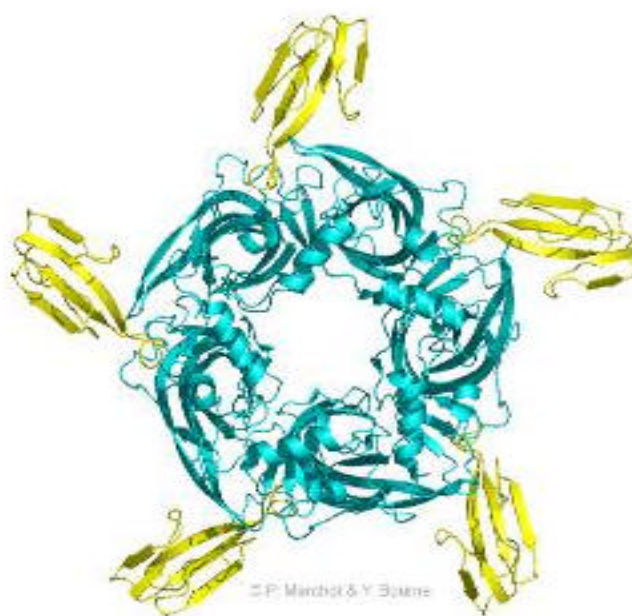
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales



Comité d'édition :
Evelyne BENOIT, Françoise GOUDEY-PERRIERE,
Pascale MARCHOT et Denis SERVENT

Société Française pour l'Etude des Toxines

Illustrations de couverture :

En haut : Vue en microscopie électronique des synapses neuromusculaires du muscle triangulaire de sternum de souris (grossissement de 13 333 fois). Les pelotes noires sont générées par des molécules d'alpha-neurotoxine « à trois doigts », isolée d'un venin de cobra et radioiodée, fixées aux récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine associés aux membranes post-synaptiques. (*Copyright* Pascale Marchot et Jean-Louis Boudier)

En bas : Vue cristallographique du complexe de haute affinité formé entre (en jaune) cinq exemplaires d'une alpha-neurotoxine « à trois doigts », isolée d'un venin de cobra, et (en bleu) l'*acetylcholine binding protein*, protéine homopentamérique de mollusque aquatique et équivalent soluble du domaine extracellulaire de fixation des ligands du récepteur nicotinique de l'acétylcholine. (*Copyright* Pascale Marchot et Yves Bourne)

Près de vingt ans de travaux menés par de nombreuses équipes au plan international relient ces deux images.

La collection « Rencontres en toxicologie » est publiée à l'occasion des Colloques annuels « Rencontres en toxicologie » organisés par la Société Française pour l'Etude des Toxines (SFET). Les ouvrages parus de 2001 à 2007 ont été édités par Elsevier (Paris, France), puis par la Librairie Lavoisier (Cachan, France). A partir de 2008, ils seront édités par la SFET et diffusés sur le site <http://www.sfet.asso.fr>, en libre accès pour les auteurs et les lecteurs.

Titres parus

Explorer, exploiter les toxines et maîtriser les organismes producteurs
Cassian Bon, Françoise Goudey-Perrière, Bernard Poulain, Simone Puiseux-Dao
Elsevier, Paris, 2001
ISBN : 2-84299-359-4

Toxines et recherches biomédicales
Françoise Goudey-Perrière, Cassian Bon, Simone Puiseux-Dao, Martin-Pierre Sauviat
Elsevier, Paris, 2002
ISBN : 2-84299-445-0

Toxinogénèse – Biosynthèse, ingénierie, polymorphisme et neutralisation des toxines
Françoise Goudey-Perrière, Cassian Bon, André Ménez, Simone Puiseux-Dao
Elsevier, Paris, 2003
ISBN : 2-84299-481-7

Envenimations, intoxications
Françoise Goudey-Perrière, Evelyne Benoit, Simone Puiseux-Dao, Cassian Bon
Librairie Lavoisier, Cachan, 2004
ISBN : 2-7430-0749-4

Toxines et douleur
Cassian Bon, Françoise Goudey-Perrière, Max Goyffon, Martin-Pierre Sauviat
Librairie Lavoisier, Cachan, 2005
ISBN : 2-7430-0849-0

Toxines et cancer
Françoise Goudey-Perrière, Evelyne Benoit, Max Goyffon, Pascale Marchot
Librairie Lavoisier, Cachan, 2006
ISBN : 2-7430-0958-6

Toxines émergentes : nouveaux risques
Françoise Goudey-Perrière, Evelyne Benoit, Pascale Marchot, Michel R. Popoff
Librairie Lavoisier, Cachan, 2007
ISBN : 978-2-7430-1037-9

Cet ouvrage est publié à l'occasion du colloque « 16èmes Rencontres en toxinologie », organisé par la Société Française pour l'Etude des Toxines (SFET) les 20 et 21 novembre 2008 à Paris.

Le comité d'organisation est constitué de :

Evelyne Benoit, Françoise Goudey-Perrière, Max Goyffon, Pascale Marchot et Denis Servent.

Le comité scientifique est constitué de :

Joseph Alouf, Evelyne Benoit, Blandine Gény, Françoise Goudey-Perrière, Max Goyffon, Françoise Grolleau, Pascale Marchot, Jordi Molgó, Michel R. Popoff, Bernard Poulain, Simone Puiseux-Dao et Denis Servent.

Le comité de rédaction est constitué de :

Evelyne Benoit, Philippe Billiald, Pierre Bougis, Patrick Breton, Jean-Philippe Chippaux, Pierre-Jean Corringer, Jean-Marc Dubois, Grazyna Faure, Philippe Fossier, Robert Frangez, Blandine Gény, Françoise Goudey-Perrière, Max Goyffon, Luc de Haro, Pascale Marchot, Marie-France Martin-Eauclaire, Dietrich Mebs, Jordi Molgó, Nicole Pagès, Michel R. Popoff, Simone Puiseux-Dao, Jean-Pierre Rosso, Catherine Rougeot, Denis Servent et Annick Simon.

Sommaire

Pages

Cassian BON, 1944 - 2008 <i>Max Goyffon</i>	9-10
André MENEZ, 1943 - 2008 <i>Max Goyffon</i>	11-12

Toxines et fonctions cholinergiques

Les spirolides : une famille de toxines émergentes qui contaminent les mollusques bivalves <i>Riadh MARROUCHI, Sébastien SCHLUMBERGER, Evelyne BENOIT, Romulo ARAOZ, Riadh KHARRAT, Jordi MOLGO</i>	13-17
Cnidarian toxins acting on the cholinergic system <i>Klara BULC ROZMAN, Dušan ŠUPUT, Jordi MOLGO, Evelyne BENOIT</i>	19-22
Fluorescent cholinergic agonists for functional studies of nicotinic receptor <i>Elias SAKR, Sébastien CHARON, Florian KRIEGER, Jordi RODRIGO, Maurice GOELDNER</i>	23-26
Utilisation des « protéines liant l'acétylcholine » (AChBP) en toxicologie structurale : nouveaux exemples <i>Yves BOURNE, Zoran RADIC, Todd T. TALLEY, Sandrine CONROD, Palmer TAYLOR, Jordi MOLGO, Pascale MARCHOT</i>	27-28
Retrogenomics - Proceeding from gene product back to the gene : applications in drug discovery and uncovering linkages in congenital disorders <i>Palmer TAYLOR, Zoran RADIC, Todd T. TALLEY, Akos NEMECZ, Antonella DE JACO, Davide COMOLETTI, Igor P. FABRICHNY, Philippe LEONE, Meghan T. MILLER, Noga DUBI, Valery V. FOKIN, K. Barry SHARPLESS, Yves BOURNE, Pascale MARCHOT</i>	29-32
Venom peptides from Conus and other Conoideans : prospects and perspectives <i>Baldomero M. OLIVERA</i>	33-42
Alpha-conotoxines, outils pour l'étude pharmacologique et structurale des récepteurs nicotiniques neuronaux <i>Sébastien DUTERTRE, Daniel BIASS, Philippe FAVREAU, Sophie MICHALET, Reto STÖCKLIN</i>	43-46
Novel roles of highly specific natural inhibitors of the angiotensin-converting enzyme <i>Mirian A.F. HAYASHI, Arthur Andrade NERY, Antonio C.M. CAMARGO, Henning ULRICH</i>	47-54
Toxines et identification des sous-types de récepteurs nicotiniques neuronaux d'insectes <i>Béatrice BODEREAU, Hélène TRICOIRE-LEIGNEL, Bruno LAPIED, Steeve H. THANY</i>	55-61
Neuronal cholinergic toxins : possible drugs for lung cancer treatment <i>Patrizia RUSSO, Laura PALEARI, Alessia CATASSI, Carole FRUCHART-GAILLARD, Gilles MOURIER, Denis SERVENT</i>	63-67
Activité agoniste cholinergique induite par la fraction non toxique du venin de <i>Buthus occitanus tunetanus</i> <i>Amani CHEIKH, Rym BENKHALIFA, Daniel POTREAU, Jocelyn BESCOND, Mohamed EL AYEB, Guy RAYMOND, Christian COGNARD</i>	69-74
Les toxines à trois doigts : même structure, même mécanisme de repliement ? <i>Grégori GROSS, Pascal DREVET</i>	75-78
La toxine MT7 : un outil de choix dans l'étude pharmacologique du récepteur muscarinique M1 <i>Carole FRUCHART-GAILLARD, Gilles MOURIER, Denis SERVENT</i>	79-85
Case report of the use of <i>Datura stramonium</i> for recreational purpose <i>Ruta LEKSIENE, Jonas SURKUS, Algirdas STONYIS</i>	87-88
L'acétylcholinestérase et les venins de serpents <i>Jean MASSOULIE</i>	89-92
Utilisation de la fasciculine-2, une toxine de venin de serpent, pour étudier l'acétylcholinestérase <i>in vivo</i> : avantages et inconvénients <i>Véronique BERNARD, Eric KREJCI</i>	93-100

Toxines et autres fonctions	Pages
Nouvelles observations appuyant le rôle de la toxine STb d'<i>Escherichia coli</i> dans la diarrhée chez l'Homme <i>Marie-Astrid ALBERT, J. Daniel DUBREUIL</i>	101-104
Présence d'un variant de la toxine STb d'<i>Escherichia coli</i> chez certains porcs malades <i>Christine TAILLON, Éric NADEAU, Michaël MOUREZ, J. Daniel DUBREUIL</i>	105-106
Le domaine T de la toxine diphtérique favorise la liaison et la pénétration membranaire du domaine catalytique <i>Anne CHASSAING, Sylvain PICHARD, Vincent FORGE, Daniel GILLET</i>	107-110
Phytotherapy and adverse reactions <i>Nubilde MARTÍNEZ, Edmundo CAYAMA, Nubi LEÓN, Lisbeth PÉREZ</i>	111-118
Profil des accidents par des animaux venimeux au Brésil, 2001 à 2006 <i>Rosany BOCHNER, Judith Tiomny FISZON</i>	119-122
Les toxines des venins des scorpions du genre <i>Androctonus</i> <i>Najwa ABBAS, Jean-Pierre ROSSO, Maya BELGHAZI, Brigitte CEARD, Pierre-Edouard BOUGIS, Marie-France MARTIN-EAUCLAIRE</i>	123-127
Incidence de la fraction toxique du venin d'<i>Androctonus australis hector</i> dans la leucocytose pulmonaire <i>Sassia SAMI-MERAH, Djelila HAMMOUDI-TRIKI, Djamila AROUNE, Marie-France MARTIN-EAUCLAIRE, Fatima LARABA-DJEBARI</i>	129-130
Immunoglobulines F(ab')₂ produites contre la fraction toxique du venin du scorpion marocain (<i>Androctonus mauretanicus mauretanicus</i>) <i>Naoual OUKKACHE, Mohamed HASSAR, Abdelaziz KAROUMI, Fatima CHGOURY, Lotfi BOUSSADDA, Rachid SAILE, Marie-France MARTIN-EAUCLAIRE, Noredine GHALIM</i>	131-134
Reprotoxicité des venins d'invertébrés <i>Françoise GOUDEY-PERRIERE, Nicole PAGES, Claude PERRIERE</i>	135-141
Reprotoxicité des venins de Vertébrés <i>Nicole PAGES, Françoise GOUDEY-PERRIERE, Claude PERRIERE</i>	143-150
Action of the <i>Crotalus durissus cascavella</i> venom on arterial blood pressure <i>Janaina S.A.M. EVANGELISTA, Alice M.C. MARTINS, João J.F. EVANGELISTA, Nilberto F. NASCIMENTO, Antonieta S. GOMES, Glaycianne B. de MORAIS, João A. M. SILVEIRA, Paula P.C. COSTA, Marcellus H.L.P. de SOUZA, Diva M. BORGES-NOJOSA, Dalgimar B. de MENEZES, Maria Elisabete A. MORAES, Helena S. A. MONTEIRO</i>	151-152
Caractérisation d'une fraction coagulante isolée du venin de <i>Cerastes cerastes</i> <i>Fatah CHERIFI, Fatima LARABA-DJEBARI</i>	153-154
Caractéristiques structurales et fonctionnelles de deux b-neurotoxines : l'ammodytoxine et la crotoxine <i>Grazyna FAURE, Frederick SAUL</i>	155-160

Cet ouvrage est dédié à la mémoire de

Cassian Bon, décédé le 20 mars 2008

et

André Ménez, décédé le 2 février 2008

Cassian BON, 1944 – 2008



Cassian BON est né le 31 mars 1944 au Viet-Nam dans une période troublée qu'il évoquait souvent. Très vite rentré en France, il fit ses études secondaires à l'Institut Fénélon à Grasse et prépara, à l'Ecole Sainte Geneviève de Versailles, le concours d'entrée à l'Ecole normale supérieure de la rue d'Ulm où il fut admis en 1966. Sa vie durant, il demeura fidèle aux associations d'anciens élèves de "Ginette" (École Ste Geneviève) et de l'ENS. Un service national dans les scientifiques du contingent l'amena à travailler sur les venins de scorpions, en 1972, dans un laboratoire de l'Institut Pasteur de Paris dirigé par France Tazieff. Son passage dans ce laboratoire sera décisif : il travaillera définitivement sur les venins, venins de serpents pour l'essentiel, et sur les sérums antivenimeux, tout au long d'une carrière double au CNRS et à l'Institut Pasteur de Paris. Sous la direction de Jean Pierre Changeux, il prépare puis soutient (1979) une thèse de doctorat sur la crotoxine, neurotoxine majeure du venin du crotale *Crotalus durissus terrificus*. Par la suite, après un passage comme chargé de recherche au CNRS dans

l'unité de Pharmacologie cellulaire dirigée par Boris Vargaftig, et où il prend la direction du laboratoire des venins, il devient successivement directeur de recherche au CNRS (1987), directeur de l'Unité des venins (1990) et chef de laboratoire de l'Institut Pasteur de Paris (1991).

Ses travaux sur les venins de serpents s'orienteront successivement dans trois directions. Tout d'abord, il développe les travaux engagés au cours de sa thèse de doctorat ès sciences et continue à étudier le mécanisme d'action de la crotoxine, neurotoxine dimérique présynaptique paralysante. Puis quelques années plus tard, il se penche sur les envenimations expérimentales et humaines et la sérothérapie antivenimeuse, suivant en cela (et s'en réclamant) la tradition pasteurienne initiée par Albert Calmette en 1894. Il définit expérimentalement les paramètres toxicocinétiques de la diffusion d'un venin dans un organisme, après injection par voie intraveineuse ou par voie intramusculaire, et les modifications de ces paramètres

lors de l'injection d'un sérum antivenimeux contenant des fragments d'anticorps capables (Fab) ou incapables (Fab²) franchir le filtre rénal. De plus, il met au point une technique de dosage du venin dans le sang et dans les urines par test ELISA, et vérifie que l'intensité des signes cliniques est bien corrélée à la quantité de venin libre circulante. Il sera vite reconnu internationalement pour ses compétences en matière de sérothérapie, et dès 1983 devient un expert régulièrement consulté par l'OMS. Enfin, il va s'intéresser de façon croissante aux composés des venins de crotale actifs sur la coagulation sanguine, avec l'idée de promouvoir des molécules d'intérêt thérapeutique utilisables dans le traitement d'accidents thrombotiques.

Sa carrière, à l'Institut Pasteur comme au CNRS, se développe parallèlement à ses travaux : directeur du département de Physiopathologie de l'Institut Pasteur, (1994-1997), membre du Conseil scientifique de l'Institut Pasteur de Paris (1995-1999), puis de l'Institut Pasteur de l'Iran (1998-2004), directeur de recherche de première classe au CNRS (1997). Co-fondateur de la Société française pour l'étude des Toxines (1992), il en devient le président pendant près de huit ans (2000-2008). Il fut par ailleurs membre de nombreuses sociétés savantes françaises (Société française de Biochimie et de Biologie moléculaire, dont il fut membre du Conseil d'Administration, Association française des Pharmacologistes, Société des Neurosciences) et étrangères (*International Society of Toxinology*, *International Society of Thrombosis and Haemostasis*, dont il fut président de la Section *Exogenous Factors affecting Haemostasis*, Association franco-chinoise pour la Recherche Scientifique et Technique, *European Neuroscience Association*, *The Mediterranean League against Thromboembolic Diseases*).

Son activité dans le domaine du traitement des envenimations est certainement celle qui est la plus présente dans les mémoires : elle le rapprochait de l'OMS et plus généralement de problèmes de santé publique, importants dans les pays d'Extrême-Orient. Il s'y engagea pleinement après avoir constaté les effets protecteurs d'anticorps monoclonaux dirigés contre une seule des sous-unités de la crotoxine (1991-1992). Il étendit aux envenimations scorpioniques les études pharmacocinétiques expérimentales des sérums antivenimeux et de leurs effets sur les paramètres toxicocinétiques de la diffusion du venin. L'ensemble de ses publications sur ces sujets fait toujours référence, tant pour les envenimations ophidiennes que pour les envenimations scorpioniques.

Il se rapprocha davantage encore du monde médical en conduisant en France une enquête rétrospective sur les morsures de vipères sans équivalent à ce jour, et dont les résultats se sont largement diffusés dans le monde hospitalier. Il sera dès lors invité par l'OMS comme expert des envenimations ophidiennes et de la sérothérapie au sein d'une commission internationale de standardisation des sérums antivenimeux (*Expert*

Committee on Biological Standardization).

Au sein de l'Institut Pasteur, il était étroitement lié avec les Instituts Pasteur du réseau producteur de sérum antivenimeux : Tunisie, Algérie, Maroc, Iran. Il resta d'ailleurs membre du Conseil scientifique de l'Institut Pasteur d'Iran jusqu'en 2004. Et en France même, il participait activement à divers enseignements de DU de pathologie tropicale (Paris, Rennes, Marseille), assurant de nombreuses heures de cours sur les envenimations humaines et leur traitement. Ses activités d'enseignement débordaient largement du cadre de la pathologie tropicale : participation, depuis la création de l'école doctorale du Muséum (1995), aux enseignements de cette école (Animaux venimeux et vénéneux) ainsi qu'au master (2004) de cet établissement (Évolution, patrimoine naturel et Société, spécialité Unité et diversité du vivant) qui avait fait suite au DEA "Interactions toxiques dans les écosystèmes et biotechnologies liées aux toxines". En venant travailler au Muséum national d'Histoire naturelle, en 2005, il retrouvait une ambiance qui lui était familière.

Il s'enthousiasma pour la Société Française pour l'Etude des Toxines à la fondation de laquelle il participa, en 1992. Membre du conseil dès le démarrage de la Société, il en devint le président en 2000. Il était en cours d'un mandat, son troisième, qui devait s'achever à la fin de l'année 2009. Très actif, les *Rencontres* qu'il organisa avec le bureau de la Société furent marquées par une nouveauté qui connut beaucoup de succès auprès des congressistes, celle d'un livre édité spécifiquement pour chacune de ces journées annuelles, et remis à chaque participant. Il savait aussi, à l'occasion, faire bénéficier les congressistes d'un indéniable penchant à la gastronomie. Sa disparition laisse un grand vide.

Ses dernières années furent marquées par de multiples difficultés qu'il surmonta avec une énergie et une égalité d'humeur soulignées par tous ceux qui l'approchèrent. Ni la maladie qui se déclara précocement et ne cessa de s'aggraver, ni la fermeture en 2004 de l'unité des venins de l'Institut Pasteur de Paris qu'il dirigeait depuis 1990 ne ralentirent son activité. Accueilli par le laboratoire de Chimie des Substances naturelles du Muséum national d'Histoire naturelle en 2005, il donna la priorité aux enseignements, à un rapport pour l'OMS (*WHO Report Rabies and Envenomings*) et à l'organisation de colloques, en particulier aux *Rencontres annuelles* de la Société Française pour l'étude des Toxines.

Décédé le 20 mars dernier après une brève hospitalisation, il laisse, au terme d'une œuvre de plus de 300 articles, le souvenir d'une personnalité accueillante, d'une haute culture scientifique, au dynamisme et à la ténacité exceptionnels.

Max Goyffon,
Muséum national d'Histoire naturelle

André MENEZ, 1943 – 2008



Président du Muséum national d'Histoire naturelle depuis le mois de juillet 2006, André MÉNEZ est décédé avant le terme de son mandat des suites d'une longue maladie. Tant en France qu'à l'étranger, sa mort a été un choc pour tous ceux, nombreux, qui l'avaient rencontré ou connu tout au long d'un parcours scientifique exceptionnel, conduit pour l'essentiel au CEA, et qui l'avait amené à la présidence de l'un des plus prestigieux établissements scientifiques de notre pays.

Ingénieur de recherches en 1968 au Service de Biochimie du CEN de Saclay (CEA), il soutient sa thèse de doctorat ès sciences à l'université de Paris 7 en 1977. En 1991, il devient chef du Département d'Ingénierie et d'Études des Protéines (DIEP). En 2003, il est délégué à la recherche auprès du directeur du Muséum national d'Histoire naturelle ; il en deviendra président en 2006. L'essentiel de son activité scientifique a été consacré aux toxines des venins de serpents d'abord, puis de scorpions et de cônes. Sa passion pour les venins l'avait conduit à créer et développer, ces dernières années, la Fondation internationale *Toxinomics*, dont l'un des objectifs est de séquencer le génome de diverses espèces animales venimeuses avec l'idée d'utiliser le potentiel thérapeutique de toxines aux effets très étroitement ciblés. Ce projet est soutenu par l'International Society of Toxinology, dont il était le président en exercice et géré avec l'aide de Dietrich Mebs, secrétaire de l'IST et Retö Stöcklin (Laboratoire Atheris, Genève). Expert internationalement reconnu dans le domaine des venins et de leurs toxines, André Ménez est l'auteur de plus de 300 publications scientifiques originales, de nombreux brevets et ouvrages de vulgarisation. Il a été responsable ou co-responsable de l'organisation de

divers colloques et congrès, tant en France qu'à l'étranger.

Chimiste de formation, André Ménez s'orienta rapidement vers la biochimie, à l'occasion d'une collaboration active et fructueuse avec Jean-Pierre Changeux qui parvint à isoler et étudier le récepteur nicotinique post-synaptique à l'acétylcholine, grâce à la fixation de haute affinité sur ce récepteur d'une bungarotoxine radiomarquée au tritium.

Dès lors, il ne devait plus abandonner les venins de serpents et plus spécialement les neurotoxines curarisantes d'élapidés (*Naja* sp.) et de serpents marins (*Laticauda* sp.). La préparation d'anticorps polyclonaux, puis monoclonaux, lui permit d'observer que le pouvoir neutralisant d'un anticorps n'implique pas nécessairement une liaison de cet anticorps avec le site de fixation de la toxine sur le récepteur. Il dépend en réalité du changement de conformation de la toxine que peut induire la fixation d'un anticorps, même en un site topographiquement éloigné du site "actif" de la toxine. De fait, André Ménez a montré que la fixation d'un anticorps sur une toxine liée à son récepteur neuronal induit une perte d'affinité de la toxine pour le récepteur : en d'autres termes, les anticorps antitoxines peuvent posséder outre un effet protecteur préventif par capture d'une toxine libre, un pouvoir curatif par augmentation de la dissociation de la liaison toxine-récepteur ce qui justifie, au moins dans les envenimations neurotoxiques, une sérothérapie tardive.

Dans une étape suivante, les travaux d'André Ménez sont marqués par l'utilisation des techniques de mutagenèse dirigée combinées aux techniques spectroscopiques (RMN, cristallographie). Elles l'orientent vers des analyses structurales de toxines

dont il élargit le choix dans les venins de serpents, mais aussi de scorpions, d'anémones de mer, de cônes. André Ménez s'intéresse plus spécialement à deux grands groupes de toxines : les toxines dites "à trois doigts", bloquant les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine, et les toxines bloquant les canaux potassium voltage-dépendants. Observant que des cœurs de liaison identiques peuvent apparaître sur des toxines d'architecture très différente, il en conclut que les toxines animales semblent adopter une stratégie universelle pour se lier avec une haute affinité aux différentes familles de récepteurs ou de canaux.

André Ménez fut très tôt un fidèle du Muséum national d'Histoire naturelle bien avant d'en devenir le président. Au début de la décennie 70, il noua des liens étroits et durables avec le laboratoire de Biophysique, alors dirigé par Claude Hélène, puis par le Pr. Thérèse Garestier. Il participa régulièrement aux enseignements sur les "*Animaux venimeux*" dès leur présentation sous la forme actuelle en 1983. Son cours sur les venins d'Élapidés était un des points forts de la session "Vertébrés terrestres venimeux", et son brio, la clarté de son discours, suscitaient chaque année le même enthousiasme. Il était très attaché à cet enseignement qu'il assura jusqu'à la fin, même pendant son temps de présidence.

Ce bref résumé laisse apparaître un rythme d'activité constamment soutenu à un très haut niveau. Ses publications, ses brillantes qualités de conférencier, d'organisateur, lui valaient de très nombreuses sollicitations, tant dans son cadre professionnel du CEA qu'en France ou à l'étranger. Il était ainsi sans cesse invité à des colloques ou à dispenser des cours, notamment au Japon ou à Singapour. Il n'a pas négligé non plus les activités de terrain et a été à plusieurs reprises collecter des serpents. Au-delà de la vie professionnelle, l'homme était attachant par une réflexion sans cesse en éveil, un dynamisme contagieux, une ouverture d'esprit qui impressionnait les jeunes chercheurs auxquels il a toujours réservé le

meilleur accueil, une réelle fidélité en amitié. Ses qualités se manifestaient tout aussi bien en dehors du cadre universitaire : il réservait le même accueil chaleureux aux personnes qui s'adressaient à lui comme spécialiste des venins et des animaux venimeux, éleveurs de serpents en particulier. Il a ainsi contribué directement ou indirectement à la réussite d'entreprises de production de venin ou d'élevages de serpent créées par des personnalités passionnées, volontaires et tenaces, avec lesquelles il a collaboré.

André Ménez fut l'un des membres fondateurs de la Société française pour l'étude des toxines (SFET) en 1992 et en fut constamment un membre actif, même quand ses nombreuses occupations l'amènèrent à s'éloigner du conseil de la société. Il a souvent participé très activement à l'élaboration des programmes des Rencontres annuelles. D'emblée, il a placé ces Rencontres à un haut niveau scientifique, avec les toutes premières qu'il a organisées sur le thème « *Protection contre les toxines: nouvelles approches moléculaires* » et « *Analyse moléculaire des relations entre la structure et la fonction des toxines* », par exemple. Pour la SFET, toujours prêt à répondre et à organiser, il a fait preuve d'une constante disponibilité.

Sa silhouette était familière à tous, anciens de la société et jeunes étudiants. Chacun retrouvait avec plaisir la clarté de ses présentations, qui suscitait une admiration unanime. Il possédait ce don rare de se faire aussi bien comprendre d'un public de profanes que d'un aréopage de spécialistes.

Pour la première fois en 2007, il ne put participer aux Rencontres. Il se fit excuser : une grande appréhension gagna alors l'auditoire. La SFET a vu disparaître avec une sincère et profonde tristesse, plus encore qu'un scientifique et un toxinologue de renommée mondiale, un grand et fidèle ami.

Max Goyffon,
Muséum national d'Histoire naturelle

Les spirolides : une famille de toxines émergentes qui contaminent les mollusques bivalves

Riadh MARROUCHI^{1,2}, Sébastien SCHLUMBERGER¹, Evelyne BENOIT¹, Romulo ARAOZ¹, Riadh KHARRAT², Jordi MOLGO^{1*}

¹ CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard - FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire - UPR9040, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France ; ² Laboratoire des Toxines Alimentaires, Institut Pasteur de Tunis, 13 Place Pasteur, B.P. 74, 1002 Tunis-Belvédère, Tunisie.

* Auteur correspondant ; Tél : +33 (0)169823642 ; Fax : +33 (0)169824141 ; Courriel : molgo@nbcn.cnrs-gif.fr

Résumé

Depuis une dizaine d'années dans certaines zones côtières du monde, et depuis 2005 en France, les efflorescences du dinoflagellé *Alexandrium ostenfeldii* sont particulièrement surveillées. Cette espèce arctique est en effet connue pour produire les spirolides, une nouvelle famille de macrocycles constituée de dix composés et responsable de la contamination de certains mollusques bivalves. La très forte toxicité des spirolides chez la souris, lorsqu'elles sont administrées par voie intrapéritonéale, est due à la présence d'un motif spiro-imine dans leur structure. Bien que le mode d'action des spirolides ne soit pas encore élucidé, les récepteurs cholinergiques ont été proposés comme étant probablement les cibles moléculaires de ces imines cycliques. Des études sont donc nécessaires afin d'ouvrir la possibilité d'établir des seuils de toxicité pour l'Homme.

The spirolides : a family of emergent toxins which contaminate bivalve molluscs

Over the past decade in some areas of the world, and since 2005 in France, the blooms of the dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* are particularly monitored. Hence, this arctic species is well known to produce the spirolides, a new family of macrocycles including ten compounds and responsible for the contamination of some bivalve molluscs. The high toxicity of spirolides, when intraperitoneally administrated to mice, is due to the presence of a spiro-cyclic imine ring system in their structure. Although the mode of action of spirolides has not been elucidated yet, the cholinergic receptors have been proposed as likely being the molecular targets of these cyclic imines. Further studies are needed to open the possibility to establish toxicity thresholds for human.

Keywords : Spirolides, *Alexandrium ostenfeldii*, bivalve molluscs.

Introduction

Depuis une vingtaine d'années, un problème relatif au phytoplancton en général, et à certaines espèces de dinoflagellés en particulier, se pose dans les différentes zones côtières mondiales. En effet, les dinoflagellés, qui sont ingérés notamment par des mollusques bivalves et des poissons, peuvent, dans certaines conditions particulières, synthétiser et stocker dans leur cellule ou libérer dans le milieu marin des métabolites secondaires hautement toxiques appelés phycotoxines, dites aussi « biotoxines marines ».

Ces phycotoxines, de faible masse moléculaire et de nature non protéique, sont véhiculées le long de la chaîne trophique alimentaire et sont donc susceptibles d'atteindre l'Homme. C'est ainsi que la consommation de bivalves contaminés provoque plusieurs types graves d'intoxication alimentaire humaine. Selon les symptômes, six types d'intoxication ont été décrits : paralytique (PSP pour *Paralytic Shellfish Poisoning*), diarrhéique (DSP pour *Diarrheic Shellfish Poisoning*), neurologique (NSP pour *Neurologic Shellfish Poisoning*), amnésique (ASP pour *Amnesic Shellfish Poisoning*), ciguatérique (CFP pour *Ciguatera Fish Poisoning*) et l'intoxication par les azaspiracides (pour une revue, voir Cimminiello et

Fattorusso, 2004).

En plus de leurs effets néfastes sanitaires et délétères dans les écosystèmes marins, les phycotoxines limitent le commerce des produits de la mer. Elles contribuent ainsi à des pertes économiques importantes qui touchent le secteur halieutique, au cœur de la révolution agro-alimentaire actuelle, notamment par la mort des animaux marins et l'interdiction de la commercialisation des produits marins de certaines zones de collecte suite à une contamination endémique.

Ainsi, par leur impact sur la santé publique et sur l'économie, les efflorescences du phytoplancton toxique et les phycotoxines sont au cœur des problèmes environnementaux et humains, ce qui préoccupe fortement le public, les médias et les scientifiques.

Depuis une dizaine d'années, et depuis 2005 en France, les efflorescences d'une espèce de dinoflagellés, *Alexandrium ostenfeldii*, sont particulièrement surveillées (<http://www.ifremer.fr/com/marin/marin70-2.pdf>). Etant producteur de spirolides, une nouvelle famille de toxines émergentes, ce dinoflagellé est reconnu comme étant l'agent causal de la contamination de certains poissons, mais surtout de certains mollusques bivalves tels que les moules, les huîtres ou encore les coquilles Saint-Jacques.

Alexandrium ostenfeldii, une espèce qui pose problème

Sa répartition géographique

Alexandrium ostenfeldii est une espèce arctique. Elle a été détectée, pour la première fois, sur les côtes Est de l'océan Atlantique, plus précisément en Belgique (Woloszynska et Conrad, 1939), puis en Espagne (Fraga et Sanchez, 1985), en Islande, en Norvège (Balech et Tangen, 1985) et au Danemark (Hansen *et al.*, 1992).

Cette espèce est également apparue sur les côtes Nord-Ouest de l'océan Atlantique, au golfe du Saint-Laurent (Levasseur *et al.*, 1998) et en Nouvelle-Ecosse au Canada (Cembella *et al.*, 1998, 2000 ; Gribble *et al.*, 2005). *A. ostenfeldii* a été aussi recueilli sur les côtes méditerranéennes, en Egypte (Balech, 1995), sur les côtes Nord-Ouest de l'océan Pacifique (Steidinger et Tangen, 1996) et en Nouvelle-Zélande (MacKenzie *et al.*, 1996). Finalement, ce dinoflagellé a été détecté, très récemment, sur les côtes de la mer Adriatique (Ciminiello *et al.*, 2006).

Ses propriétés morphologiques

A. ostenfeldii est un dinoflagellé mixotrophique qui vit généralement sous la forme de cellules isolées, bien qu'elles puissent être souvent regroupées en colonies. Les cellules sont pratiquement sphériques et ont une taille relativement grande (40-56 µm de longueur et 40-50 µm de largeur), leur hypothèque et leur épithèque étant de même longueur. Elles sont pourvues d'un noyau en forme de « U », occupant une position équatoriale. Cette espèce de dinoflagellés possède un grand pore ventral, caractéristique, situé au niveau de la première plaque apicale (Balech, 1995 ; Taylor *et al.*, 1995 ; Steidinger et Tangen, 1996).

Sa reproduction

A. ostenfeldii se reproduit asexuellement, par fission binaire, mais cette espèce de dinoflagellé a aussi un cycle sexuel isogamétique, formant un planozygote. Lorsque les conditions du milieu deviennent défavorables, *A. ostenfeldii* produit des kystes temporaires, sphériques et de grande taille (35 à 40 µm de diamètre). Ces kystes, de couleur pâle avec des granules bruns et rougeâtres, possèdent une paroi cellulaire claire et couverte de mucilage (Jensen et Moestrup, 1997).

Son profil toxinique

A. ostenfeldii a un profil toxinique qui varie beaucoup en fonction de sa localisation géographique. En particulier, certaines souches de Scandinavie et de Nouvelle-Zélande ont été impliquées dans la synthèse, en faibles quantités, de saxitoxine et dérivés (MacKenzie *et al.*, 1996 ; Cembella *et al.*, 2001). Cependant, au Danemark, en Norvège et en Nouvelle-Ecosse, au Canada, d'autres souches ont été rapportées comme étant productrices de spirolides (Cembella *et al.*, 2001 ; Aasen *et al.*, 2003 ; MacKinnon *et al.*, 2004, 2006).

En 2005, Gribble et ses collaborateurs ont relevé une différence, dans la composition en toxines, entre des échantillons d'*A. ostenfeldii* prélevés *in situ* et les cellules de cette même espèce cultivées *in vitro* (Gribble *et al.*, 2005). Il est à souligner que de nombreux facteurs, tels que la salinité et l'azote inorganique (Maclean *et al.*, 2003) ou encore la durée d'ensoleillement (John *et al.*, 2001), peuvent influencer à la fois la production de toxines et le profil toxinique d'*A. ostenfeldii*.

Les méthodes pour l'identifier

C'est par une observation des cellules sous microscope qu'*A. ostenfeldii* est couramment identifié. Cependant, outre le fait que cette méthode nécessite une grande connaissance en taxonomie, elle prend beaucoup de temps et est relativement coûteuse (Molgó *et al.*, 2006, 2007). Récemment, une méthode de moindre coût et facile à utiliser, a été développée. Cette méthode, actuellement employée pour la détection électrochimique du dinoflagellé, fait appel à un bio-senseur d'ADN (Metfies *et al.*, 2005).

Les spirolides, une famille de toxines émergentes

Les méthodes pour les détecter

Au cours des dernières années, grâce au développement de méthodes de détection, plusieurs travaux ont été menés pour détecter les spirolides dans les bivalves. En particulier, la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse a permis de faire des études à la fois qualitatives et quantitatives des toxines présentes dans des extraits de bivalves et dans des cultures d'*A. ostenfeldii* (Aasen *et al.*, 2006 ; Villar González *et al.*, 2006 ; Ciminiello *et al.*, 2006).

Les différents composés identifiés

Les spirolides B et D sont les premiers composés à avoir été identifiés. Elles ont été isolées et purifiées à partir des glandes digestives de moules (*Mytilus edulis*, Figure 1) et de coquilles Saint-Jacques (*Pacopecten magellanicus*) collectées dans certains sites d'aquaculture de Nouvelle-Ecosse, au Canada (Hu *et al.*, 1995 ; Cembella *et al.*, 2000). Récemment, ces deux toxines ont été détectées chez des bivalves, en Ecosse (Ruehl *et al.*, 2001), en Norvège (Aasen *et al.*, 2005), en Espagne (Villar González *et al.*, 2006), en Italie (Ciminiello *et al.*, 2006) et en France (Amzil *et al.*, 2007 ; Krys *et al.*, 2007).

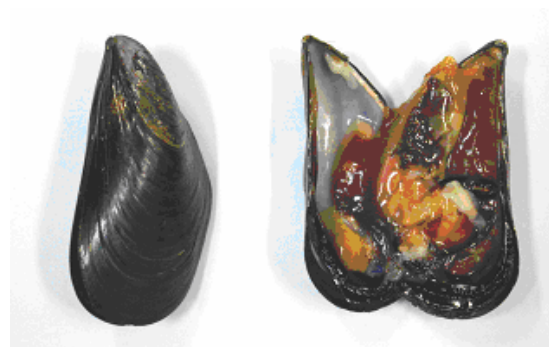


Fig. 1. Moules (*Mytilus edulis*).

Fig. 1. Mussels (*Mytilus edulis*).

Les spirolides A et C, ainsi que les formes déméthylées du composé C, ont été identifiées ultérieurement. C'est en partie grâce à des techniques de spectroscopie (résonance magnétique nucléaire et dichroïsme circulaire) et de cristallographie (rayons X) qu'ont été résolues les structures chimiques des spirolides (Figure 2). Structuellement, les composés A et C sont similaires aux composés B et D (Hu *et al.*, 2001), tandis que les formes déméthylées du composé C (13-desMe-C et 13,19-didesMe-C) sont plutôt proches des pinnatoxines A et D (Falk *et al.*, 2001 ; Figure 2A).

D'autres spirolides, les composés E et F (Figure 2B), ont été isolées et purifiées à partir de bivalves contaminés. Le fait que ces deux composés soient biologiquement inactifs et qu'ils ne soient pas détectables dans des cultures cellulaires d'*A. ostentfeldii* suggère fortement qu'ils soient des produits issus du métabolisme dans les bivalves (Hu *et al.*, 2001).

Plus, récemment, la spirolide G et sa forme méthylée (20-Me-G, Figure 2A) ont été identifiées dans des moules contaminées (Aasen *et al.*, 2006). La présence de cette forme méthylée, qui est un ester d'acide gras de la spirolide G, dans des moules, permet de supposer que les spirolides peuvent être estérifiées dans les bivalves, probablement par l'action d'enzymes telles que l'acyle transférase (Aasen *et al.*, 2006). Cependant, le métabolisme des spirolides, que ce soit dans des cultures cellulaires d'*A. ostentfeldii* ou dans des bivalves, soulève des controverses. En effet, une étude très récente montre que le pourcentage relatif de spirolides et de ses différentes formes (13-desMe-C, 13,19-didesMe-C et

20-Me-G), dans des extraits d'*A. ostentfeldii*, n'est pas modifié lorsque ces extraits sont mis à incuber avec des broyats, riches en enzymes, de bivalves (*Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas* et *Pecten maximus*), ce qui suggère fortement que les spirolides ne sont pas sensibles aux enzymes présentes dans ces mollusques (Christian *et al.*, 2008).

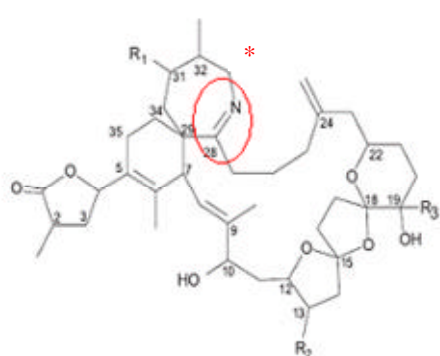
Les études concernant la synthèse des spirolides n'ont pas abouti, du moins jusqu'à présent, à la synthèse totale de ces macrocycles.

L'importance du motif spiro-imine pour la toxicité des composés

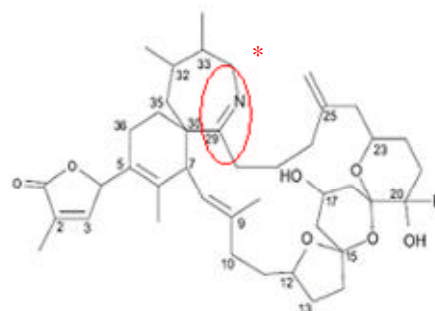
Toutes les spirolides, biologiquement actives chez les souris, renferment dans leur structure un système bicyclique incluant un motif spiro-imine (voir Figure 2A).

Par contre, les formes E et F, qui sont biologiquement inactives chez les souris, sont dépourvues d'un tel motif (Figure 2B).

A

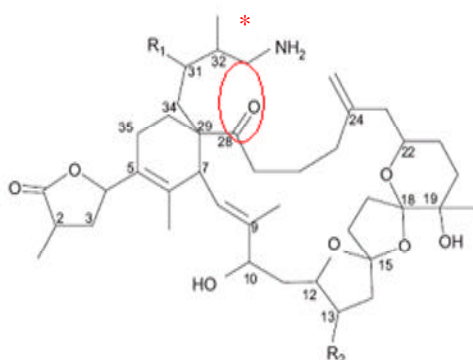


Spirolides	MM	R1	R2	R3
A	691.5	H	CH ₃	CH ₃
B	693.5	H	CH ₃	CH ₃
C	705.5	CH ₃	CH ₃	CH ₃
D	707.5	CH ₃	CH ₃	CH ₃
13-desMe-C	691.5	CH ₃	H	CH ₃
13, 19-didesMe-C	677.5	CH ₃	H	H



Spirolides	MM	R
G	691.5	H
20-Me-G	705.5	CH ₃

B



Spirolides	MM	R1	R2
E	709.5	H	CH ₃
F	711.5	H	CH ₃

Fig. 2. Structures chimiques des différents composés formant la famille des spirolides. (A) Composés biologiquement actifs, contenant un motif spiro-imine (*). (B) Composés biologiquement inactifs, issus du métabolisme des bivalves et dans lesquels le système bicyclique incluant le motif spiro-imine (*) est ouvert.

Fig. 2. Chemical structures of the different compounds included in the spirolides' family. (A) Biologically active compounds containing a spiro-cyclic imine ring system (*). (B) Biologically inactive compounds, from bivalves' metabolism and in which the spiro-cyclic imine ring system (*) is opened.

Ces observations suggèrent fortement que le motif spiro-imine est le pharmacophore, *i.e.* la partie pharmacologiquement active des molécules (Hu *et al.*, 1996, 2001). Ce même motif est également présent dans

d'autres phycotoxines, dites « imines cycliques », telles que les pinnatoxines, les ptériatoxines ou encore les gymnodimines (pour des revues, voir Molgó *et al.*, 2006, 2007).

La toxicité des composés

L'administration, par voie intrapéritonéale, de doses létales de spirolides ou d'extraits de bivalves contaminés par ces macrocycles, à des souris, provoque des symptômes caractéristiques qui apparaissent généralement dans les 20 minutes suivant l'injection (Richard *et al.*, 2001 ; Gill *et al.*, 2003 ; Munday *et al.*, 2004). Ces symptômes se manifestent par des troubles neurologiques, incluant une pilo-érection, une hyperextension du dos, une queue courbée en arc et des convulsions. Ils sont suivis d'une mort rapide des animaux, survenant en quelques minutes, ce qui permet de caractériser les spirolides comme étant des toxines à action rapide, connues sous le nom anglo-saxon de FATS (pour *Fast-Acting Toxins*).

Les spirolides sont beaucoup plus toxiques chez les souris lorsqu'elles sont administrées par voie intrapéritonéale [DL₅₀ (Dose Létale provoquant la mort de 50% des animaux) = 40 µg/kg] que par voie orale (DL₅₀ = 1 mg/kg) (Richard *et al.*, 2001). Chez ces mêmes animaux, les valeurs de la DL₅₀ pour la spirolide C déméthylée (forme 13-desMe-C) sont de 6,5 µg/kg, 157 µg/kg et 500 µg/kg après que la toxine ait été, respectivement, injectée par voie intrapéritonéale, administrée par gavage et ajoutée dans leur alimentation (Munday *et al.*, 2004).

Le mode d'action des composés

Bien que le mode d'action des spirolides ne soit pas encore élucidé, les récepteurs cholinergiques (muscariniques et nicotiniques) ont été proposés comme étant les cibles moléculaires de ces imines cycliques.

En particulier, les études toxicologiques réalisées chez la souris ont montré que la spirolide C déméthylée (forme 13-desMe-C) affecte spécifiquement certaines régions du système nerveux central, notamment le tronc cérébral et l'hippocampe, aucun effet de ce composé n'ayant été détecté au niveau des autres tissus ou organes (Gill *et al.*, 2003). De plus, la mort des souris, suite à l'injection intrapéritonéale d'extraits de bivalves contaminés par des spirolides, survient beaucoup plus rapidement en présence d'atropine ou autres antagonistes des récepteurs cholinergiques, alors qu'elle est retardée en présence d'agonistes de ces mêmes récepteurs (Richard *et al.*, 2001).

Finalement, des analyses transcriptionnelles ont révélé que l'expression des gènes codant pour certaines sous-unités de récepteurs muscariniques (mAChR1, mAChR4 et mAChR5) et nicotiniques (nAChRα2 et nAChRβ4) se augmentent chez les souris injectées avec des spirolides, alors qu'elle n'est pas modifiée en ce qui concerne les récepteurs du glutamate (Gill *et al.*, 2003).

L'intoxication humaine par les spirolides

Peu de cas confirmés d'intoxication humaine par les spirolides sont décrits dans la littérature. Cependant, de vagues symptômes, tels qu'une détresse gastrique et une tachycardie, ont été observés chez des patients ayant consommé des bivalves contaminés en Nouvelle-Ecosse, au Canada (Gribble *et al.*, 2005). Ces symptômes pourraient être liés à la présence de spirolides.

En conséquence, il n'existe actuellement aucune législation pour les spirolides. La présence de ces toxines n'est pas recherchée lors des tests de routine effectués dans le cadre des programmes de contrôle et de

surveillance de la filière des mollusques bivalves vivants (Gribble *et al.*, 2005 ; Krys *et al.*, 2007).

Conclusion

A l'heure actuelle, il y a peu d'informations concernant l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion et le mode d'action des spirolides, qui soient disponibles. Des études approfondies sont donc nécessaires pour établir des réglementations (seuils de toxicité pour l'Homme) en relation avec cette nouvelle famille de macrocycles et pour proposer des tests adéquats de diagnostic. *In fine*, ces études conduiront à une meilleure protection de la santé du consommateur et permettront de préserver une activité économique importante du secteur halieutique qui, actuellement, est au cœur d'une révolution agroalimentaire.

Remerciements. Les auteurs remercient Jean-Paul BOUILLOT (INAF, CNRS, Gif-sur-Yvette) pour son aide concernant les photographies de moules. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une coopération inter-universitaire franco-tunisienne, financée par le Ministère des Affaires Etrangères français et le Ministère tunisien de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la technologie (Partenariat Hubert Curien - projet n° 08G0903).

Références bibliographiques

- Aasen J., LeBlanc P., Hardstaff W., Hovgaard P., Burton I.W., Aune T., MacKinnon S.L., Walter J.A., Quilliam M.A. (2003) Detection and identification of spirolides in Norwegian mussels and plankton. In: Bates S.S. (Ed.), *Proceedings of the Eighth Canadian Workshop on Harmful Marine Algae*, Can. Tech. Rep. Fish Aquat. Sci., Moncton, NB, USA, pp. 5-7.
- Aasen J., MacKinnon S.L., LeBlanc P., Walter J.A., Hovgaard P., Aune T., Quilliam M.A. (2005) Detection and identification of spirolides in Norwegian shellfish and plankton. *Chem. Res. Toxicol.* 18:509-15.
- Aasen J.A.B., Hardstaff W., Aune T., Quilliam M.A. (2006) Discovery of fatty acid ester metabolites of spirolide toxins in mussels from Norway using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20:1531-7.
- Amzil Z., Sibat M., Royer F., Masson N., Abadie E. (2007) Report on the first detection of pectenotoxin-2, spirolide-A and their derivatives in French shellfish. *Mar. Drugs* 5:168-79.
- Balech E. (1995) The Genus *Alexandrium halim* (Dinoflagellata). In: *Sherkin Island Marine Station publication*, Cork, Ireland, 151 pp.
- Balech E., Tangen K. (1985) Morphology and taxonomy of toxic species in the *tamarensis* group (Dinophyceae): *Alexandrium excavatum* (Braarud) comb. nov. and *Alexandrium ostenfeldii* comb. nov. *Sarsia* 70:333-43.
- Cembella A., Quilliam M.A., Lewis N.I., Bauder A.G., Wright J.L.C. (1998) Identifying the planktonic origin and distribution of spirolides in coastal Nova Scotian waters. In: Reguera B., Blanco J., Fernández M.L., Wyatt T. (Eds.), *Harmful Algae*, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Vigo, Spain, pp. 481-4.
- Cembella A.D., Lewis N.I., Quilliam M.A. (2000) The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *Phycologia* 39:67-74.
- Cembella A.D., Bauder A.G., Lewis N.I., Quilliam M.A. (2001) Association of the gonyaulacoid dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* with spirolide toxins in size-fractionated plankton. *J. Plankton Res.* 23:1413-9.
- Christian B., Below A., Dreßler N., Scheibner O., Luckas B., Gerdt G. (2008) Are spirolides converted in biological systems? A study. *Toxicon* 51:934-40.
- Ciminiello P., Fattorusso E. (2004) Shellfish toxins-chemical studies on Northern Adriatic mussels. *Eur. J. Org. Chem.* 12:2533-51.
- Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Magno S.,

- Tartaglione L., Cangini M., Pompei M., Guerrini F., Boni L., Pistocchi R. (2006) Toxin profile of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) from the Northern Adriatic Sea revealed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon* 47:597-604.
- Falk M., Burton I.W., Hu T., Walter J.A., Wright J.L.C. (2001) Assignment of the relative stereochemistry of the spirolides, macrocyclic toxins isolated from shellfish and from cultured dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Tetrahedron* 57:8659-65.
- Fraga S., Sanchez F.J. (1985) Toxic and potentially toxic dinoflagellates in Galician Rias (NW Spain). In: Anderson D., White A.W., Baden D.G. (Eds.), *Toxic Dinoflagellates*, Elsevier, New York, USA, pp. 51-5.
- Gill S., Murphy M., Clausen J., Richard D., Quilliam M., MacKinnon S., LaBlanc P., Mueller R., Pulido O. (2003) Neural injury biomarkers of novel shellfish toxins, spirolides: a pilot study using immunochemical and transcriptional analysis. *Neurotoxicology* 24:593-604.
- Gribble K.E., Keafer B.A., Quilliam M.A., Cembella A.D., Kulis D.M., Manahan A., Anderson D.M. (2005) Distribution and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in the Gulf of Maine, USA. *Deep-Sea Research II* 52:2745-63.
- Hansen P.J., Cembella A.D., Moestrup O. (1992) The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* : paralytic shellfish toxin concentration, composition, and toxicity to a tintinnid ciliate. *J. Phycol.* 28:597-603.
- Hu T., Curtis J.M., Oshima Y., Quilliam M.A., Walter J.A., Watson-Wright W.M., Wright J.L.C. (1995) Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 20:2159-61.
- Hu T., Curtis J.M., Walter J.A., Wright J.L.C. (1996) Characterization of biologically inactive spirolides E and F : identification of the spirolide pharmacophore. *Tetrahedron Lett.* 37:7671-4.
- Hu T., Burton I.W., Cembella A.D., Curtis J.M., Quilliam M.A., Walter J.A., Wright J.L.C. (2001) Characterization of spirolides A, C, and 13-desmethyl C, new marine toxins isolated from toxic plankton and contaminated shellfish. *J. Nat. Prod.* 64:308-12.
- Jensen M., Moestrup O. (1997) Autecology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* : life history and growth at different temperatures and salinities. *Eur. J. Phycol.* 32:9-18.
- John U., Quilliam M.A., Medlin L., Cembella A.D. (2001) Spirolide production and photoperiod-dependent growth of the marine Dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. In: Hallegraeff G.M., Blackburn S.I., Bolch C.J., Lewis R.J. (Eds.), *Harmful Algal Blooms 2000*, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, France, pp. 299-302.
- Krys S., Arnich N., Frey J.M. (2007) Emergence de nouvelles toxicités d'origine marine : vers une évolution significative des dispositifs de sécurisation des coquillages ? In: Goudey-Perrière F., Benoit E., Marchot P., Popoff M.R. (Eds.), *Toxines émergentes: nouveaux risques*, Collection Rencontres en Toxinologie, Librairie Lavoisier, Paris, France, pp. 117-22.
- Levasseur M., Berard-Therriault L., Bonneau E., Roy S. (1998) Distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* in the Gulf of St. Lawrence, Canada. In: Reguera B., Blanco J., Fernández M.L., Wyatt T. (Eds.), *Harmful Algae*, Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Vigo, Spain, pp. 54-7.
- MacKenzie L., White D., Oshima Y., Kapa J. (1996) The resting cyst and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in New Zealand. *Phycologia* 35:148-55.
- MacKinnon S.L., Cembella A.D., Quilliam M.A., LeBlanc P., Lewis N.I., Hardstaff W.R., Burton I.W., Walter J.A. (2004) The characterization of two new spirolides isolated from Danish strains of the toxigenic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. In: Steidinger K.A., Landsberg J.H., Tomas C.R., Vargo G.A. (Eds.), *Harmful Algae 2002*, Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, St. Petersburg, FL, USA, pp. 186-8.
- MacKinnon S.L., Walter J.A., Quilliam M.A., Cembella A.D., LeBlanc P., Burton I.W., Hardstaff W.R., Lewis N.I. (2006) Spirolides isolated from Danish strains of the toxigenic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *J. Nat. Prod.* 69:983-7.
- Maclean C., Cembella A., Quilliam M.A. (2003) Effects of light, salinity and inorganic nitrogen on cell growth and spirolide production in the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Botanica Marina* 46:466-76.
- Metfies K., Huljic S., Lange M., Medlin L.K. (2005) Electrochemical detection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* with a DNA-biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 20:1349-57.
- Molgó J., Girard E., Benoit E. (2006) Les imines cycliques d'origine marine et la pharmacopée naturelle. In : Goudey-Perrière F., Benoit E., Goyffon M., Marchot P. (Eds.), *Toxines et cancer*, Collection Rencontres en Toxinologie, Librairie Lavoisier, Paris, France, pp. 107-16.
- Molgó J., Girard E., Benoit E. (2007) The cyclic imines : an insight into this emerging group of bioactive marine toxins. In: Botana L. (Ed.), *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*, Blackwell Publishing, Iowa, USA, pp. 319-35.
- Munday R., MacKinnon S., LeBlanc P., Quilliam M.A. (2004) Unpublished observations, Ag Research, Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand and Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada, Halifax, Nova Scotia, Canada.
- Richard D., Arsenault E., Cembella A., Quilliam M.A. (2001) Investigations into the toxicology and pharmacology of spirolides, a novel group of shellfish toxins. In : Hallegraeff G.M., Blackburn S.I., Bolch C.J., Lewis R.J. (Eds.), *Harmful Algal Blooms 2000*, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, France, pp. 383-6.
- Ruehl A., Hummert C., Gerdts G., Luckas B. (2001) Determination of new algal neurotoxins (spirolides) near the Scottish east coast. In : *International Council for the Exploration of the Sea publications*, 2001 C.M. documents (Oslo, Norway), Copenhagen, Denmark, S:09.
- Steidinger K.A., Tangen K. (1996) Dinoflagellates. In : Tomas C.R. (Ed.), *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*, Academic Press, New York, USA, pp. 387-598.
- Taylor F.J.R., Fukuyo Y., Larsen J. (1995) Taxonomy of harmful dinoflagellates. In : Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*, UNESCO Manuals & Guides 33, Paris, France, Chpt 15, pp. 283-317.
- Villar González A., Rodríguez-Velasco M.L., Ben-Gigirey B., Botana L.M. (2006) First evidence of spirolides in Spanish shellfish. *Toxicon* 48:1068-74.
- Woloszynska J., Conrad W. (1939) *Pyrodinium phoneus* n. sp., agent de la toxicité des moules du canal maritime de Bruges a Zeebrugge. *Bull. Mus. Hist. Nat. Belg.* 15:1-5.

Cnidarian toxins acting on the cholinergic system

Klara BULC ROZMAN¹, Dušan ŠUPUT^{1*}, Jordi MOLGO², Evelyne BENOIT²

¹ Institute of Pathophysiology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia ; ² CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard - FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire - UPR9040, Gif-sur-Yvette, France.

* Corresponding author ; Tel : +386 (0) 1 543 77 02 ; Fax : +386 (0) 1 543 77 01 ; E-mail : dusan.suput@mf.uni-lj.si

Abstract

Cnidarian toxins, especially toxins from corals, comprise a great number of diverse substances including proteins and secondary metabolites. Only a small portion of those substances has been pharmacologically well characterized and, despite the richness and diversity of cnidarian toxins, only a few studies have been dealing with those acting on the cholinergic system. Here, we describe cnidarian toxins acting on acetylcholine receptors, acetylcholinesterase and choline acetyltransferase. The search in the literature revealed no report on cnidarian toxins acting directly on vesicular transport or exocytosis of acetylcholine, except for some toxins that act either on K^+ current or intracellular Ca^{2+} activity in nerve terminals, which is beyond the scope of this review. The possible use of cnidarian toxins acting on the cholinergic system in the treatment of neurodegenerative disorders is also described.

Toxines de Cnidaïres agissant sur le système cholinergique

Les toxines de Cnidaïres, surtout celles provenant des coraux, comprennent un grand nombre de substances diverses, incluant des protéines et des métabolites secondaires. Seule une petite portion de ces substances a été bien caractérisée pharmacologiquement et, en dépit de la richesse et de la diversité des toxines de Cnidaïres, seules quelques études concernaient des toxines agissant sur le système cholinergique. Ici, nous décrivons des toxines de Cnidaïres agissant sur les récepteurs de l'acétylcholine, l'acétylcholinestérase et la choline acétyltransférase. Dans la littérature, aucun rapport ne mentionne des toxines de Cnidaïres agissant directement sur le transport vésiculaire ou l'exocytose de l'acétylcholine, à l'exception de quelques toxines agissant sur le courant K^+ ou l'activité intracellulaire du Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses, ce qui est en dehors du sujet de cette revue. L'utilisation possible des toxines de Cnidaïres agissant sur le système cholinergique dans le traitement de certains désordres neurodégénératifs est aussi décrite.

Keywords : Cnidarian toxins, cholinergic system, acetylcholine receptors, acetylcholinesterase, secondary metabolites.

Introduction

Implications of cholinergic system in neurodegenerative diseases are well established, and new studies are opening new perspectives for the use of natural substances as remedies for these diseases. On one hand, the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is the preferential target for analgesia and smoking cessation (Lloyd and Williams, 2000) as well as for cognition enhancement in Alzheimer's disease (Kem, 2000). On the other hand, acetylcholinesterase inhibitors have been proposed to enhance cognition in dementia (Liepelt *et al.*, 2007) and to arrest progression of Alzheimer's disease (Lahiri *et al.*, 2004). Some of the cnidarian toxins are acting on either acetylcholinesterase (AChE) or acetylcholine receptor (AChR), which makes them candidates for the development of new neuropharmacological agents.

Cnidarians (Cnidaria) are a phylum of invertebrates with unique feature – the nematocyst. These specialised cells contain venom to either kill prey or to defend from feasible predators. Some of these venoms are lethal for humans (e.g. *Chironex fleckeri* ; Tibballs, 2006), while encountering other cnidarians provokes only some skin reactions (Burke, 2002). The venoms consist of different

proteins, enzymes and secondary metabolites as well as other pharmacologically active molecules. Methods for nematocysts purification from animals have been developed only recently. Therefore, most of the known cnidarian toxins have been isolated from the whole animal or tentacle extracts. Two groups of cnidarian toxins were intensively studied : toxins affecting ionic channels of excitable membranes (reviewed by Honma and Shiomi, 2005) and pore-forming cytotoxins (reviewed by Anderluh and Macek, 2002). Between 1980 and 2005, 370 secondary metabolites were isolated from different cnidarians of the South China Sea (Zhang *et al.*, 2006). Among these 370 compounds, only cembranoids, stolonidiol and suberogorgin were tested for their activity on the cholinergic system.

This review describes the cnidarian toxins reported to affect specific components of the cholinergic system. The search inquiry included toxins from corals, sea anemones and hydroids. Their targets were narrowed by cholinergic system specific proteins : choline acetyltransferase (ChAT), vesicular acetylcholine transporter, AChR, AChE, and choline transporter. No cnidarian toxins affecting vesicular acetylcholine transporter or choline transporter were found. Cnidarian toxins acting on AChR, AChE and ChAT are described below (Figure 1).

Cnidarian toxins acting on the acetylcholine receptor

The AChR is an integral protein in postsynaptic membranes whose activity is crucial for the action potential transduction across the synapses in the cholinergic system, and whose dysfunction is a life-threatening condition. Thus, it is not surprising that AChR is the target of different predators' toxins. Cnidarians are also predators, and some of their toxins were found to affect AChR. Cembranoids, whose thorough research helped to identify amino acids in acetylcholine recognition site on the nicotinic AChR (Abramson *et al.*, 1989), are the most studied. Nicotinic AChR (nAChR) activity is affected also by the high molecular weight proteins from *Physalia physalis* (Menendez *et al.*, 1990) and from *Condylactis gigantea* (Gareteix *et al.*, 1992) tentacle extracts. On the contrary, the low molecular fraction from *Cassiopea xamachana* nematocyst venom was found to bind to muscarinic AChR (Radwan *et al.*, 2005).

Cembranoids

Cembranoids are small cyclic diterpenes from gorgonian corals (class Anthozoa, order Scleractinia). They are either non competitive nAChR antagonists isolated from *Plexaura*, *Pseudoplexaura* and *Eunicea* species (Hann *et al.*, 1998) or irreversible competitive nAChR antagonists, namely lophotoxin (Figure 2-1) and its analogues isolated from *Lophogorgia* and *Pseudopterogorgia* species (Abramson *et al.*, 1991). Lophotoxins were shown to irreversibly block different types of nAChR of Vertebrates and invertebrates. Only in the case of insect nAChR, the block is partially irreversible, and nematode nAChR is insensitive to the block (Tørnøe *et al.*, 1995, 1996). Blocking of nAChR can be prevented by prior occupation of receptors with competitive agonists and antagonists of nAChR, but not with non competitive antagonists (Sorenson *et al.*, 1987 ; Abramson *et al.*, 1988). This indicates that lophotoxin binds to acetylcholine binding site on nAChR. Studies with radiolabeled lophotoxin and lophotoxin analog-1 revealed covalent binding to alpha-subunit of nAChR, more specifically to Tyr¹⁹⁰ by *Torpedo* numbering (Abramson *et al.*, 1988, 1989). These findings were also confirmed with the observed insensitivity of nematode nAChR to lophotoxins since in their nAChR Tyr¹⁹⁰ is substituted by Pro¹⁹⁰. The blocking effect of lophotoxins on nAChR was surprising since cembranoids do not contain nitrogen like other known nAChR antagonists.

In 1991, Abramson *et al.* evaluated the ability of 18 naturally occurring and 7 semi-synthetic lophotoxin analogues to inhibit the binding of [¹²⁵I]-alpha-bungarotoxin (a competitive nAChR antagonist) to *Torpedo* electric organ nAChR, revealing some inactive analogues. Structure comparison showed that inactive analogues are without C7-C8 epoxide or lactone oxygen, which mimics acetylcholine (ACh). The earlier mimics quaternary ammonium group of ACh, while the later ACh's acetate oxygens (Abramson *et al.*, 1991). This feature is also missing in the other cembranoid group, the reversible non competitive nAChR antagonists. They are incapable to inhibit binding of [¹²⁵I]-alpha-bungarotoxin to *Torpedo* electric organ nAChR, but inhibit the binding of [piperidyl-3,4-H³]-phencyclidine, a non competitive nAChR antagonist (Eterovic *et al.*, 1993 ; Hann *et al.*, 1998). The most potent inhibitor was methylpseudoplexaurate (Figure 2-2) with an IC₅₀ of 0.9 ± 0.1 µM, while lophotoxin's IC₅₀ was 371.6 ± 35.9 µM (Hann *et al.*, 1998). The effect of non competitive cembranoids on ACh-induced currents, flowing through

Torpedo nAChR expressed in oocytes, was reversible, but the toxin perfusion lasted maximally 70 s while in experiments showing an irreversible effect of lophotoxin, incubation period of the toxin was 25 min or more (Sorenson *et al.*, 1987).

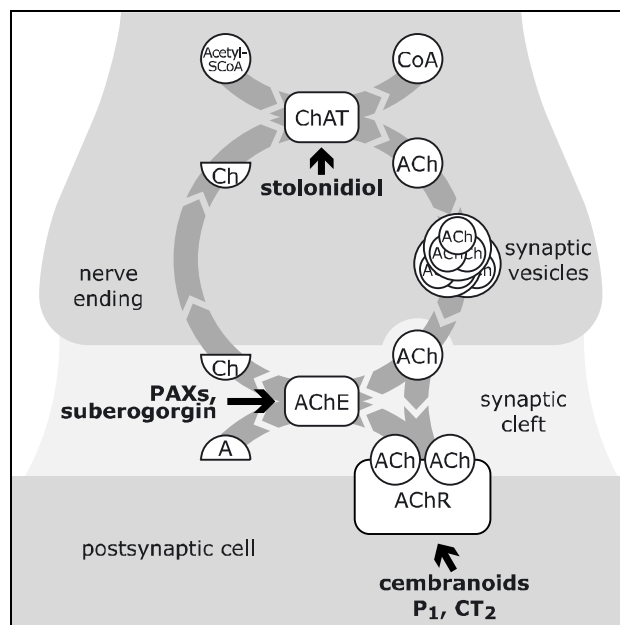


Fig. 1. Components of cholinergic system affected by cnidarian toxins. Acetylcholine (ACh) is synthesised from acetyl (A), carried by coenzyme A (CoA), and choline (Ch) by acetylcholine transferase (ChAT). This enzyme is affected by stolonidiol. ACh is then stored in synaptic vesicles. Upon fusion of vesicles with the nerve ending membrane, ACh is released into synaptic cleft where it binds to acetylcholine receptors (AChR). The interaction between ACh and AChR is inhibited by cembranoids, *Physalia*-toxin (P₁) and condytoxina-2 (CT₂). Finally, ACh is hydrolysed to Ch and acetate by acetylcholinesterase (AChE) which is inhibited by zoanthoxanthines (PAXs) and, to a lesser extent, by suberogorgin.

Fig. 1. Les composants du système cholinergique affectés par les toxines de Cnidaires. L'acétylcholine (ACh) est synthétisée à partir de l'acétyl (A), porté par la co-enzyme A (CoA), et de la choline (Ch) par l'acétylcholine transférase (ChAT). Cette enzyme est affectée par le stolonidiol. L'ACh est ensuite stockée dans les vésicules synaptiques. Lors de la fusion des vésicules avec la membrane de la terminaison nerveuse, l'ACh est libérée dans la fente synaptique où elle se fixe aux récepteurs de l'acétylcholine (AChR). L'interaction entre l'ACh et les AChR est inhibée par les cembranoides, la toxine de *Physalia* (P₁) et la condytoxina-2 (CT₂). Finalement, l'ACh est hydrolysée en Ch et en acétate par l'acétylcholinestérase (AChE) qui est inhibée par les zoanthoxanthines (PAXs) et, dans une moindre mesure, par la suberogorgine.

Physalia physalis

Physalia-toxin (P₁) is a purified component of highest molecular fraction (F₁) of tentacle extract of *Physalia physalis* (class Hydrozoa, order Siphonophora) with reversible non competitive antagonistic effect on nAChR (Menendez *et al.*, 1990). P₁ reversibly blocked ACh responses of ACh sensitive mollusc nerves in a dose dependent way, while glutamate responses of glutamate sensitive mollusc neurons were unaffected. The toxin also had a similar blocking action regardless whether the end plate potential was evoked by either iontophoretically applied ACh or ACh released from the nerve ending. The rate of blockade was similar for different ACh doses. These results show that P₁ has a selective effect on postsynaptic membrane and that its target is nAChR.

Condytoxina-2

Condytoxina-2 (CT₂), a high molecular weight toxin from *Condylactis gigantea* (class Anthozoa, order Actiniaria), has a dual effect on nAChR (Gareteix *et al.*, 1992). Concentrations below 25 nM blocked ACh responses of ACh sensitive mollusc nerves and mice neurons, while higher concentrations potentiated ACh responses in both preparations. All effects were concentration-dependent and reversible by washing the preparations. The mechanism of this dual action reported by Gareteix *et al.* (1992) was not further explored.

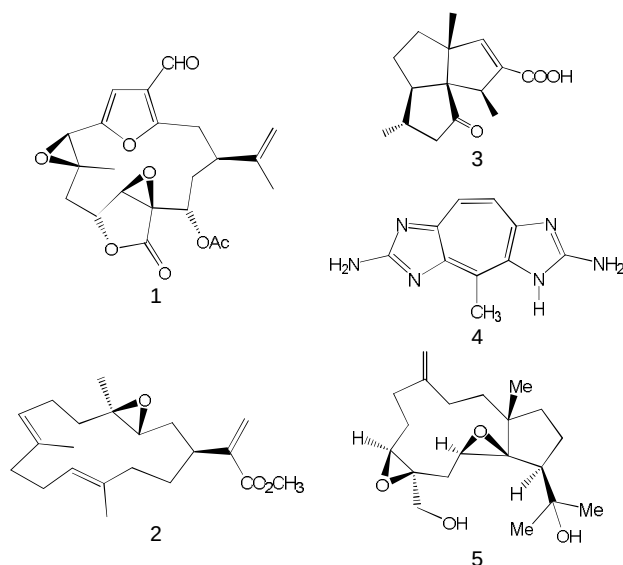


Fig. 2. Non-protein substances affecting cholinergic system : lophotoxin (1), methylpseudoplexaurate (2), suberogorgin (3), parazoanthoxanthin A (4), and stolonidiol (5).

Fig. 2. Les substances non protéiques affectant le système cholinergique : la lophotoxine (1), le méthylpseudoplexaurate (2), la suberogorgine (3), le parazoanthoxanthine A (4) et le stolonidiol (5).

Cassiopea xamancha

Low protein fraction IV from *Cassiopea xamancha* (class Scyphozoa, order Rhizostomeae) venom was found to inhibit [³H]-N-methylscopolamine (a non selective muscarinic antagonist) binding to rat brain synaptosomes (Radwan, 2005). A 12 ± 2% inhibition was achieved by 100 µg of protein per mL. This fraction also exhibited high hemolytic activity (61.5 ± 2% of total hemolysis). Muscarinic toxin from *Cassiopea xamancha* extracts was also described previously by Karlsson *et al.* (1991), but the low molecular weight toxin was of non-peptide nature. Similar toxins were mentioned to have been found in extracts from some other cnidarians (Karlsson *et al.*, 1991), too.

Cnidarian toxins acting on the acetylcholinesterase

AChE activity is important for termination of ACh action on nicotinic and muscardinic receptors in the cholinergic system. Only a few substances affecting this enzyme were isolated from Cnidarians. Suberogorgin is a non competitive inhibitor (Peng *et al.*, 1996), while some zoanthoxanthins are competitive inhibitors (Turk *et al.*, 1995 ; Sepcic *et al.*, 1998). Karlsson (1991) reported low molecular, non-peptidic anticholinesterase toxins in the extracts of *Physalia physalis*, and *Cassiopea xamancha*, and of the sea anemones *Stichodactyla*

helianthus and *Bunodosoma granulifera* (class Anthozoa, order Actiniaria). Unfortunately, we found no detailed description of these toxins.

Suberogorgin

Suberogorgin (Figure 2-3) is a selective non competitive AChE inhibitor with galanthamine-like potency (Peng *et al.*, 1996). Suberogorgin is a secondary metabolite produced by *Suberogorgia* species (class Anthozoa, order Gorgonacea). It reversibly inactivates different AChE, but displays no effect on human butyrylcholinesterase. The carboxyl terminal of suberogorgin presumably forms hydrogen bonds with carboxyl located in AChE peripheral region, which is missing in butyrylcholinesterase. This proposed mechanism of action explains the selectivity and simple reversibility of suberogorgin by centrifugation.

Zoanthoxanthins

Zanthoxanthins are tetrazacyclopentazulenes isolated from several genera of *Zoanthidea* order (class Anthozoa; Turk *et al.*, 1995). Up to date, AChE inhibitory activity has been assessed only for parazoanthoxanthin A (Figure 2-4 ; Sepcic *et al.*, 1998) and for the pseudozoanthoxanthin-like compound isolated from *Parazoanthus axinellae* (Turk *et al.*, 1995 ; Strupi Šuput *et al.*, 1996). The later was shown to be more potent with an inhibitory constant of 3.5 - 4 µM comparing to 26 µM of parazoanthoxanthin A (both Ellman's method with electric eel AChE). The difference in potency might arise from different positions of side cycles and/or from differences in the tertiary structure of molecules.

Cnidarian toxins acting on the choline acetyltransferase

ChAT function in cholinergic system is the synthesis of ACh from choline and acetyl coenzyme A. The only cnidarian substance with known effect on ChAT is stolonidiol. In cultured basal forebrain cells, 0.01 to 1 µg/mL of stolonidiol, a diterpenoid from *Clavularia* sp. (Figure 2-5), up-regulated mRNA expression and also the activity of ChAT, while higher concentrations reduced ChAT activity (Yabe *et al.*, 2000).

Conclusion

There are only few characterised cnidarian toxins that are known to affect the cholinergic system, but the effects of most of those toxins were only briefly described. As the cholinergic system is involved in many neurodegenerative disorders, the toxins acting on this system should be valuable tools to explore the possible therapeutic applications of either the original substances or their synthetic derivatives. Therefore, a more thorough investigation of the known substances, as well as the search for new toxins acting on the cholinergic system, is of great importance.

Acknowledgements. This work was supported by the grant P-3-0019 from the Slovenian Research Agency (ARRS), and by the Proteus Program (BI-FR/08-09-Proteus-010 / EGIDE-17933YD).

References

- Abramson S.N., Culver P., Kline T., Li Y., Guest P., Gutman L., Taylor P. (1988) Lophotoxin and related coral toxins covalently label the α -subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 263:18568-73.
- Abramson S.N., Li Y., Culver P., Taylor P. (1989) An analog of lophotoxin reacts covalently with Tyr190 in the α -subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 264:12666-72.
- Abramson S.N., Trischman J.A., Tapiolas D.M., Harold E.E., Fenical W., Taylor P. (1991) Structure/activity and molecular

- modeling studies of the lophotoxin family of irreversible nicotinic receptor antagonists. *J. Med. Chem.* 34:1798-804.
- Anderluh G., Macek P. (2002) Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* 40:111-24.
- Burke, W.A. (2002) Cnidarians and human skin. *Dermatol. Ther.* 15:18-25.
- Eterovic V.A., Hann R.M., Ferchmin P.A., Rodríguez A.D., Li L., Lee Y.H., McNamee M.G. (1993) Diterpenoids from Caribbean gorgonians act as noncompetitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2:99-110.
- Garateix A., Castellanos M., Hernández J.L., Más R., Menéndez R., Romero L., Chávez M. (1992) Effects of a high molecular weight toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* on cholinergic responses. *Comp. Biochem. Physiol. C* 103:403-9.
- Hann R.M., Pagán O.R., Gregory L., Jácome T., Rodríguez A.D., Ferchmin P.A., Lu R., Eterovic V.A. (1998) Characterization of cembranoid interaction with the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287:253-60.
- Honma T., Shiomi K. (2006) Peptide toxins in sea anemones: structural and functional aspects. *Mar. biotechnol. (NY)* 8:1-10.
- Karlsson E., Risinger C., Jolkkonen M., Wernstedt C., Adem A. (1991) Amino acid sequence of a snake venom toxin that binds to the muscarinic acetylcholine receptor. *Toxicon* 29:521-6.
- Kem W.R. (2000) The brain $\alpha 7$ nicotinic receptor may be an important therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease: studies with DMXBA (GTS-21). *Behav. Brain. Res.* 113:169-83.
- Lahiri D.K., Rogers J.T., Greig N.H., Sambamurti K. (2004) Rationale for the development of cholinesterase inhibitors as anti-Alzheimer agents. *Curr. Pharm. Des.* 10:3111-9.
- Liepert I., Maetzler W., Blaicher H.P., Gasser T., Berg D. (2007) Treatment of dementia in parkinsonian syndromes with cholinesterase inhibitors. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 23:351-67.
- Lloyd G.K., Williams M. (2000) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as novel drug targets. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292:461-7.
- Menéndez R., Mas R., Garateix A., García M., Chavez M. (1990) Effects of a high molecular weight polypeptidic toxin from *Physalia physalis* (Portuguese man-of-war) on cholinergic responses. *Comp. Biochem. Physiol. C* 95:63-9.
- Peng W.D., Xu S.B., Peng X. (1996) Inhibitory effect of suberogorgin on acetylcholinesterase. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 17:369-72.
- Radwan F.F., Román L.G., Baksi K., Burnett J.W. (2005) Toxicity and mAChRs binding activity of *Cassiopea xamachana* venom from Puerto Rican coasts. *Toxicon* 45:07-12.
- Sepcic K., Turk T., Macek P. (1998) Anticholinesterase activity of the fluorescent zoanthid pigment, parazoanthoxanthin A. *Toxicon* 36:937-40.
- Sorenson E.M., Culver P., Chiappinelli V.A. (1987) Lophotoxin: selective blockade of nicotinic transmission in autonomic ganglia by a coral neurotoxin. *Neuroscience* 20:875-84.
- Strupi Suput J., Turk T., Macek P., Suput D. (1996) Pseudozoanthoxanthin-like compound from *Parazoanthus axinellae Adriaticus* inhibits acetylcholinesterase. *Pflugers Arch.* 431(Suppl 2):R315-6.
- Tibballs J. (2006) Australian venomous jellyfish, envenomation syndromes, toxins and therapy. *Toxicon* 48:830-59.
- Tornøe C., Bai D., Holden-Dye L., Abramson S.N., Sattelle D.B. (1995) Actions of neurotoxins (bungarotoxins, neosurugatoxin and lophotoxins) on insect and nematode nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon* 33:411-24.
- Tornøe C., Holden-Dye L., Garland C., Abramson S.N., Fleming J.T., Sattelle D.B. (1996) Lophotoxin-insensitive nematode nicotinic acetylcholine receptors. *J. Exp. Biol.* 199:2161-8.
- Turk T., Macek P., Suput D. (1995) Inhibition of acetylcholinesterase by a pseudozoanthoxanthin-like compound isolated from the zoanthid *Parazoanthus axinellae* (O. Schmidt). *Toxicon* 33:133-42.
- Yabe T., Yamada H., Shimomura M., Miyaoka H., Yamada Y. (2000) Induction of choline acetyltransferase activity in cholinergic neurons by stolonioid: structure-activity relationship. *J. Nat. Prod.* 63:433-5.
- Zhang W., Guo Y.W., Gu Y. (2006) Secondary metabolites from the South China Sea invertebrates: chemistry and biological activity. *Curr. Med. Chem.* 13:2041-90.

Fluorescent cholinergic agonists for functional studies of nicotinic receptor

Elias SAKR¹, Sébastien CHARON¹, Florian KRIEGER¹, Jordi RODRIGO², Maurice GOELDNER^{1*}

¹ Laboratoire de Chimie Bioorganique, UMR 7175 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, Strasbourg ;

² Département de Modélisation Moléculaire, CERMN, Faculté de Pharmacie, Université de Caen, Caen, France.

* Corresponding author ; Tel : +33 (0)390244162 ; Fax : +33 (0)390244306 ; E-mail : goeldner@bioorga.u-strasbg.fr

Abstract

The design and synthesis of fluorescent cholinergic agonists for different types of nicotinic receptors are described. Total synthesis of epibatidine derivatives substituted at position C-3 of the pyridine ring of this alkaloid, allowed us to incorporate fluorescent tags while retaining agonist properties for the neuronal $\alpha 4\beta 2$ subtype and muscle type receptors. To target the $\alpha 7$ receptor subtype, we used quinuclidine derivatives known for their agonist potencies, and based on molecular modelling results, we designed fluorescent derivatives in a similar manner to the epibatidine derivatives. Finally, we investigated newly synthesized fluorescent acylcholine derivatives which displayed agonist properties on the Torpedo receptor expressed in *Xenopus* oocytes and high affinity on Torpedo membranes.

Synthèses d'agonistes cholinergiques fluorescents pour l'étude fonctionnelle de récepteurs nicotiniques

La conception et la synthèse d'agonistes cholinergiques fluorescents pour différents récepteurs nicotiniques sont décrites. La synthèse totale de dérivés d'épibatidine, substitués en position C-3 du cycle pyridine de cet alcaloïde, a permis d'incorporer des étiquettes fluorescentes tout en conservant les propriétés agonistes pour les récepteurs neuronaux du sous-type $\alpha 4\beta 2$ ainsi que pour les récepteurs musculaires. Pour les récepteurs neuronaux $\alpha 7$, nous partons de dérivés de la quinuclidine, connus pour leurs propriétés agonistes potentielles sur ce sous-type de récepteur. A partir de données de modélisation moléculaire, nous avons conçu la synthèse de dérivés fluorescents par des modifications chimiques analogues à celles effectuées sur l'épibatidine. Finalement, nous avons synthétisé des dérivés d'acétylcholine fluorescents qui sont de puissants agonistes pour les récepteurs de torpille exprimés dans l'ovocyte de xénope, de plus ces dérivés possèdent une forte affinité pour les récepteurs purifiés à partir de membranes de torpille.

Keywords : Total syntheses, time-resolved fluorescence, screening of chemical libraries.

Introduction

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are ligand-gated ion channels mediating fast synaptic transmission at neuronal and neuromuscular junctions. Selective binding of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) at this pentameric transmembrane receptor complex triggers an action potential after transient opening of a cation-sensitive channel operating within this receptor complex. Although structural changes have been observed during receptor activation, the molecular mechanism of this process remains to be elucidated and requires the use of appropriate detection techniques, *i.e.* time resolved fluorescence. To be useful, such fluorescent probes require displaying agonist or at least partial agonist properties on the nAChRs. Consequently, we have undertaken chemical modifications of various characteristic nicotinic agonists to incorporate fluorescent tags. The syntheses of these molecules will be described briefly along with their functional properties for several nAChRs.

Epibatidine derivatives to target neuronal $\alpha 4\beta 2$ subtype and muscular receptors

In 1976, John Daly and colleagues discovered the existence of epibatidine (EPB), a toxin extracted from the skin of an equatorial frog : *Epipedobates tricolor*.

Nevertheless, the structure of this alkaloid was determined many years later (Spande *et al.*, 1992). The remarkable analgesic properties of EPB prompted intense efforts by pharmaceutical companies for the discovery of non-opioid analgesics, lacking its toxicity. EPB is a powerful agonist for most nAChRs, mediating its biological effect mainly through the neuronal $\alpha 4\beta 2$ subtype, at which it is highly potent (Jensen *et al.*, 2005). Studies on EPB structure-activity relationship revealed that position C-3 position of the pyridine ring could be modified with no major loss of affinity (Carroll *et al.*, 2004), while incorporation of aromatic groups at this position, generated potent antagonists (Carroll, 2004). As a lead compound, we used an EPB derivative substituted at the C-3 position of the pyridine ring by an α -amino acetamido group (Figure 1) (Grandl *et al.*, 2007). Modification of this group by a spacer which is linked or which can be coupled to a fluorophore, allowed us to synthesize a series of fluorescent EPB derivatives, including hydroxy coumarins and Cy-3 or Cy-5 derivatives.

The affinity and efficacy of these probes for the nAChRs were established from radioligand binding and electrophysiology data, as summarized in Tables 1 and 2, respectively.

These binding studies (Table 1) revealed that all these derivatives displayed a strong selectivity for the rat brain membranes containing mainly the $\alpha 4\beta 2$

subtype, with K_i 's in the nM range for the coumarin derivatives. Clearly the $\alpha 4\beta 2/\alpha 7$ selectivity, well described for the EPB molecule, is retained for the fluorescent derivatives.

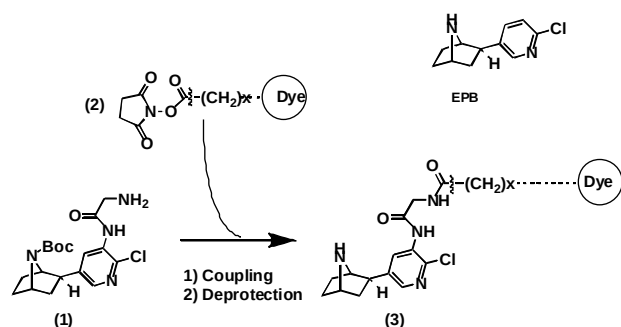


Fig. 1. General structure of fluorescent EPB derivatives (**3**). Conjugation of an aminoacetamido EPB derivative (**1**) with NHS ester-activated fluorescent dyes (**2**) yields, after deprotection, fluorescently labelled EPB (**3**), comprising coumarin (EPB-Cou), 6-chlorocoumarin (EPB-Cl-Cou), Cy3 (EPB-Cy3), Cy5 (EPB-Cy5) or Atto 610 (EPB-Atto 610).

Fig. 1. Structure générale des EPB fluorescentes (**3**). La conjugaison d'un dérivé aminoacétamido EPB (**1**) avec des fluorophores portant des esters activés de type NHS (**2**) conduit à la formation de dérivés EPB fluorescents (**3**) dont une coumarine (EPB-Cou), 6-chlorocoumarine (EPB-Cl-Cou), Cy3 (EPB-Cy3), Cy5 (EPB-Cy5) ou Atto 610 (EPB-Atto 610).

Table 1. Inhibition constants K_i (nM) of fluorescent EPB ligands for different nAChRs determined from radioligand competition binding assays.

Tableau 1. Constantes d'inhibition K_i (nM) des ligands EPB fluorescents pour différents nAChR, déterminées par des tests de liaison.

Ligand	$\alpha 4\beta 2$ ^[a] rat brain	$\alpha 7$ -5HT ₃ R ^[b] chicken/mouse	$\alpha 2\beta\gamma\delta$ ^[b] Torpedo
EPB	0.37±0.19 ^[c]	75± 13 ^[c]	51.6±9.5 ^[c]
EPB-Cou	8.5	n.d.	16 ×10 ³
EPB-Cl-Cou	4.75	25 × 10 ³	(10.4±8.9) ×10 ³
EPB-Cy3	44	> 1 × 10 ³	(93±16) × 10 ³ ^[c]
EPB-Cy5	73±34 ^[c]	n.d.	n.d.

[a] Inhibition of [³H]cytisine binding to rat-brain membranes by the indicated ligands ; $\alpha 4\beta 2$ is the predominant nAChR in rat brain. **[b]** Protection by the ligands for [¹²⁵I]- α -bungarotoxin binding to $\alpha 7$ -5HT₃R in membranes of HEK293 cells or $\alpha 2\beta\gamma\delta$ nAChR in membranes of the electric organ of *Torpedo*. n.d.: not determined. **[c]** Data are given as average or means ± standard deviation from two or three experiments.

The ability of the fluorescent EPB derivatives to activate the nAChRs was determined by electrophysiology either on receptors expressed in *Xenopus* oocytes (rat neuronal $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 7$ subtypes) or in HEK293 cells (human muscular $\alpha 2\beta\gamma\delta$ receptor ; Table 2). Conjugation of the fluorescent group to EPB decreased the efficacy for the neuronal nAChRs by several orders of magnitude compared to EPB. According to the binding data, the fluorescent EPB molecules displayed no activity for the $\alpha 7$ subtype. Alternatively, these molecules act as partial or even full agonists on a "mutant gain of function" muscular receptor with EC₅₀ values comparable to EPB itself.

Altogether, this work has led to the design and the synthesis of fluorescent EPB derivatives which retained partial or full agonist properties on neuronal $\alpha 4\beta 2$ and muscular nicotinic receptors.

Table 2. nAChR subtype activation by fluorescent EPB conjugates^[a].

Tableau 2. Activation des sous-types de nAChR par les dérivés fluorescents d'EPB ^[a].

Ligand	$\alpha 4\beta 2$ ^[b] rat	$\alpha 3\beta 4$ ^[b] rat	$\alpha 7$ ^[c]	$\alpha 2\beta\gamma\delta$ ^[d] human
EPB	23 ± 7	19 ± 6	(2±0.5) × 10 ³	53±4
EPB-Cou	59%	n.d.	0%	26±5
EPB-Cl-Cou	31%	85%	0%	29±4
EPB-Atto 610	n.d.	n.d.	0%	127±30 (50%)
EPB-Cy3	n.d.	n.d.	0%	115±24 (52%)
EPB-Cy5	≤ 2%	25%	0%	30±10

[a] EC₅₀ values in nM stem from concentration–current curves. If no complete curve has been measured, the channel current evoked by 1 μ M of ligand is listed as % -value of the current evoked by 100 μ M ACh. Partial agonism is indicated in parentheses as % of maximal activation evoked by 100 μ M ACh. n.d.: not determined. **[b]** Rat $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 3\beta 4$ receptors were expressed in oocytes. **[c]** EPB and EPB-Cou were investigated on rat $\alpha 7$ receptor expressed in oocytes, the remaining ligands on $\alpha 7$ -5HT₃R chimeric receptors in HEK293 cells. **[d]** Human fetal muscle nAChR gain of function mutant δ S268K was expressed in HEK293 cells.

Quinuclidine derivatives to probe the neuronal $\alpha 7$ subtype

Neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptors being involved in several neurodegenerative disorders, therefore, they have been subjected to intense therapeutic research (Faghih *et al.*, 2008). The search for receptor subtype selective ligands has led to the description of quinuclidine derivatives as $\alpha 7$ -selective ligands (Mazurov *et al.*, 2005). Interestingly, these active molecules contained a pyridine ring on the quinuclidine backbone, suggesting occurrence of similar interactions between the quinuclidine molecules and EPB at the $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ receptor subtypes, respectively. To address this issue in more molecular details, we docked the EPB and the quinuclidine molecules in a nAChR model built after the 3D X-ray structure of AChBP (Figure 2).

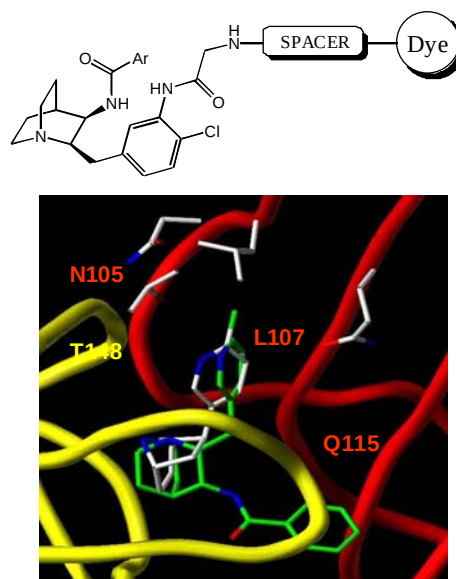


Fig. 2. Overlap docking of EPB (white) and quinuclidine derivative (green) in $\alpha 7$ receptor model.

Fig. 2. Docking de l'EPB (blanc) et d'un dérivé de quinuclidine (vert) superposés dans un modèle du récepteur $\alpha 7$.

Analyses of these docking models suggest that both protonated amines (quaternary ammonium binding of ACh) and the pyridine rings of these two derivatives could overlap within the receptor. This model suggests that, similar to the EPB molecule, chemical modification at the C-3 of the pyridine ring (see structure below) could be undertaken on the quinuclidine ligands without affecting dramatically their biological properties. The syntheses of these molecules are in progress.

Fluorescent acylcholine derivatives as *Torpedo* nAChR agonists

Fluorescent agonists which are potent on *Torpedo* receptor would offer a unique possibility to study the allosteric transitions occurring during receptor activation. Alternatively, these probes will be useful for the screening of chemical libraries and might offer a way to identify new allosteric modulators of this receptor.

Since most agonists for the *Torpedo* receptor are acylcholine derivatives, we undertook the synthesis of a series of such derivatives in varying the nature and the length of the spacer coupled to the fluorophore (Figure 3). To improve the specificity of the fluorescent signal, we used environment-sensitive probes (NBD and DEAC chromo-phores) to study ligand-receptor interactions on native nAChR-rich membranes (Krieger *et al.*, 2008). The length and the nature of the spacer definitively play a determinant role in receptor activation but it is difficult to define clear rules for the structural assignments for *Torpedo* agonists (Table 3).

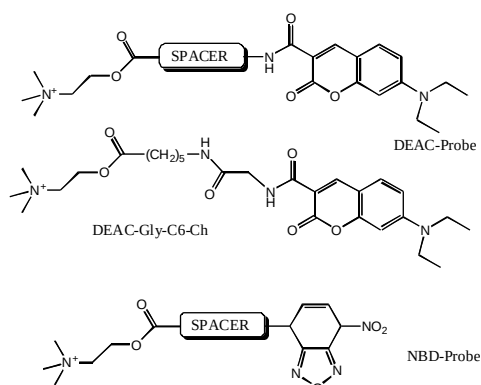


Fig. 3. Fluorescent acylcholine derivatives.

Fig. 3. Dérivés d'acetylcholine fluorescents.

The DEAC-Gly-C6-Ch (13) derivative showed interesting agonist properties on the *Xenopus* expression system. The dose response curve (Figure 4) shows strong receptor activation below 10^{-5} M diminishing progressively at higher concentrations suggesting a possible occurrence of a channel blockade.

DEAC-Gly-C6-Ch binding to *Torpedo* nAChR induces a strong (12-fold) and specific increase in fluorescence intensity (not shown). This enhancement of the fluorescent signal could be assigned to a more hydrophobic environment after binding of the ligand to its site. This specific fluorescent signal allowed us to determine association and dissociation kinetics of the DEAC-Gly-C6-Ch agonist for the desensitized *Torpedo* nAChR, yielding values of $k_{ass} = 2.4 \cdot 10^{-7} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ and $K_d = 0.5 \text{ nM}$.

Conclusion

The design and synthesis of fluorescent nicotinic

agonists aimed at targeting prototypical neuronal, muscular and *Torpedo* nAChRs was undertaken. Specific agonists (epibatidine, quinuclidine derivatives) were used as templates for chemical incorporation of the fluorescent tags. To be suitable for single molecule spectroscopy, probes directed towards neuronal receptors require excellent optical properties (high fluorescence efficiencies at wavelength $\geq 600 \text{ nm}$).

Table 3. Functionalized acylcholine derivatives : structure and electrophysiological data on recombinant *Torpedo* nAChR expressed in *Xenopus* oocyte.

Tableau 3. Dérivés d'acetylcholine fonctionnalisés : structure et données électrophysiologiques sur le nAChR recombinant de *Torpedo* exprimé dans les ovocytes de xénopes.

Ligand	Structure of linker and binding unit ^b	I _{max} ^d
ACh, 1		100%
NBD-C6-Ch, 2		2.3% at 100 μM
Dns-C6-Ch, 3		0.1% at 100 μM
DEAC-C6-Ch, 4		1.0% at 100 μM
DEAC-C4-CCh, 5		no current
NBD-C7-Ch, 6		1.5% at 300 μM
DEAC-Gly-Gaba-Ch, 7		1.5% at 50 μM
DEAC-DAE-succ-Ch, 8		no current
NBD- β Ala-Gaba-Ch, 9		18% at 100 μM
DEAC-C6-CCh, 10		no current
DEAC-Gaba- β Ala-ch, 11		7% at 50 μM
NBD-Gly-C6-Ch, 12		30% at 30 μM
DEAC-Gly-C6-Ch, 13		50% at 30 μM
NBD- β Ala-C6-Ch, 14		11% at 300 μM

Alternatively, probes targeting the *Torpedo* nAChR required the modification of acylcholine derivatives to generate potent agonists. The *Torpedo* receptor can be purified in large quantities from the electric organ of the fish, therefore offering unique possibilities for biochemical experiments. Consequently, we selected environment-sensitive fluorophores to be coupled to the acylcholine moieties, to allow the development of time-resolved fluorescence experiments. A diethylamino

coumarin derivative (DEAC-Gly-C6-Choline) displayed particularly interesting agonist properties combined to the generation of a specific fluorescent signal when binding to the *Torpedo* nAChR. This probe will be extremely useful for the analysis of the allosteric transitions occurring at the nAChR during receptor activation using stopped-flow fluorescence techniques.

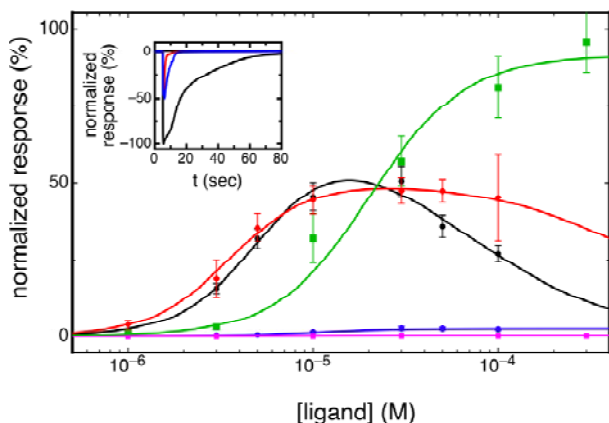


Fig. 4. Dose-response relationships for various fluorescent acetylcholine derivatives on wild-type *Torpedo* nAChR expressed in oocyte. Maximum responses are expressed in % of the maximum response obtained with 300 μ M ACh. ACh (black), DEAC-G-C6-Ch (red), NBD-Gaba-C6-Ch (blue), NBD-C6-Ch (green). Dns-C6-Ch (pink). (Reproduced with permission ; copyright Wiley-VCH Verlag from reference Krieger *et al.*)

Fig. 4. Courbes doses-réponses obtenues pour différents dérivés fluorescents d'acétylcholine sur le nAChR sauvage de torpille exprimé dans l'ovocyte. Les réponses maximales sont exprimées en % de la réponse maximale obtenue avec 300 μ M d'ACh. ACh (noir), DEAC-G-C6-Ch (rouge), NBD-Gaba-C6-Ch (bleu), NBD-C6-Ch (vert). Dns-C6-Ch (rose).

The possibility to synthesize this fluorescent *Torpedo* agonist in large quantities will allow the future

screening of chemical libraries for cholinergic modulators using *Torpedo* membranes. The depiction of allosteric modulators using fluorescence-based stopped-flow experiments becomes theoretically possible with such probes.

Acknowledgements. The authors thank the Université Louis Pasteur, Strasbourg, the CNRS and the AFM for financial support.

References

- Carroll F.I. (2004) Epibatidine structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14:1889-6.
- Carroll F.I., Ware R., Brieady L.E., Navarro H.A., Damaj M.I., Martin B.R. (2004) Synthesis, nicotinic acetylcholine receptor binding, and antinociceptive properties of 2'-fluoro-3'-(substituted phenyl) deschloroepibatidine analogues. Novel nicotinic antagonist. *J. Med. Chem.* 47:4588-94.
- Faghih R., Gopalakrishnan M., Briggs C. (2008) Allosteric modulators of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *J. Med. Chem.* 51:701-12.
- Grandl J., Sakr E., Kotzyba-Hibert F., Krieger F., Bertrand S., Bertrand D., Vogel H., Goeldner M., Hovius R., (2007) Fluorescent epibatidine agonists for neuronal and muscle-type nicotinic acetylcholine receptors. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 46:3505-8.
- Jensen A.A., Frølund B., Liljefors T., Krosgaard-Larsen P. (2005) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications and therapeutic inspirations. *J. Med. Chem.* 48:4705-45.
- Krieger F., Mourot A., Araoz R., Kotzyba-Hibert F., Molgó J., Bamberg E., Goeldner M. (2008) Fluorescent Agonists for the *Torpedo* Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Chembiochem.* 9:1146-53.
- Mazurov A., Klucik J., Miao L., Phillips T.Y., Seamans A., Schmitt J.D., Hauser T.A., Johnson R.T. Jr, Miller C. (2005) 2-(Arylmethyl)-3-substituted quinuclidines as selective $\alpha 7$ nicotinic receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15:2073-7.
- Spande T.F., Garraffo, H.M., Edwards, M.W., Yeh H.J.C., Pannell L., Daly J.W. (1992) Epibatidine : A novel (chloropyridyl) azabicycloheptane with potent analgesic activity from an ecuadoran poison frog. *J. Amer. Chem. Soc.* 114:3475-8.

Utilisation des « protéines liant l'acétylcholine » (AChBP) en toxicologie structurale : nouveaux exemples

Yves BOURNE^{1*}, Zoran RADIC², Todd. T. TALLEY², Sandrine CONROD³, Palmer TAYLOR², Jordi MOLGO⁴, Pascale MARCHOT^{3*}

¹ Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB), CNRS/Universités d'Aix-Marseille I-II, Campus Luminy, Marseille, France ; ² Department of Pharmacology, Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California at San Diego, La Jolla, CA, USA ; ³ Toxines Animales et Cibles Macromoléculaires (ToxCiM), Dept. Signalisation Neuronale, Centre de Recherche en Neurobiologie-Neurophysiologie de Marseille (CRN2M), CNRS/Universités d'Aix-Marseille II-III, Institut Fédératif de Recherche Jean Roche, Marseille, France ; ⁴ Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, Gif-sur-Yvette, France.

* Auteurs correspondants ; ¹ Courriel : yves.bourne@afmb.univ-mrs.fr, Tél : (0) 491 825 566 ;

² Courriel : pascale.marchot@univmed.fr, Tél : (0) 491 698 908

Résumé

Depuis sa découverte en 2001, la « protéine liant l'acétylcholine » (AChBP) a été largement utilisée pour documenter à l'échelle atomique le mode de reconnaissance des toxines naturelles qui représentent des agonistes ou antagonistes puissants du récepteur nicotinique. Nous avons récemment étendu ces études en déterminant les structures cristallines de deux complexes d'AChBP avec de nouvelles toxines marines, des phycotoxines issues de microalgues dinoflagellées. Ces structures révèlent l'étroite complémentarité de ces toxines pour la poche de fixation des ligands nicotiniques en accord avec leur affinité élevée.

Crystal structures of toxin-AChBP complexes

Since its discovery in 2001, the acetylcholine binding protein (AChBP) has been widely used to document the mode of binding of diverse natural toxins that are highly potent agonists or antagonists for the nicotinic receptor. Recently we have extended this overview with the crystal structures of two AChBP complexes with new marine toxins (phycotoxins) originating from dinoflagellate algae. These structures highlight the exquisite complementarity of these toxins for the interfacial pocket where the nicotinic ligands bind, consistent with their high affinity.

Keywords : Acetylcholine binding protein, antagonist, crystal structure, natural toxin, nicotinic receptor.

Introduction

Les imines cycliques de type spirolide et gymnodimine produits par des micro-organismes dinoflagellés représentent une classe émergente de phycotoxines marines et sont responsables de la toxicité accidentelle des mollusques bivalves (Molgó et al., 2006 ; O'Connor et Brimble, 2007). Ces composés, qui portent un groupe imine fonctionnel engagé dans un squelette carboné hétérocyclique complexe, fixeraient les récepteurs nicotiniques (nRACH) et muscariniques à l'ACh. Une étude récente montre que la gymnodimine cible les nRACH et se lie aux sous-types musculaires et neuronaux avec une très haute affinité (Kharrat et al., 2008).

Les « protéines fixant l'ACh » (ACh Binding Proteins, AChBP) sont des homologues structuraux et fonctionnels solubles du domaine extracellulaire des nRACH (Sixma et Smit, 2003). Les trois espèces d'AChBP caractérisées à ce jour (*Lymnea stagnalis*, *Aplysia californica* et *Bulinus truncatus*) présentent des spécificités et affinités distinctes pour les agonistes et antagonistes compétitifs nicotiniques. Elles constituent donc d'excellents outils moléculaires pour la compréhension du mode d'action et l'étude de nouveaux ligands des nRACH (Taylor et al., 2007).

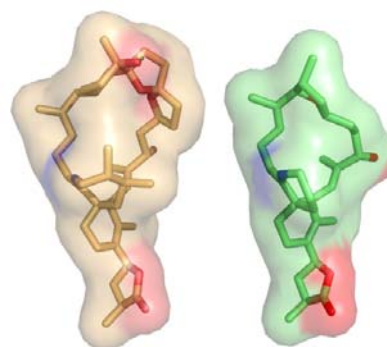


Fig. 1. Vue générale des phycotoxines marines, spirolide (en jaune) et gymnodimine (en vert), montrant aussi leur surface moléculaire avec les atomes d'oxygène (rouge) et d'azote (bleu).

Fig. 1. Overall view of the marine phycotoxins, spirolide (in yellow) and gymnodimine (in green), also showing their molecular surface with oxygen (red) and nitrogen (blue) atoms.

Structure moléculaire des toxines marines

Ces toxines appartiennent au groupe des spiroimines et sont constituées d'une imine cyclique centrale attachée à un squelette polyether macrocyclique. Elles adoptent une structure globale similaire même si la fonction "imine cyclique" est différente entre spiroïdes et gymnodimines. Cependant, les gymnodimines se distinguent par l'absence du cœur bis-spiroacetal typique des spiroïdes (Figure 1).

Structures cristallines des complexes

L'analyse des paramètres cinétiques de fixation d'un spiroïde et d'une gymnodimine de structures apparentées a révélé des valeurs de $K_d \leq 10$ nM pour les trois AChBP disponibles et une forte spécificité et quasi irréversibilité du spiroïde, mais pas de la gymnodimine. Afin d'identifier les déterminants moléculaires responsables du mode d'action de ces deux imines cycliques, nous avons engagé une étude de toxicologie structurale. Les structures cristallines à 2,5 Å des complexes pentamériques formés entre l'AChBP de *A. californica* et le spiroïde ou la gymnodimine, ont été déterminées et comparées aux structures d'autres complexes associant une AChBP et un ligand compétitif organique ou protéique des nRACH (Bourne *et al.*, 2005a, 2005b, 2006 ; Hansen *et al.*, 2005, 2006).

Après fixation à l'AChBP, les deux toxines occupent une position et une orientation similaires au cœur du site de fixation des ligands aux interfaces entre sous-unités, où elles sont essentiellement enfouies (Figure 2). Parmi les éléments structuraux de l'AChBP, l'extrémité de la boucle C, longue boucle mobile qui constitue la face principale de l'interface, joue le rôle de senseur pour accommoder la différence de taille et géométrie de ces deux toxines (plus compacte dans le cas de la gymnodimine).

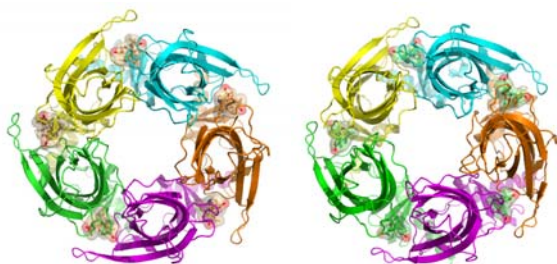


Fig. 2. Vue générale des complexes pentamériques d'AChBP avec le spiroïde (gauche, en jaune) et la gymnodimine (droite, en vert). Chaque sous-unité de l'AChBP est représentée d'une couleur différente.

Fig. 2: Overall view of the pentameric AChBP complexes with the spiroïde (left, in yellow) and gymnodimine (right, in green). The five AChBP subunits are displayed with different colors.

La fonction imine qui émerge du squelette macrocyclique est particulièrement bien orientée pour se lier au groupement carbonyle du Trp147 et interagir avec les résidus aromatiques avoisinants comme c'est le cas pour la nicotine, l'épipatidine et d'autres agonistes

nicotiniques (Bourne *et al.*, 2005a). Ces structures démontrent l'importance de cette fonction imine car les formes analogues dépourvues d'imines cycliques ne semblent pas être à l'origine d'intoxication.

Conclusion

Les structures cristallines de ces deux complexes soulignent la grande complémentarité des surfaces moléculaires entre ces deux toxines marines et le site de fixation des ligands nicotiniques sur l'AChBP. Ces toxines, formées par une imine cyclique associée à un squelette macrocyclique rigide, sont ainsi parfaitement adaptées à la géométrie du site de fixation des ligands. A cet égard, elles représentent de nouveaux outils moléculaires susceptibles de participer au développement d'inhibiteurs puissants spécifiques d'un sous-type de récepteurs nicotiniques et des marqueurs moléculaires spécifiques pour les toxi-infections alimentaires.

Références bibliographiques

- Bourne Y., Hansen S.B., Sulzenbacher G., Talley T.T., Huxford T., Taylor P., Marchot P. (2005a) Comparaison structurale de trois complexes entre une toxine peptidique et une protéine synaptique liant l'acétylcholine. In: Bon C., Goudey-Perrière F., Goyffon M., Sauviat M-P. (Eds), *Toxines et Douleur* - Coll. *Rencontres en Toxicologie*, Editions Lavoisier, Paris, pp. 213-6. (Revue en français.)
- Bourne Y., Hansen S.B., Sulzenbacher G., Talley T.T., Huxford T., Taylor P., Marchot P. (2006) Structural comparison of three crystalline complexes of a peptidic toxin with a synaptic acetylcholine recognition protein. *J. Mol. Neurosci.* 30:103-4. (Revue en anglais.)
- Bourne Y., Talley T.T., Hansen S.B., Taylor P., Marchot P. (2005b) Crystal structure of a Cbtx-AChBP complex reveals essential interactions between snake alpha-neurotoxins and nicotinic receptors. *EMBO J.* 24:1512-22.
- Hansen S.B., Sulzenbacher G., Huxford T., Marchot P., Bourne Y., Taylor P. (2006) Structural characterization of agonist and antagonist-bound acetylcholine-binding protein from *Aplysia californica*. *J. Mol. Neurosci.* 30:101-2. (Revue en anglais.)
- Hansen S.B., Sulzenbacher G., Huxford T., Marchot P., Taylor P., Bourne Y. (2005) Structures of *Aplysia* AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO J.* 24:3635-46.
- Kharrat R., Servent D., Girard E., Ouanounou G., Amar M., Marrouchi R., Benoit E., Molgó J. (2008) The marine phycotoxin gymnodimine targets muscular and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes with high affinity. *J. Neurochem.* 107:952-63.
- Molgó J., Girard E., Benoit E. (2006) Les imines cycliques d'origine marine et la pharmacopée naturelle. In: Goudey-Perrière F., Benoit E., Goyffon M., Marchot P. (Eds.), *Toxines et cancer* - Coll. *Rencontres en Toxicologie*, Editions Lavoisier, Paris, pp. 107-16. (Revue en français.)
- O'Connor P.D., Brimble M.A. (2007) Synthesis of macrocyclic shellfish toxins containing spiroimine moieties. *Nat. Prod. Rep.* 24:869-85. (Revue en anglais.)
- Sixma T.K., Smit A.B. (2003) Acetylcholine-binding protein (AChBP): a secreted glial protein that provides a high-resolution model for the extracellular domain of pentameric ligand-gated ion channels. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32:311-34. (Revue en anglais.)
- Taylor P., Talley T.T., Radić Z., Hansen S.B., Hibbs R.E., Shi J. (2007) Structure-guided drug design: conferring selectivity among neuronal nicotinic receptor and acetylcholine-binding protein subtypes. *Biochem. Pharmacol.* 74:1164-71. (Revue en anglais.)

Retrogenomics – Proceeding from gene product back to the gene : applications in drug discovery and uncovering linkages in congenital disorders

Palmer TAYLOR^{1*}, Zoran RADIC¹, Todd T. TALLEY¹, Akos NEMECZ¹, Antonella DE JACO¹, Davide COMOLETTI¹, Igor P. FABRICHNY², Philippe LEONE³, Meghan T. MILLER¹, Noga DUBI¹, Valery V. FOKIN⁴, K. Barry SHARPLESS⁴, Yves BOURNE³, Pascale MARCHOT²

¹ Department of Pharmacology, Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 0657, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093, USA ; ² Toxines Animales et Cibles Macromoléculaires (ToxCiM), Dépt. Signalisation Neuronale, Centre de Recherche en Neurobiologie-Neurophysiologie de Marseille, CNRS/Universités d'Aix-Marseille II-III, Institut Fédératif de Recherche Jean Roche, Marseille, France ; ³ Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB), CNRS/Universités d'Aix-Marseille I-II, Campus Luminy, Marseille, France ; ⁴ Skaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, Ca 92037, USA.

* Corresponding author ; Tel : (858) 534-1366 ; Fax : (858) 822-5591 ; E-mail : pwtaylor@ucsd.edu

Abstract

The development of scientific disciplines linked to the suffix "omics" usually progresses from the genome to the family of gene products, often ignoring considerations of structure of the gene product that give rise to the functional connections within the genome. This short note introduces several examples where the primary lead or connection comes from the gene product, either from structural studies or from phenotypic alterations in disease. These considerations then extend back to the gene, where recombinant DNA techniques lead to the development of templates for drug discovery or altered genes for studying disease mechanisms.

Retrogénomique : partir du produit du gène pour retourner vers le gène

Le développement de disciplines scientifiques auxquelles un suffixe "omique" est attribué progresse en général depuis le génome vers une famille de produits de gènes, le plus souvent sans considération de la structure du produit du gène qui donne lieu aux connections fonctionnelles au sein du génome. Ce court chapitre présente plusieurs exemples où la première amorce ou connexion vient du produit du gène, via sa caractérisation structurale ou via l'analyse des altérations phénotypiques associées à certaines pathologies. Ces considérations s'étendent alors en retour vers le gène, pour lequel les méthodes utilisant des ADN recombinants conduisent au développement de supports pour la découverte de nouveaux agents thérapeutiques ou de gènes modifiés permettant d'étudier les mécanismes associés aux pathologies.

Keywords : *Acetylcholinesterase, freeze-frame click chemistry, neuroligin, nicotinic acetylcholine receptor, retrogenomics.*

Introduction

The sequential progression from the genome or gene to the proteome or specific gene product is the accepted pathway in scientific endeavor in contemporary genomics. However, this approach often underestimates the importance of the gene product in unearthing the fundamental clues for providing leads into achieving specificity in drug action or uncovering aberrations inherent in congenital disorders. Selectively of drug action arises in large part from the recognition properties of the gene product and not the gene. In the case of congenital disorders, a common mutation in a family of homologous proteins may be of great consequence to a disease state or a developmental paradigm, whereas it is of little consequence to the physiologic phenotype for other family members.

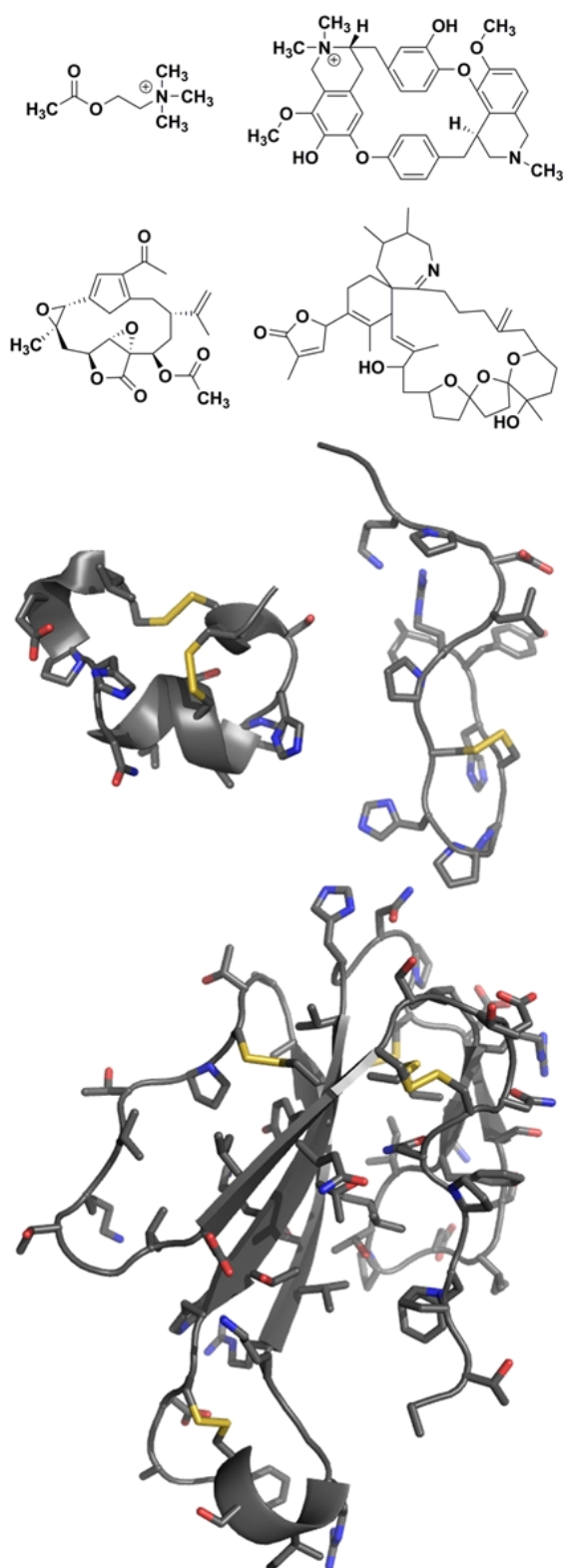
Proteomics in drug design

Molecular structure plays a dual role in the defining the working molecules for pharmacology and toxicology, for small differences in structures of toxins or other natural product signaling molecules confer selectivity for their

sites of action. In turn, the receptor targets that elicit responses and the enzymes that synthesize and degrade the neurotransmitters, hormones and autacoids require a second level of characterization. This arrangement was recognized many years ago by André Ménez and his colleagues who began studying peptide toxins from marine and terrestrial sources that influence receptors and enzymes. In the case of the neuromuscular junction, such toxins block motor activity making them useful immobilizing agents for both the predator attack and aversion by the prey. Briefly surveying the structures of neuromuscular blocking toxins shows wide chemical diversity wherein peptides or their precursors may be stored in glandular structures and injected in to prey, terpenes can partition into lipids thereby precluding their leeching from their sources in marine environments, and alkaloids exist as stable entities in terrestrial species and even accumulate within the food chain (Figure 1).

In addition, natural toxins vary considerably in molecular mass extending from 250 to over 8,000 Da. Increased mass provides means for enhancing specificity and affinity simply by extended coverage of the surface area of the binding site. A classic example

here is a comparison of the binding surfaces on the nicotinic receptor or the acetylcholine binding protein for the peptidic α -conotoxins (CTX), the agonist alkaloid epibatidine (EPI), the antagonist alkaloid, methyllycaconitine (MLA), and the macrocyclic imine toxins from dinoflagellates, spirolide (SPX) and gymnodimine (GYM), discussed in another presentation in this series by Yves Bourne and Pascale Marchot (Bourne *et al.*, 2008, this issue).



What we observe here is that all three antagonists, SPX, MLA and CTX, have a binding surface area that overlaps that of the agonist (EPI), giving rise to mutual exclusivity or competitive antagonism (Figure 2). Yet MLA and CTX carve out unique surfaces for binding extending respectively in the membrane and apical directions along the five subunit interfaces of the pentameric molecule (Taylor *et al.*, 2007). The larger GYM molecule extends across the regions encompassed by both CTX and MLA. Moreover, all of the alkaloids have their secondary or tertiary nitrogens protonated and hydrogen bonded to the carbonyl oxygen of a conserved tryptophan (Trp143) in *Aplysia* AChBP (Hansen *et al.*, 2005). The study of the curare alkaloids is of particular interest here since a congeneric series is available where binding of the tertiary and quaternary nitrogens can be directly compared.

These structural findings illustrate three important principles: First, the subunit interface of nicotinic receptors shows a wide range of recognition capacities for different structures, yet within this range, binding is very selective with respect to discrete structural determinants such as the hydrogen bond donor to the tryptophan carbonyl moiety. Second, evolution has taken full advantage of the subunit interface developing interactions extending from near the apical tip to near the membrane end of the extracellular portion of the subunit interface, regions far beyond where the potent agonists such as EPI bind. Third, we find these extended areas are critical for conferring nicotinic receptor or AChBP subtype selectivity as in the case of the substituted benzylidene anabaseines.

A novel development for drug design now lies in using the binding template, as defined by the evolutionary achievements of binding affinity with natural toxins, to synthesize new molecules that have high affinity and selectivity for nicotinic receptors, yet possess the pharmacokinetic properties that make them drug candidates (Lewis *et al.*, 2002 ; Bourne *et al.*, 2004). To this end, we have used this principle of the drug target serving as the template, relying on surfaces and then side chain determinants on those surfaces to synthesize new drug molecules. In this technique structural biology, as pursued by many workers, and the selectivity of natural products, define the template and building block for the microscopic syntheses. Hence, the simple chemistry of the reaction of an aliphatic azide with an acetylene gives rise to formation of a triazole (Figure 3). This is normally a slow reaction, but in the presence of a biological template that provides a heterogeneous surface to reduce enthalpy and entropy demands of the reaction, efficiency of the reaction is greatly enhanced.

Fig. 1. Structure of naturally occurring toxins that block the nicotinic receptor by preventing the binding of its natural agonist, acetylcholine. **Top:** acetylcholine, *d*-tubocurarine (a plant alkaloid), lophotoxin (a non-nitrogen containing diterpenoid toxin from coral, *Lophogorgia* sp.) and a spirolide (a macrocyclic imine toxin from dinoflagellate). **Bottom :** α -conotoxin (a peptide from marine cone snail venom), waglerin (a peptide from the venom of Wagner's pit viper), and the larger α -neurotoxin (a peptide or miniprotein from cobra venom). The peptidic toxins are displayed with yellow disulfide bridges and red oxygen and blue nitrogen atoms.

Fig. 1. Structures de toxines naturelles qui bloquent le récepteur nicotinique en empêchant la fixation de son agoniste naturel, l'acétylcholine. **Haut :** l'acétylcholine, la *d*-tubocurarine (un alcaloïde végétal), la lophotoxine (un diterpénoïde de corail gorgone), et un spirolide (une imine macrocyclique de dinoflagellé). **Bas :** une α -conotoxine (peptide d'un venin de cône marin), une waglérine (peptide du venin d'une vipère), et une plus grosse α -neurotoxine (peptide ou miniprotéine de venin de cobra). Les toxines peptidiques sont représentées avec les ponts disulfure en jaune, les atomes d'oxygène en rouge et les atomes d'azote en bleu.

Hence, the macromolecule, by fixing the positions of the building blocks and juxtaposing the acetylene and azide, promotes a rapid biorthogonal reaction forming the triazole. The reaction product can be identified from a library of building blocks by mass spectrometry, and the correct regioisomer synthesized by conventional methods. Examples of this reaction now exist for several enzymes and AChBP as a surrogate for the nicotinic acetylcholine receptor. A large number of candidate ligands have been synthesized and are being tested for agonist and antagonist properties. Other extracellular sites on the receptor, such as the non- α interfaces and the inner lining of the channel vestibule can also be used as templates (Hansen and Taylor, 2007).

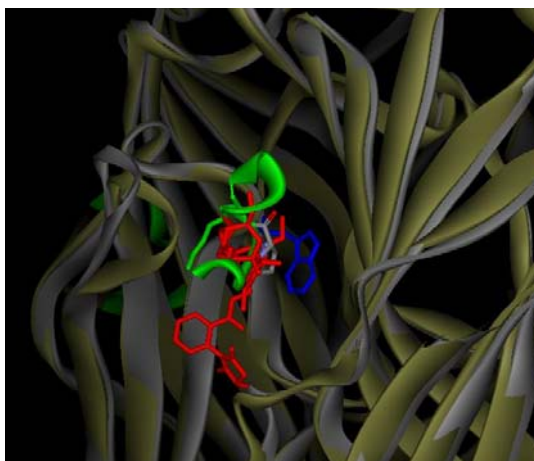


Fig. 2. Overlapping binding positions of methyllycaconitine and α -conotoxin IM1 at the subunit interface of the acetylcholine binding protein from *Aplysia*.

Fig. 2. Superposition des positions de fixation de la méthyllycaconitine et de l' α -conotoxine IM1 à l'interface entre sous-unités de l'AChBP d'*Aplysia*.

Sequence homology and structural identity in delineating genetic disorders

A second means by which one can start at the proteome and travel in a *retro* fashion is in sleuthing for genetic disorders that can be traced to mutations at homologous positions in a common family of proteins. The α/β -hydrolase fold family of proteins provides a case in point. This large super family gives rise to proteins with three well defined, but eclectic, functions (Hotelier *et al.*, 2004). The first is the catalysis of hydrolytic reactions for a large variety of substrates that include esters (esterases), proteins and peptides (proteases), lipids (lipases and phospholipases) and organohalogens (dehalogenases). All of these functions are mediated through a serine whose nucleophilicity is enhanced by an anionic side chain connected to the imidazole of a histidine that, in turn, hydrogen bonds to the serine hydroxyl. These proteins also appear to have a common structure that partially buries the catalytic residues so that the reaction occurs in a partially sequestered environment. The second function involves the capacity of members of this family to serve as heterophilic adhesion proteins forming with a partner an adhesion complex in extracellular space. Discrete and selective partnering is evident amongst proteins of high sequence identity. In mammalian systems, this occurs across synapses between pre-synaptic proteins, the neurexins, and post-synaptic, α/β -hydrolase-fold proteins, the neuroligins. A third function relates to

exposure of tyrosine side chains in thyroglobulin for iodination and subsequent processing to form thyroid hormone.

The positions of the residues forming the functional sites are discrete in these three cases. For example, the gorge leading into the active center of acetylcholinesterase is on the side of the molecule opposite to the adhesion locus for neurexin on neuroligin (Fabrichny *et al.*, 2007). The iodinated tyrosines are found at multiple positions in thyroglobulin. Despite these distinct functional regions, one finds that mutations in one member of the family that affect biosynthesis, catalysis or recognition also influence the second protein. This was first found in neuroligin where in familial associations, mutations in neuroligins 3 and 4 are linked to the autism spectrum disorders (ASD ; Table 1).

For example, mutation of a conserved arginine to cysteine (Arg451Cys) is associated with ASD in affected individuals in twin sets. An identical mutation is found in butyrylcholinesterase (BChE) in patients exhibiting succinylcholine apnea (De Jaco *et al.*, 2006). The latter phenotype arises from a pharmacogenetic mutation that only becomes manifest when patients are given succinylcholine for muscle relaxation in anesthesia. Otherwise the phenotype goes largely undetected in the human population. In both of these cases, the mutation causes retention of the protein in the endoplasmic reticulum. When studied *in vitro* and in cell culture, similar reductions in activity of the gene product are detected.

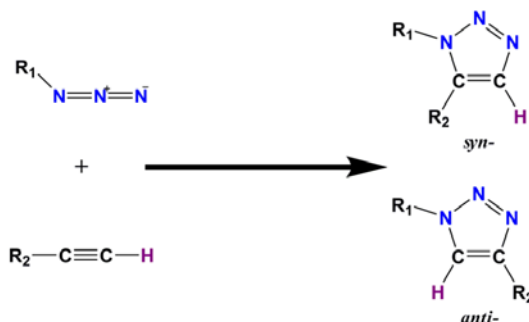


Fig. 3. Reaction scheme for formation of *syn*- and *anti*-triazole regioisomers from aliphatic azide and acetylene building blocks.

Fig. 3. Schéma réactionnel de la formation des régioisomères *syn*- et *anti*-triazole à partir de blocs azide et acétylène aliphatiques.

In each of the cases, abnormalities in protein folding can be studied by susceptibility of proteases, reactivity of the cysteines to sulfhydryl reagents and thermal denaturation. Aberrations in processing can be studied by co-immunoprecipitation with chaperone proteins and changes in the processing seen by inhibition of the proteasome. Confocal microscopy enables one to measure accumulation of the mutated protein in the endoplasmic reticulum, where it is found associated with various chaperone proteins. Additional accumulation in the endoplasmic reticulum becomes evident in the presence of proteasome inhibitors. Processing can be studied by following the glycosylation processing sequence in biosynthesis. Moreover, processing and the overall turnover of the protein can be monitored kinetically as a function of time through pulse-chase labeling with radioactive sulfhydryl containing amino acids. Finally, in neurons we are examining transport down axons to dendritic processes with primary culture of hippocampal neurons using

labeling with green fluorescent protein over discrete short intervals and then following the decay and transport of the fluorescent protein. Hence, altered biosynthesis and processing can be studied in the context of a neuron. Within members of the family of

α/β -hydrolase proteins, mutations found naturally in one of the proteins may be substituted at homologous positions giving rise to similar aberrations in biosynthetic processing. Hence, a common fold and processing mechanism are evident.

Table 1. Mutations arising in the extracellular acetylcholinesterase-homologous domains of α/β -hydrolase fold proteins.

Tableau 1. Mutations survenant dans le domaine acétylcholinesterase extracellulaire des membres de la famille des α/β -hydrolases.

Mutation	α/β -hydrolase-fold protein	Associated disease	Phenotype
R451C	h neuroligin-3	Autism Spectrum Disorder (ASD)	ER retention
Insert D396x	h neuroligin 4	ASD or Asperger's	
Del D429X	h neuroligin 4	ASD	
G99S, K378R, V403M, R704C	h neuroligin 4	ASD	NA
Del exon 4	h neuroligin 4	ASD	ER retention
Del exon 7	h neuroligin 3	ASD	
Del exons 4-6	h neuroligin 4	ASD	
R386C	h butyrylcholinesterase	Succinylcholine-induced apnea [1]	ER retention
D134H	h acetylcholinesterase	Unknown	Diminished protein stability
G2300R	r Thyroglobulin	Hypothyroidism [2]	ER retention
L2263P	m Thyroglobulin	Hypothyroidism [3]	ER retention
R2223H	h Thyroglobulin	Hypothyroidism [4]	ER retention (?)

Footnotes : [1] compromised butyrylcholinesterase expression ; [2] dwarfism and non-goitrous ; [3] congenital goiter ; [4] fetal goiter. Abbreviations : ASD : autism spectrum disorder ; h : human ; r : rat ; m : mouse.

Conclusions

We demonstrate with two examples where knowledge of the gene product structure proves useful to the design of new pharmaceuticals and in understanding how and where mutations in structure will lead to abnormal protein folding and a compromised phenotype.

Acknowledgements. We thank Scott Hansen, Ryan Hibbs, Shelley Camp, Oksana Lockridge, Jordi Molgó and other colleagues for fruitful discussions that have contributed to these endeavors.

References

- Bourne Y., Kolb H.C., Radic Z., Sharpless K.B., Taylor P., Marchot P. (2004) Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:1449-54.
- Bourne Y., Radic Z., Talley T.T., Conrod S., Taylor P., Molgó J., Marchot P. (2008) Utilisation des « protéines liant l'acétylcholine » (AChBP) en toxicologie structurale : nouveaux exemples. In : Benoit E., Goudey-Perrière F., Marchot P., Servent D. (Eds.), *Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales*, Collection Rencontres en Toxicologie, Publications de la SFET, Châtenay-Malabry, France, Epub on <http://www.sfet.asso.fr>, pp. 27-8.
- De Jaco A., Comoletti D., Kovarik Z., Gaietta G., Radic Z., Lockridge O., Ellisman M.H., Taylor P. (2006) A mutation linked with autism reveals a common mechanism of endoplasmic reticulum retention for the alpha/beta-hydrolase fold family. *J. Biol. Chem.* 281:9667-76.
- Fabrichny I.P., Leone P., Sulzenbacher G., Comoletti D., Miller M.T., Taylor P., Bourne Y., Marchot P. (2007) Structural analysis of the synaptic protein neuroligin and its β -neurexin complex: determinants for folding and cell adhesion. *Neuron* 56:979-991.
- Hansen S.B., Sulzenbacher G., Huxford T., Marchot P., Taylor P., Bourne Y. (2005) Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO J.* 24:3635-46.
- Hansen S.B., Taylor P. (2007) Galanthamine and non-competitive inhibitor binding to ACh binding protein: evidence for a binding site on non-alpha subunit interfaces of heteromeric neuronal nicotinic receptors. *J. Mol. Biol.* 36:895-901.
- Hotelier T., Renault L., Cousin X., Nègre V., Marchot P., Chatonnet A. (2004) ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic Acids Res.* 32 (Database issue):D145-7.
- Lewis W.G., Green L.G., Grynszpan F., Radic Z., Carlier P.F., Taylor P., Finn M.G., Sharpless K.B. (2002) Click chemistry in situ: acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks. *Angew. Chem.* 41:1053-7.
- Taylor P., Talley T.T., Radic Z., Hansen S.B., Hibbs R.E., Shi J. (2007) Structure-guided drug design: conferring selectivity among neuronal nicotinic receptor and acetylcholine binding protein subtypes. *Biochem. Pharmacol.* 74:1164-71.

Venom peptides from Conus and other Conoideans : prospects and perspectives

Baldomero M. OLIVERA

Department of Biology, University of Utah, 257 S. 1400 E., Room 201, Salt Lake City, UT 84112, USA.

Tel : +1 801 585 1830 ; Fax : +1 801 585 5010 ; E-mail : olivera@biology.utah.edu

Abstract

Venomous marine snails that belong to the superfamily Conoidea comprise a mostly unexplored marine biodiversity of over 10,000 species. Of these, only the venoms of cone snails (Conus), comprising ~5% of the biodiversity have been characterized. Studies on cone snail venoms suggest that the entire superfamily will provide a rich resource for developing pharmacological leads. Some general principles that have emerged from studies of Conus venoms are discussed. Conoidean venoms are extremely complex, in part because the snails use a combination strategy involving multiple venom peptides to achieve each physiological endpoint. Using the postsynaptic receptor at the neuromuscular junction of prey, examples of two different peptides in the same venom, one competitive and one non-competitive nicotinic antagonist, are presented. Furthermore, there is degeneracy in the molecular solutions that have evolved for inhibiting the nicotinic receptor. The accelerated evolution of venom peptide genes leads to the rapid acquisition of novel function as the radiation of various conoidean lineages occurs. Although these perspectives were obtained from characterizing Conus, these are likely applicable to most conoidean venoms. A rationale for why conoidean venom peptides should have high potential for therapeutic applications is presented.

Les peptides des venins de cônes et autres Conoidea : prospectives et perspectives

Les Mollusques marins venimeux qui appartiennent à la super-famille des Conoidea constituent une diversité biologique marine, presque inexplorée, de plus de 10.000 espèces, dont 5% environ sont des cônes (Conus). Seuls les venins de cônes ont été caractérisés. Les études de ces venins suggèrent que l'ensemble de la super-famille représente une réserve particulièrement riche en substances actives permettant le développement de produits de pointe en pharmacologie. Quelques principes généraux émergeant de ces études sont discutés. Les venins de Conoidea sont extrêmement complexes, en partie parce que les cônes utilisent une combinaison de stratégies, impliquant les multiples peptides d'un venin donné, pour accomplir chaque action physiologique finale. C'est ce qui est illustré ici, en présentant les effets de deux peptides différents du même venin qui sont des antagonistes compétitif et non compétitif du récepteur nicotinique postsynaptique situé à la jonction neuromusculaire des proies. Par ailleurs, une « dégénérescence » se produit, au cours de l'évolution, dans les voies moléculaires visant à inhiber le récepteur nicotinique. Ainsi, l'évolution accélérée des gènes codant pour les peptides de venins conduit à l'acquisition rapide de fonctions originales parallèlement à l'apparition de différentes familles de Conoidea. Bien que ces perspectives soient obtenues à partir de la caractérisation des cônes, elles sont probablement applicables à la plupart des venins de Conoidea. Un raisonnement logique est présenté pour expliquer les raisons pour lesquelles les peptides de venins de Conoidea devraient avoir un fort potentiel pour des applications thérapeutiques.

Keywords : Conotoxins, conoidean venoms, nicotinic receptors, exogenes.

Introduction

Conus venom peptides are a well-known class of natural products that have been widely investigated by toxinologists. There are probably well over 100,000 different Conus peptides to be found in the venoms of the ~700 living Conus species. Nevertheless, these still comprise only a very minor fraction of the total number of pharmacologically active agents that are present in marine snail venoms.

Cone snails have conventionally been assigned to a single genus (Röckel *et al.*, 1995) that is placed in the superfamily Conoidea, a larger group generally referred to as the conoidean gastropods (Taylor *et al.*, 1993 ;

Bouchet and Rocroi, 2005 ; Puillandre *et al.*, 2008), which may well be the most biodiverse superfamily of marine invertebrates.

Recent deep-sea collections, particularly by the Museum national d'Histoire naturelle in Paris have revealed that the superfamily Conoidea is likely to have well over 10,000 species, with the majority being found offshore in deeper water, and presently biologically undefined (*i.e.* most species have not even been described). An extensive biodiversity analysis of the New Caledonian molluscan fauna suggests that cone snails comprise only 5% of the total biodiversity of conoidean molluscs (Bouchet *et al.*, 2002). A very

preliminary and incomplete phylogenetic tree of conoidean molluscs based on 12S mitochondrial DNA sequences is shown in *Figure 1*.

Except for a few lineages that have secondarily lost their venoms, essentially all conoidean species use venom as their primary weapon for capturing prey. The small number of studies to date that have characterized conoidean venoms other than those from cone snails (López-Vera *et al.*, 2004 ; Watkins *et al.*, 2006 ; Imperial *et al.*, 2007 ; Heralde *et al.*, 2008 ; Aguilar *et al.*, 2008) has shown that these non-*Conus* venoms are similarly complex.

The vast majority of non-*Conus* conoidean species are relatively small, with a sizeable number under 5 mm. Traditionally, the only animal venoms from which toxinologists could productively characterize individual components were those from the few large and common venomous species. The technology

required to characterize an individual toxin from a venom necessarily mandated starting with a very large amount of material to do the requisite biochemistry and pharmacology. A number of technical advances, most notably the molecular biological revolution, have caused a dramatic change. Today, a comprehensive analysis of toxins expressed in the venom duct of a single specimen of conoidean snail that might only be millimeters in length is possible in principle, provided modern analytical and synthetic tools are used. In many ways, the practice of toxinology has not yet adapted to this change ; given the urgent need for new drug leads, it seems inevitable that the biomedical community will begin to mine this rich but largely unexplored pharmacological resource. A major goal of this presentation is to outline some salient principles, primarily based on studies carried out on the venoms of cone snails, but likely to be applicable to all Conoideans, not just the cone snails.

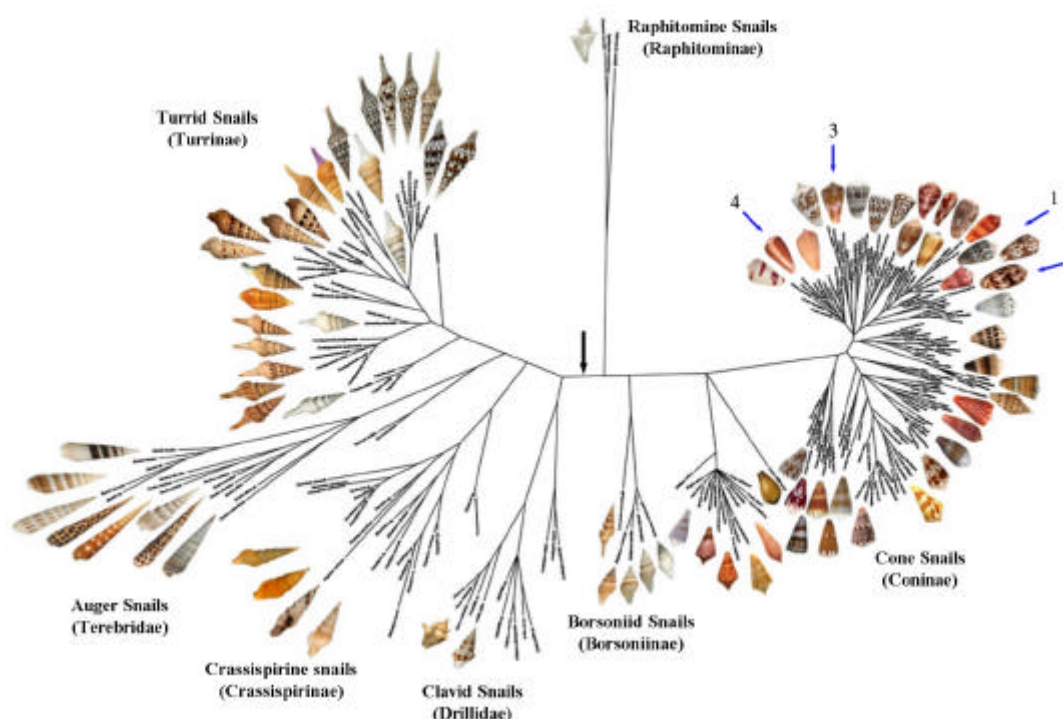


Fig. 1. The molecular phylogeny of conoidean gastropods. The tree shown is based on the Bayesian analysis of 12S mitochondrial DNA. Some of the major groups (regarded as families or subfamilies) are labeled in the figure. It has been postulated (Taylor *et al.*, 1993 ; Puillandre *et al.*, 2008) that all conoidean mollusks should be reclassified into two superclades : to the left of the black arrow is the Turridae/Terebridae superclade, and to the right of the black arrow is the expanded Conidae superclade. Note the very long branch lengths to the auger snails and the raphitomes. The blue arrows show four clades of fish-hunting cone snails : **1**-*Pionoconus*, **2**-*Gastridium*, **3**-*Chelyconus*, **4**-*Phasmoconus* that are discussed in *Table 1*.

Fig. 1. Phylogénie moléculaire des Gastéropodes Conoidea. L'arbre montré est fondé sur l'analyse bayésienne de l'ADN mitochondrial 12S. Certains des groupes importants (considérés comme des familles ou des sous-familles) sont indiqués dans la figure. Selon Taylor *et al.* (1993) et Puillandre *et al.* (2008), tous les Mollusques Conoidea devraient être reclassés en deux superclades : celui des Turridae/Terebridae (à gauche de la flèche noire) et celui des Conidae (à droite de la flèche noire). Notez les très grandes longueurs des branches correspondant aux Terebridae et aux Raphitominae. Les flèches bleues désignent quatre clades de cônes piscivores : **1**-*Pionoconus*, **2**-*Gastridium*, **3**-*Chelyconus*, **4**-*Phasmoconus*, qui sont discutés dans le *Tableau 1*.

Biochemical and genetic background

The biologically active components of conoidean venoms are almost always peptides and polypeptides, most conformationally-stabilized by multiple disulfide bonds. In fish-hunting *Conus* venoms, most peptides range in size from 10-30 amino acids. The complexity of conoidean venoms is notable : typically, hundreds of different venom peptides may be found from a single species (Olivera *et al.*, 1990). Some *Conus* clearly have

an even bigger repertoire, well in excess of 200 different molecular components. However, an individual cone snail may be expressing only a small subset of the total potential repertoire. If the venoms of many individuals of one *Conus* species are pooled over a period of time, then the full complement of peptides can be defined.

The very rapid divergence of venom components between species (Olivera *et al.*, 1999) leads to every *Conus* species having its own particular repertoire of

venom peptides. With a very few exceptions, there is essentially no molecular overlap between species. The

same rapid interspecific divergence has been observed in other Conoideans (Heralde et al., 2008).

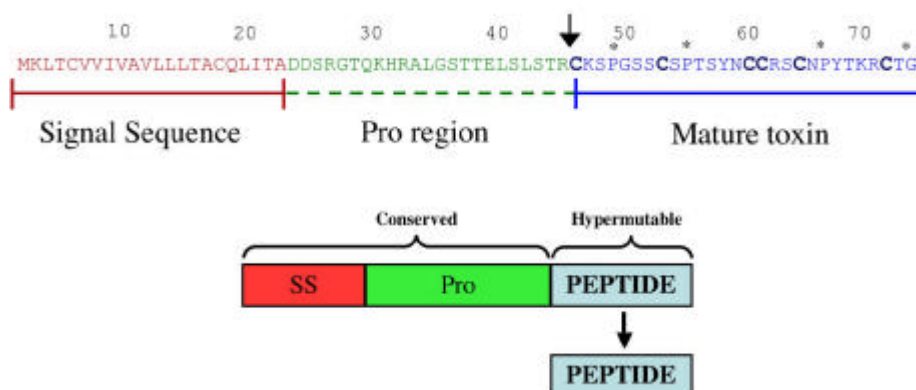


Fig. 2. The generation of a venom peptide from its precursor. Invariably, the open reading frame of toxin genes encodes a pre-propeptide precursor. The mature toxin is released by proteolytic cleavage (arrow). The sequence of one such toxin precursor is shown in the figure ; note the 6 cysteine residues that are present in the mature toxin region.

Fig. 2. Formation d'un peptide de venin à partir de son précurseur. Invariablement, le cadre de lecture ouverte des gènes de toxines code pour un précurseur pré-propeptide. La toxine mature est libérée par coupure protéolytique (flèche). La séquence d'un tel précurseur de toxine est montrée dans la figure ; notez les 6 résidus cystéine qui sont présents dans la région de la toxine mature.

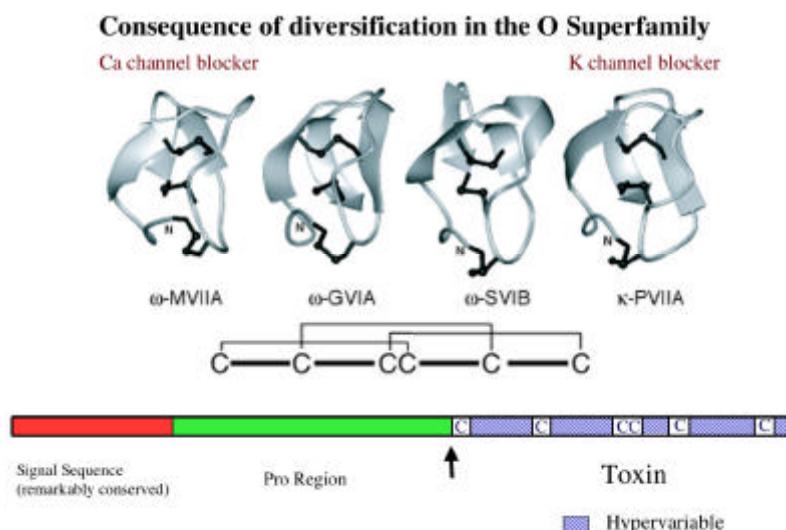


Fig. 3. The diagram shows how a gene superfamily encoding *Conus* peptides evolves with particular structural conservation but functional diversification. The striped blue regions between the cysteine residues in the mature toxin region are hypervariable ; sequence changes in these regions occur as new species evolve. Although a very large number of *Conus* and related conoidean molluscs have members of the O-superfamily (recognized by the conserved signal sequence and the pattern of cysteine residues in the mature toxin region), every conoidean species in which this superfamily is expressed has a different sequence in the mature toxin region. Examples of such peptides are diagrammatically shown — although very similar structurally because of the conserved disulfide framework, they have diverged functionally. Thus, one peptide (ω -MVIA) is a Ca channel blocker, while another peptide encoded by this gene superfamily (κ -PVIA) is a K channel blocker — the two peptides are members of different cabals (see Figure 4).

Fig. 3. Diagramme montrant comment une super-famille de gènes codant pour des peptides de cônes évolue avec une conservation structurale particulière, mais avec une diversité fonctionnelle. Les régions bleues et striées entre les résidus cystéine, dans la région de la toxine mature, sont hypervariables ; les changements de séquence dans ces régions se produisent en même temps que de nouvelles espèces évoluent. Bien qu'un très grand nombre de cônes et autres Mollusques Conoidea ait des membres de la super-famille O (reconnus par la séquence signal conservée et l'arrangement des résidus cystéine dans la région de la toxine mature), chaque espèce de Conoidea exprimant cette super-famille a une séquence différente dans la région de la toxine mature. Des exemples de tels peptides sont schématiquement montrés — bien que très semblables structuralement à cause des ponts disulfure conservés, ils ont divergé fonctionnellement. Ainsi, un peptide (ω -MVIA) est un bloqueur du canal Ca alors qu'un autre peptide codé par cette super-famille de gènes (κ -PVIA) est un bloqueur du canal K — les deux peptides sont des membres de différentes cabales (voir Figure 4).

The components in the venom of a single conoidean species are encoded by genes which can be grouped into a few gene superfamilies. The open reading frame encoded by these genes is a pre-propeptide precursor of the venom peptide (see Figure 2), with the mature,

biologically-active peptide formed from the pre-propeptide through proteolytic cleavage (Woodward et al., 1990). Thus, it is these gene superfamilies that must diverge rapidly as new species are evolved (see Figure 3). We recently proposed (Olivera, 2006) that

Conus peptide genes belong to a more general class called *exogenes* that do not act endogenously within the animal that produces them. Rather, the biologically-active gene product acts on another animal (*exogenously*). Because each animal species will have its own particular set of interactions with other animals, *exogenes* would be expected to diverge much more rapidly during the adaptive radiation of a biodiverse lineage of animals, which is what has been documented repeatedly for *Conus* peptide gene superfamilies (Woodward *et al.*, 1990 ; Olivera *et al.*, 1999, 2008 ; Conticello *et al.*, 2000, 2001 ; Santos *et al.*, 2004 ; Olivera, 2006 ; Duda *et al.*, 2008).

Cabals : using a combination drug therapy strategy

A general insight that has emerged from the study of cone snail peptides, is that to achieve their biological goals, cone snails, in effect, use a combination drug strategy. It seems likely, given the comparable complexity of most conoidean venoms, that this conclusion can be generalized to a greater or lesser extent to most Conoideans.

Prey Capture

1 Excitotoxic Shock		2 Neuromuscular Block	
Very rapid, fish stunned		Irreversible paralysis	
<u>Lightning-strike cabal</u>			
κ-Conotoxin	-	Blocks K channels	
δ-Conotoxin	-	Inhibits Na channel inactivation	
ι-Conotoxin	-	Activates Na Channels	
Others	-	Prevents ionotropic receptor desensitization	
<u>Motor cabal</u>			
ω-Conotoxin	-	Blocks Ca channels	
α-Conotoxin	-	Competitive nicotinic receptor inhibitor	
ψ-Conotoxin	-	Nicotinic receptor channel blocker?	
μ-Conotoxin	-	Blocks Na channel conductance	

Fig. 4. A summary of the two cabals present in the venoms of certain types of fish-hunting cone snails (such as *Conus catus* and the species shown in Figure 5). The same general strategy is employed by the other fish-hunting cone snails, such as *Conus purpurascens* (see text), *Conus striatus* and *Conus magus*.

Fig. 4. Résumé des deux cabales présentes dans les venins de certains types de cônes piscivores (comme *Conus catus* et les espèces montrées dans la Figure 5). La même stratégie générale est employée par les autres cônes piscivores, comme *Conus purpurascens* (voir le texte), *Conus striatus* et *Conus magus*.

The studies that led to the realization that these mollusks employ a combination drug strategy, was the analysis of the venom peptides from purple cone, *Conus purpurascens*. There were a number of unique features of the study of this fish-hunting *Conus* — the venom of *Conus purpurascens* was first analyzed by a University of Utah undergraduate student, Chris Hopkins, who developed a milking strategy, now much more widely used for a variety of cone snails (Hopkins *et al.*, 1995). It was in studying the various toxins in milked *Conus purpurascens* venom that the synergy between two classes of peptides, the δ-conotoxins and κ-conotoxins, was first discovered. The studies of *Conus purpurascens* and other fish-hunting *Conus* species that use a similar hunting strategy led to the concept that multiple

peptide toxins from a cone snail venom, each with its own particular molecular target, act together in a synergistic fashion to achieve a specific physiological endpoint more efficiently (Terlau *et al.*, 1996).

Two different physiological endpoints were demonstrated to be involved in prey capture (Figure 4) : an extremely rapid tetanic immobilization (Figure 5) followed by a slower irreversible inhibition of neuromuscular transmission. Venom peptides that act together in a synergistic manner are referred to as “cabals” (after secret societies out to overthrow existing authority). The peptides leading to the tetanic immobilization are referred to as the “lightning-strike cabal”, while those that inhibit neuromuscular transmission are the “motor cabal” (Olivera, 1997).



Fig. 5. Prey capture by a fish-hunting cone snail, *Conus catus*. (**Upper**) The snail has extended its proboscis and is about to strike the fish prey. The venom will be delivered through a hollow harpoon-like tooth that has been moved to the end of the proboscis. (**Lower**) The snail has envenomated the fish and is about to engulf it completely. Note the very stiff pectoral fins, a consequence of the lightning strike cabal. These toxins cause hyperexcitability of axons in the vicinity of the injection site resulting in a tetanic paralysis with extremely stiff musculature. This is then followed by the spread of venom peptides, which interfere with neuromuscular transmission (the “motor cabal”) through the body of the prey. Photographs by Jason Biggs.

Fig. 5. Capture d'une proie par un cône piscivore, *Conus catus*. (**En haut**) Le cône a étendu son proboscis et est sur le point de frapper le poisson. Le venin sera délivré par une dent radulaire creuse, semblable à un harpon, qui est placée à l'extrémité du proboscis. (**En bas**) Le cône a envenimé le poisson et est sur le point de l'engloutir complètement. Notez la rigidité extrême des nageoires pectorales, une conséquence foudroyante de la cabale. Ces toxines provoquent une hyperexcitabilité des axones au voisinage du site d'injection, ce qui produit une paralysie tétanique avec une musculature extrêmement rigide. S'ensuit alors la propagation des peptides du venin qui interfèrent avec la transmission neuromusculaire (la “cabale motrice”) dans le corps de la proie. Photographies de Jason Biggs.

It was also first shown, from studies of *Conus purpurascens* peptides, that the combination drug strategy involved not only targeting different molecular components in the same physiological circuitry, but additionally, different pharmacological sites on the same functional molecular target complex. Thus, *Conus purpurascens* has both a competitive nicotinic antagonist that inhibits the skeletal muscle nicotinic receptor (α A-conotoxin PIVA), as well as a non-competitive nicotinic antagonist (Shon *et al.*, 1997) that also blocks the muscle nicotinic receptor at a different site (ψ -conotoxin PIIIE). Not only do various peptides of a cabal inhibit different molecular targets in the physiologically-relevant circuitry, but different pharmacological sites within the same molecular target as well (see Figure 6).

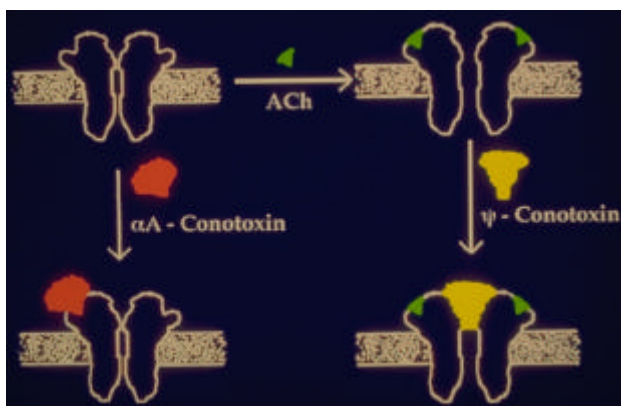


Fig. 6. A cartoon of how two different toxins target the same nicotinic acetylcholine receptor complex at different pharmacological sites. The **top left** shows the nicotinic acetylcholine receptor at the neuromuscular junction in the closed state ; binding of two molecules of acetylcholine leads to a conformational change, in which the channel is in an open state (**top right**). The closed channel is prevented from opening if a competitive antagonist in the venom, such as α A-PIVA from *Conus purpurascens*, binds to the acetylcholine binding site (**lower left**), thereby preventing acetylcholine from binding to its ligand site. However, in the event that a receptor escapes the α A-conotoxin and is able to open, it is inhibited by a second venom component, ψ -conotoxin, which has been postulated to block the pore of the open channel (**lower right**).

Fig. 6. Schéma montrant comment deux toxines différentes visent le même récepteur nicotinique de l'acétylcholine au niveau de sites pharmacologiques différents. **En haut et à gauche** est montré le récepteur nicotinique de l'acétylcholine, au niveau de la jonction neuromusculaire, dans l'état fermé ; la fixation de deux molécules d'acétylcholine conduit à un changement de conformation dans laquelle le canal est dans un état ouvert (**en haut et à droite**). Le canal fermé ne peut pas s'ouvrir si un antagoniste compétitif du venin, comme l' α A-PIVA de *Conus purpurascens*, se lie au site de fixation de l'acétylcholine (**en bas et à gauche**), empêchant ainsi l'acétylcholine de se lier à son site récepteur. Cependant, dans le cas où un récepteur échapperait à l' α A-conotoxine et serait capable de s'ouvrir, il serait alors inhibé par une deuxième composante du venin, la ψ -conotoxine, qui pourrait bloquer le pore du canal ouvert (**en bas et à droite**).

There are clearly several other examples of members of a cabal that target the same functional molecular complex, but act on different sites on that complex. A particularly striking example is α -conotoxin ImI and α -conotoxin ImII ; what is unusual in this case is the great similarity in sequence of the two peptides (see Figure 7). Nevertheless α -conotoxin ImI is a competitive antagonist of the nicotinic receptor, while α -conotoxin ImII is not (Ellison *et al.*, 2003 ;

Ellison and Olivera, 2007). These peptides are found in a worm-hunting *Conus* species, the imperial cone, *Conus imperialis*, which is known to eat amphinomid worms. Although the nicotinic receptor at the neuromuscular junction of these worms has not been defined, it is likely to belong to the all- α -type of nicotinic receptor (such as the $\alpha 7$ or $\alpha 9\alpha 10$ subtypes in mammalian systems (Gerschenfeld, 1973 ; Le Novère and Changeux, 1995), the class known to be targeted by these two peptides. Thus, evolution seems to favor the generation of multiple genes that encode independently-acting ligands that are functionally linked, a "combination strategy" that has also evolved as being more effective for human medical practice (such as the pharmacological strategy for fighting AIDS and cancer).

The third sequence in Figure 7 shows α -conotoxin RgIA from *Conus regius*, a species also known to prey on amphinomid worms. This peptide is specific for another all- α -type of receptor, the $\alpha 9\alpha 10$ subtype (Ellison *et al.*, 2006, 2008). The series of closely related conopeptides shown illustrates how relatively few changes in Administrative Assistant sequence can target a *Conus* peptide to an entirely different site. The three α -conotoxins shown share considerable sequence identity, but have diverged dramatically in the specific pharmacological targets they have evolved to modulate.

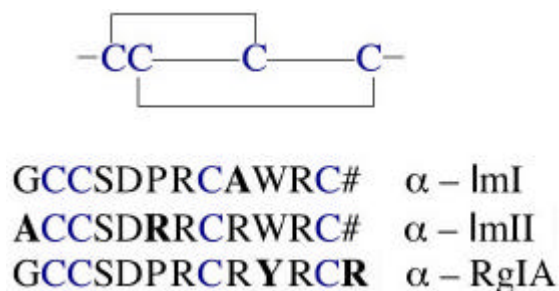


Fig. 7. Sequences and disulfide connectivity of three α -conotoxins. α -ImI and α -ImII are from *Conus imperialis*, and α -RgIA is from *Conus regius*. All α -conotoxins have the disulfide connectivity shown on top. Note the very high sequence identity between the three peptides. However, α -ImI is a competitive antagonist of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subtype, while α -RgIA is a competitive antagonist of the $\alpha 9\alpha 10$ subtype. As is discussed in the text, α -ImII is also targeted to the $\alpha 7$ subtype but binds to an entirely different site from α -ImI and is a non-competitive antagonist. A comparison of the sequences shows that a few amino acid changes are sufficient to shift site selectivity dramatically. A discussion of these three peptides and related α -conotoxins has recently been presented (Ellison and Olivera, 2007).

Fig. 7. Séquences et ponts disulfure de trois α -conotoxines, α -ImI et α -ImII de *Conus imperialis* et α -RgIA de *Conus regius*. Toutes les α -conotoxines sont stabilisées par les types de ponts disulfure montrés en haut. Notez la très grande homologie de séquences entre les trois peptides. Cependant, α -ImI est un antagoniste compétitif du sous-type $\alpha 7$ de récepteur nicotinique de l'acétylcholine, alors que α -RgIA est un antagoniste compétitif du sous-type $\alpha 9\alpha 10$. Comme cela est discuté dans le texte, α -ImII cible également le sous-type $\alpha 7$ mais elle se lie à un site qui est complètement différent de celui d' α -ImI et agit comme un antagoniste non compétitif. Une comparaison des séquences montre que quelques changements d'acides aminés sont suffisants pour déplacer radicalement la sélectivité pour un site de fixation donné. Une discussion au sujet de ces trois peptides et d'autres α -conotoxines a récemment été présentée (Ellison et Olivera, 2007).

Degeneracy of molecular solutions in response to a common evolutionary need

As is discussed above and illustrated in *Figure 3*, peptides encoded by the same gene superfamily can evolve to have different functions as a consequence of the radiation of a biodiverse lineage ; despite functional diversification, a conserved structural framework is maintained. A different viewpoint emerges when diverse venom peptides that have evolved to modulate a single molecular target are examined. The *Conus* peptides that target the skeletal muscle nicotinic receptor of vertebrates will serve as an example.

There would be an obvious selective advantage for predatory venomous animals to evolve a toxin that blocks the post-synaptic receptor at the neuromuscular junction — thus, snakes and cone snails have come up with unrelated molecular solutions to binding the ligand site on this receptor. However, within the cone snail lineage there is notable degeneracy in the molecular solutions that have evolved.

Not surprisingly, because of accelerated evolution of

toxin gene superfamilies, different sequences that are competitive antagonists of the muscle nicotinic receptor have been evolved by species in this genus. Initially, it seemed that a single family of toxins, the α -conotoxins, were used as competitive antagonists by all *Conus* species — however, this is clearly not the case. *Table 1* summarizes some of the structural diversity that has been uncovered. All of the peptides shown in the table are antagonists of the nicotinic receptor from fish-hunting cone snails, but they vary dramatically in structure. From peptides that are relatively small with few disulfides (13 AA with 2 disulfides in the case of α -GI) to relatively large peptides (47 AA with 5 disulfides in the case of α S-RVIII A), a wide variety of structural scaffolds have been recruited by different fish-hunting clades within the genus *Conus* to serve as competitive nicotinic antagonists. Thus, considerable degeneracy in the molecular solutions to an evolutionary need is observed : multiple gene superfamilies encode *Conus* peptides with the same pharmacological target. Because of the accelerated evolution of conopeptide gene superfamilies, convergent evolution can readily be observed in this single genus of marine animals.

Table 1. Diversity of conopeptides targeted to the muscle nicotinic receptor.

Tableau 1. Diversité des conopeptides ciblant le récepteur nicotinique musculaire.

<i>Conus</i> peptide	Size (AA)	# Disulfides	Conotoxin family	Gene superfamily	Species (subfamily)	References
α MI	14	2	α	A	<i>C. magus</i> (<i>Pionoconus</i>)	McIntosh <i>et al.</i> (1982)
α GI	13	2	α	A	<i>C. geographus</i> (<i>Gastridium</i>)	Gray <i>et al.</i> (1981)
α A-EIVA	30	3	α A (long)	A	<i>C. ermineus</i> (<i>Chelyconus</i>)	Jacobsen <i>et al.</i> (1997)
α A-OIVA	18	3	α A (short)	A	<i>C. obscurus</i> (<i>Gastridium</i>)	Teichert <i>et al.</i> (2006)
α S-RVIII A	47	5	α S	S	<i>C. radiatus</i> (<i>Phasmoconus</i>)	Teichert <i>et al.</i> (2005)
α C-PrXA	32	1	α C	C	<i>C. parius</i> (<i>Phasmoconus</i>)	Jimenez <i>et al.</i> (2007)

Therapeutic efficacy of conoidean peptides : a rationale

Much of the interest in conoidean peptides stems from their biomedical potential. A surprisingly high fraction of the initial set of conopeptides discovered and characterized has been investigated as potential drug leads ; a diverse group of conopeptides have undergone extensive pre-clinical development to examine the suitability of the peptides for a particular disease application. At least 5 of these peptides from various *Conus* venoms have reached human clinical trials, and one has become an approved drug for intractable pain (ω -conotoxin MVIIA : generic name, ziconotide ;

commercial name, Prialt). The various potential clinical applications have been reviewed elsewhere (see for example Teichert *et al.*, 2007 ; Han *et al.*, 2008 ; Olivera *et al.*, 2008) and will not be described in detail here. Rather, we discuss a rationale for why these products of animal biodiversity have been particularly successful as promising lead compounds, and why peptides in all conoidean venoms (not just those of *Conus*) should continue to have high pharmacological potential.

Each component of conoidean venom probably has a native physiologically-relevant molecular target. A very high fraction of such targets are likely expressed in the excitable membranes of cells in the nervous system of

the targeted animal, be it prey, predator or competitor. Molecular components in the nervous system are highly conserved at a structural level. Thus, although *Caenorhabditis elegans* and man diverged from each other over half a billion years ago, the various classes of voltage-gated Ca channels or glutamate receptors can be easily recognized in both species. The NMDA receptors are clearly different from those of the AMPA receptor class in both taxa and functionally, the homologous molecular components act similarly when expressed in an exogenous system (e.g. cell culture or *Xenopus* oocytes). Thus, once a particular signaling molecule in the nervous system evolved, it has been extraordinarily conserved. Although there presumably has been a continuous sequence divergence, remarkable structural (and functional) conservation is observed.

Thus, a conoidean peptide with a particular molecular target, be that target in a polychaete worm, in another mollusc or in fish, has a fair probability to exhibit significant activity on a similar/homologous target in a mammalian nervous system, such as that of man. The relative potency of the peptide on the homologous human target would be expected to be an unselected variable that could change greatly from one peptide to the next, but if a series of homologous venom peptides with the same physiological target from a clade of related snails were tested on the homologous human target, at least some are likely to show significant potency (all of them are presumably selected for high potency on the native target). Such variability in potency on the human homolog is indeed observed for the α -conotoxins targeted to the skeletal muscle nicotinic receptor. Although all of these peptides are extremely potent if tested on fish, the potency on the human homolog can vary by many orders of magnitude from peptide to peptide.

Since these venom peptides evolved to cause harm to the prey, competitor or potential predator, why would these have potential therapeutic applications in man? The rationale is that although such molecular components are extremely conserved structurally, their pattern of expression is not. Even in closely related mammalian species, striking differences in patterns of expressions may be found. Thus, if we examine the probable endogenous role for the snail of the peptide that has become an approved drug for pain, ω -conotoxin MVIIA, it seems reasonable to conclude that this peptide is part of the motor cabal of the cone snail that produces it, *Conus magus*. Thus, when injected into potential fish prey of *Conus magus*, the peptide causes paralysis because its molecular target, a specific voltage-gated Ca channel, is found at the presynaptic terminus of the neuromuscular junction of the fish prey. However, in humans the same Ca channel is not found at neuromuscular junctions (or if present, plays a very minor role). Thus, in contrast to fish, injection of this peptide into mammals does not cause paralysis.

However, there is high expression of the same Ca channel subtype, highly structurally conserved between man and fish, in the dorsal horn of the spinal cord, specifically at the synapses between incoming pain fibers and the post-synaptic spinal cord neurons. The *Conus* peptide targeted to this channel can bind with high affinity to these human homologs since they are structurally very similar to the fish Ca channels. Since the patterns of expression differ from fish, the peptide does not cause paralysis in mammals, but can be

developed clinically to alleviate severe pain (Miljanich, 2004).

Discussion

An overview of what might be expected from the unexplored venoms of over 10,000 species of venomous marine molluscs is provided above. Across the entire superfamily Conoidea, a large complement of polypeptidic toxins encoded by genes, are expressed in the venom ducts of each species. In *Conus*, many venom peptides are relatively small (10 to 30 amino acids) but in some of the other conoidean taxa, the average size of the components found in the venom is significantly larger. In all cases analyzed, the majority of the peptides or polypeptides are highly cross-linked by multiple disulfide bonds.

One feature of marine snail venoms that has led to the generation of an enormous pharmacological diversity is that the genes that encode the toxins in the venoms are subject to accelerated evolution. It has been postulated that in addition to the usual forces of natural selection, the genes are the substrate of specialized mechanisms, which make rapid change in amino acid sequences in selected segments of the open reading frame likely (presumably, mechanisms related to recombination and repair). The net result is that when a comparison of members of a particular gene superfamily expressed in these venoms is made between species, there are conserved and hypervariable regions in the open reading frame. The divergence in the hypervariable regions, even between homologous genes from closely related species, is extreme. This is particularly noteworthy since these are juxtaposed with highly conserved segments of the toxin precursor (such as the signal sequence). Over evolutionary time, there is conservation of structure but an accelerated evolution of function.

The complexity of the venoms, and the rapid evolution of their toxin genes are two obvious factors that lead to pharmacological diversity. Another, more subtle feature is the physiological strategy revealed by studies of *Conus* venoms. As outlined above, the snails use a combination drug strategy to achieve their biological purposes, and instead of the evolution of a single component in the venom for each physiological endpoint, multiple components in the venom act together synergistically to make a more effective package ("a cabal"). It is notable, that when one compares different species, although the physiological endpoint may be similar (such as inhibiting neuromuscular transmission in the prey), a toxin cabal strategy can mean that two different conoidean species may emphasize different subsets of molecular targets in the same physiological circuitry. Thus, in the motor cabal of fish-hunting cone snails that leads to the complete shutdown of neuromuscular transmission, some species appear to have a much more sophisticated presynaptic strategy (e.g. multiple peptides targeted to presynaptic voltage-gated Ca channels). Presumably, this would ensure that no neurotransmitter is released even though action potentials are being fired by the motor axon. In contrast, another *Conus* species attacking the same class of prey may have greater emphasis on a post-synaptic strategy (e.g. with multiple peptides attacking different pharmacological sites on the postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors).

Thus, although all snails appear to make multiple

peptides to inhibit neuromuscular transmission, the choice of which pharmacological sites and which molecular components are to be targeted differs from one species to the next. Possibly, the choice of the actual molecular targets may be a consequence of subtle biological factors (such as where the snail is likely to be able to strike its prey — one might imagine that striking the head region of a fish might lead to selection for a different type of motor cabal from a *Conus* species more likely to strike near the lateral line or the tail region). Therefore, although all fish-hunting *Conus* venoms cause paralysis when tested *in vitro* by injecting a fish, not only do the individual toxins differ when two piscivorous *Conus* species are compared, but the spectrum of their molecular targets may diverge significantly.

The discovery that multiple cabals might be present for prey capture (in the fish-hunting cone snail example given above, the “lightning strike” and the “motor” cabals) raises the possibility that there may also be differences in which cabal plays the more dominant role in each fish-hunting *Conus* species. Thus, some fish-hunting cone snails apparently have powerful toxins that make the lightning strike cabal the major factor for prey capture, while other species appear to emphasize the motor cabal more. The type of strategy evolved, could, once again, be influenced by subtle biological factors (what type of fish the different snails are attacking, etc). Thus, although a significant number of different cone snail species (~100) may all hunt, effectively paralyze and capture fish, in detail, their ecology and the vagaries of the environment may lead to selection for different components in the venom for prey capture. Additional ecological factors are important to consider in the overall framework for generating pharmacological diversity : in addition to the prey, those predators which are relevant to the success of the species, and what competitors might be present in the environment could be critical determinants of venom composition. The specific venom components found may therefore have evolved to reflect the relevant biotic interactions of each individual conoidean species. The impressive pharmacological diversity that has been generated by evolution in these venoms is a consequence of the enormous complexity of the sum total of biotic interactions of this biodiverse lineage of venomous marine snails.

Acknowledgements. The research work of the author's laboratory on conoidean venoms has been supported by the National Institute of General Medical Sciences for many decades. The phylogenetic tree in Figure 1 was prepared by John-Paul Ownby. I am grateful to Terry Merritt and Tuong Huynh for their cheerful collaboration during the preparation of this manuscript.

References

- Aguilar M.B., Chan de la Rosa R.A., Falcon A., Olivera B.M., Heimer de la Cotera E.P. (2008) Peptide pal9a from the venom of the turrid snail *Polystira albida* from the Gulf of Mexico : Purification, characterization, and comparison with P-conotoxin-like (framework IX) conoidean peptides. *Peptides* (In press).
- Bouchet P., Lozouet P., Maestrati P., Heros V. (2002) Assessing the magnitude of species richness in tropical marine environments : high numbers of molluscs at a New Caledonia site. *Biol. J. Linnean Soc.* 75:421-36.
- Bouchet P., Rocroi J. P. (2005) *Classification and Nomenclator of Gastropod Families* (Vol. 47) : ConchBooks.
- Conticello S.G., Gilad Y., Avidan N., Ben-Asher E., Levy Z., Fainzilber M. (2001) Mechanisms for evolving hypervariability: the case of conopeptides. *Mol. Biol. Evol.* 18:120-31.
- Conticello S.G., Pilpel Y., Glusman G., Fainzilber M. (2000) Position-specific codon conservation in hypervariable gene families. *Trends Genet.* 16:57-9.
- Duda T.F. Jr., Bolin M.B., Meyer C.P., Kohn A.J. (2008) Hidden diversity in a hyperdiverse gastropod genus: Discovery of previously unidentified members of a *Conus* species complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* (In press).
- Ellison M., Feng Z.P., Park A.J., Zhang X., Olivera B.M., McIntosh J. M., et al. (2008) Alpha-RgIA, a novel conotoxin that blocks the alpha9alpha10 nAChR : structure and identification of key receptor-binding residues. *J. Mol. Biol.* 377:1216-27.
- Ellison M., Haberlandt C., Gomez-Casati M.E., Watkins M., Elgoyhen A.B., McIntosh J.M., et al. (2006) Alpha-RgIA: a novel conotoxin that specifically and potentially blocks the alpha9alpha10 nAChR. *Biochemistry* 45:1511-7.
- Ellison M., McIntosh J.M., Olivera B.M. (2003) α -Conotoxins ImI and ImII : similar $\alpha 7$ nicotinic receptor antagonists act at different sites. *J. Biol. Chem.* 278:757-64.
- Ellison M., Olivera B.M. (2007) Alpha4/3 conotoxins: phylogenetic distribution, functional properties, and structure-function insights. *Chem. Rec.* 7:341-53.
- Gerschenfeld H.M. (1973) Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiol. Rev.* 53:1-119.
- Gray W.R., Luque A., Olivera B.M., Barrett J., Cruz L.J. (1981) Peptide toxins from *Conus geographus* venom. *J. Biol. Chem.* 256:4734-40.
- Han T.S., Teichert R.W., Olivera B.M., Bulaj G. (2008) *Conus* venoms - a rich source of peptide-based therapeutics. *Curr. Pharm. Des.* 14:2462-79.
- Heralde F.M. 3rd, Imperial J., Bandyopadhyay P.K., Olivera B.M., Concepcion G.P., Santos A.D. (2008) A rapidly diverging superfamily of peptide toxins in venomous *Gemmula* species. *Toxicon* 51:890-7.
- Hopkins C., Grilley M., Miller C., Shon K., Cruz L.J., Gray W. R., et al. (1995) A new family of *Conus* peptides targeted to the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 270:22361-7.
- Imperial J.S., Kantor Y., Watkins M., Heralde F.M. 3rd, Stevenson B., Chen P., et al. (2007) Venomous auger snail *Hastula (Impages) hectica* (Linnaeus, 1758) : molecular phylogeny, foregut anatomy and comparative toxinology. *J. Exp. Zool.* B. Mol. Dev. Evol. 308:744-56.
- Jacobsen R., Yoshikami D., Ellison M., Martinez J., Gray W.R., Cartier G.E., et al. (1997) Differential targeting of nicotinic acetylcholine receptors by novel αA -conotoxins. *J. Biol. Chem.* 272:22531-7.
- Jimenez E.C., Olivera B.M., Teichert R.W. (2007) AlphaC-conotoxin PrXA : a new family of nicotinic acetylcholine receptor antagonists. *Biochemistry* 46:8717-24.
- Le Novère N., Changeux J.P. (1995) Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J. Mol. Evol.* 40:155-72.
- López-Vera E., Heimer de la Cotera E.P., Maillo M., Riesgo-Escovar J.R., Olivera B.M., Aguilar M.B. (2004) A novel structural class of toxins: the methionine-rich peptides from the venoms of turrid marine snails (Mollusca, Conoidea). *Toxicon* 43:365-74.
- McIntosh J.M., Cruz L.J., Hunkapiller M.W., Gray W.R., Olivera B.M. (1982) Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 218:329-34.
- Miljanich G.P. (2004) Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Curr. Med. Chem.* 11:3029-40.
- Olivera B.M. (1997) *Conus* venom peptides, receptor and ion channel targets and drug design : 50 million years of neuropharmacology (E.E. Just Lecture, 1996). *Mol. Biol. Cell* 8:2101-9.
- Olivera B.M. (2006) *Conus* peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. *J. Biol. Chem.* 281:31173-7.

- Olivera B.M., Quik M., Vincler M., McIntosh J.M. (2008) Subtype-selective conopeptides targeted to nicotinic receptors: Concerted discovery and biomedical applications. *Channels (Austin)* 2 (In press).
- Olivera B.M., Rivier J., Clark C., Ramilo C.A., Corpuz G.P., Abogadie F.C., et al. (1990) Diversity of *Conus* neuropeptides. *Science* 249:257-63.
- Olivera B.M., Teichert R.W. (2007) Diversity of the neurotoxic *Conus* peptides: a model for concerted pharmacological discovery. *Mol. Interv.* 7:251-60.
- Olivera B.M., Walker C., Cartier G.E., Hooper D., Santos A.D., Schoenfeld R., et al. (1999) Speciation of cone snails and interspecific hyperdivergence of their venom peptides. Potential evolutionary significance of introns. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 870:223-37.
- Puillandre N., Samadi S., Boisselier M.C., Sysoev A.V., Kantor Y.I., Cruaud C., et al. (2008) Starting to unravel the toxoglossan knot: molecular phylogeny of the "turrids" (Neogastropoda Conoidea). *Mol. Phylogenet. Evol.* (In press).
- Röckel D., Korn W., Kohn A.J. (1995) *Manual of the Living Conidae* (Vol. I: Indo-Pacific Region). Wiesbaden, Germany: Verlag Christa Hemmen.
- Santos A.D., McIntosh J.M., Hillyard D.R., Cruz L.J., Olivera B.M. (2004) The A-superfamily of conotoxins: structural and functional divergence. *J. Biol. Chem.* 279:17596-606.
- Shon K., Grilley M., Jacobsen R., Cartier G.E., Hopkins C., Gray W.R., et al. (1997) A noncompetitive peptide inhibitor of the nicotinic acetylcholine receptor from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry* 36:9581-7.
- Taylor J.D., Kantor Y.I., Sysoev A.V. (1993) Foregut anatomy, feeding mechanisms, relationships and classification of the Conoidea (=Toxoglossa) (Gastropoda). *Bull. nat. Hist. Mus. Lond. (Zool.)* 59:125-70.
- Teichert R.W., Jimenez E.C., Olivera B.M. (2005) α S-Conotoxin RVIIIA: a structurally unique conotoxin that broadly targets nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry* 44:7897-902.
- Teichert R.W., Jimenez E.C., Twede V., Watkins M., Hollmann M., Bulaj G., et al. (2007) Novel conantokins from *Conus parius* venom are specific antagonists of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.* 282:36905-13.
- Teichert R.W., Lopez-Vera E., Gulyas J., Watkins M., Rivier J., Olivera B.M. (2006) Definition and characterization of the short α A-conotoxins : a single residue determines dissociation kinetics from the fetal muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 45:1304-12.
- Terlau H., Shon K., Grilley M., Stocker M., Stühmer W., Olivera B.M. (1996) Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting cone snail. *Nature* 381:148-51.
- Watkins M., Hillyard D.R., Olivera B.M. (2006) Genes expressed in a turrid venom duct : divergence and similarity to conotoxins. *J. Mol. Evol.* 62:247-56.
- Woodward S. R., Cruz L. J., Olivera B. M., Hillyard D. R. (1990) Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides. *EMBO J.* 1:1015-20.

Alpha-conotoxines, outils pour l'étude pharmacologique et structurale des récepteurs nicotiniques neuronaux

Sébastien DUTERTRE*, Daniel BIASS, Philippe FAVREAU, Sophie MICHALET, Reto STÖCKLIN

Atheris Laboratories, case postale 314, CH-1233 Bernex-Geneva, Switzerland.

* Auteur correspondant ; Tél : +41 22 850 05 85 ; Fax : +41 22 850 05 86 ;

Courriel : sebastien.dutertre@atheris.ch

Résumé

Les récepteurs nicotiniques neuronaux sont des protéines membranaires essentielles pour la communication cellulaire dans certaines régions du système nerveux central. A ce jour, 12 sous-unités ont été clonées ($\alpha 2$ - $\alpha 10$; $\beta 2$ - $\beta 4$), révélant la multitude d'associations possibles pour former un récepteur pentamérique fonctionnel. Chaque sous-type de récepteurs a une localisation précise ainsi que des propriétés pharmacologiques uniques. Pour nous aider dans la caractérisation de ces récepteurs présents dans le cerveau et permettre la détermination de leur rôle dans certaines pathologies neurologiques, la nature nous a fourni des outils remarquables de par leur sélectivité et leur haute affinité. Appelées α -conotoxines, ces petites sondes peptidiques (12-20 acides aminés, 2 ponts disulfure) sont isolées du venin de Mollusques marins prédateurs du genre *Conus*. Leur petite taille facilite énormément l'étude structure-fonction avec le récepteur cible et de ce fait, elles sont aujourd'hui très utilisées en recherche fondamentale. Finalement, certaines de ces α -conotoxines présentent également un potentiel thérapeutique.

α -Conotoxins : pharmacological and structural probes to study neuronal nicotinic receptors

Neuronal nicotinic receptors are essential membrane proteins for communication processes in various regions of the central nervous system. To date, 12 subunits have been cloned, emphasizing on the many possible combinations to form a functional receptor. Each receptor subtype exhibits a precise tissue localisation as well as unique pharmacological properties. To help in the characterisation of these receptors in the brain and to understand their role in neurodegenerative diseases, Nature has provided us with selective and potent tools. Called α -conotoxins, these small peptide probes are isolated from the venom of marine predatory molluscs of the genus *Conus*. Their small size greatly facilitates the structure-function relationship study with the targeted receptor, and as a result, they are widely used in fundamental research. Finally, some α -conotoxins may have a direct therapeutic potential.

Keywords : Nicotinic acetylcholine receptors, predatory marine cone snails, conotoxins, venom peptides, homology modelling.

Introduction

Les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine sont des protéines transmembranaires qui ont un rôle physiologique fondamental pour le fonctionnement cellulaire (Corringer *et al.*, 2000). En particulier, des mutations ou une diminution du nombre de ces récepteurs peut entraîner des pathologies sévères telles que des myopathies ou des maladies neurodégénératives de type Alzheimer ou Parkinson. Les récepteurs nicotiniques sont constitués de 5 sous-unités identiques ou non, formant un canal cationique non sélectif. En fonction de leur localisation, de leur structure et de leur pharmacologie, ils sont très généralement divisés en deux classes : les récepteurs musculaires, présents à la jonction neuromusculaire, et les récepteurs neuronaux, présents dans le système nerveux central et le système immunitaire. Alors qu'il n'y a que deux types de récepteurs musculaires (fœtal et adulte), une multitude de sous-types de récepteurs neuronaux existent. Certains peuvent être homopentamériques ($\alpha 7$ ou $\alpha 9$), mais la grande majorité des sous-types incorporent plusieurs sous-unités α et β ($\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$) parmi les 12 sous-

unités clonées ($\alpha 2$ - $\alpha 10$; $\beta 2$ - $\beta 4$) pour former une entité fonctionnelle avec des propriétés pharmacologiques uniques. Pour comprendre le rôle de ces récepteurs dans la physiologie cellulaire, à la fois chez les individus sains et chez les individus malades, nous avons besoin d'outils de haute affinité et sélectifs. Les poisons végétaux ainsi que les venins animaux sont une source intarissable de tels outils.

Dès le 16^{ème} siècle, les explorateurs décrivent l'utilisation du curare par les indiens d'Amérique du sud pour immobiliser et tuer leur gibier. Cependant, le site d'action de cette molécule n'a été identifié qu'au 19^{ème} siècle par Claude Bernard, au travers d'expériences sur la jonction neuromusculaire devenues des classiques du genre. Il a été déterminé que le curare bloque l'activité des récepteurs nicotiniques musculaires ce qui, en fonction de la dose, peut entraîner une paralysie totale. L'immobilisation rapide de la proie est cruciale pour un prédateur : elle permet une capture facile, tout en évitant les blessures potentielles occasionnées par une proie qui se défend. De par leur rôle essentiel dans la contraction musculaire, les récepteurs nicotiniques sont

donc tout naturellement la cible de nombreuses toxines animales, ceci étant démontré par exemple par les venins de serpents, comme l' α -bungarotoxine.

Le cône marin est un autre animal venimeux qui a fourni et continue de fournir de précieux outils pharmacologiques (appelées conotoxines) aux chercheurs du monde entier. En effet, le venin de ces Mollusques marins prédateurs recèle une richesse biologique remarquable. On estime que les 700 espèces de cônes recensées contiennent plus de 50.000 peptides dont seulement 0,1 à 0,2% seraient caractérisés. Pourtant, la recherche sur ces venins a déjà livré un médicament anti-douleur commercialisé sous le nom de Prialt™ en 2004, et plusieurs autres molécules sont en développement pour le traitement de la douleur, l'épilepsie, l'infarctus ou encore les accidents vasculaires cérébraux (Olivera et Teichert, 2007).

Peut-être encore plus que le serpent, un prédateur lent tel que le cône a besoin d'immobiliser sa proie très rapidement et efficacement. C'est donc logiquement que l'on a découvert dans ces venins des antagonistes du récepteur nicotinique de l'acétylcholine de type musculaire, appelées α -conotoxines. Plus surprenant a été l'isolement relativement récent d'autres

α -conotoxines qui se lient de façon sélective aux récepteurs nicotiniques neuronaux. Ces petites sondes peptidiques sont aujourd'hui très prisées des chercheurs et certaines pourraient également avoir un potentiel thérapeutique (Livett *et al.*, 2006).

Diversité pharmacologique des α -conotoxines à partir d'une plateforme structurale unique

Les α -conotoxines sont de petits peptides comprenant entre 12 et 20 acides aminés. La structure tridimensionnelle de plusieurs de ces peptides a été déterminée principalement par résonance magnétique nucléaire, mais aussi par cristallographie aux rayons X. D'une façon générale, la structure d'une α -conotoxine montre un motif central en hélice α caractéristique (Figure 1), et qui semble essentiel pour l'activité biologique. Cet élément de structure secondaire est contraint par 2 ponts disulfure (C^I-C^{III} , $C^{II}-C^{IV}$), ce qui confère à ces peptides des propriétés exceptionnelles de rigidité et de stabilité. Lorsque des parties de séquence existent en N- ou C-terminal, ils sont bien souvent flexibles et apparaissent désordonnés en solution (α -GID ou α -PIA).

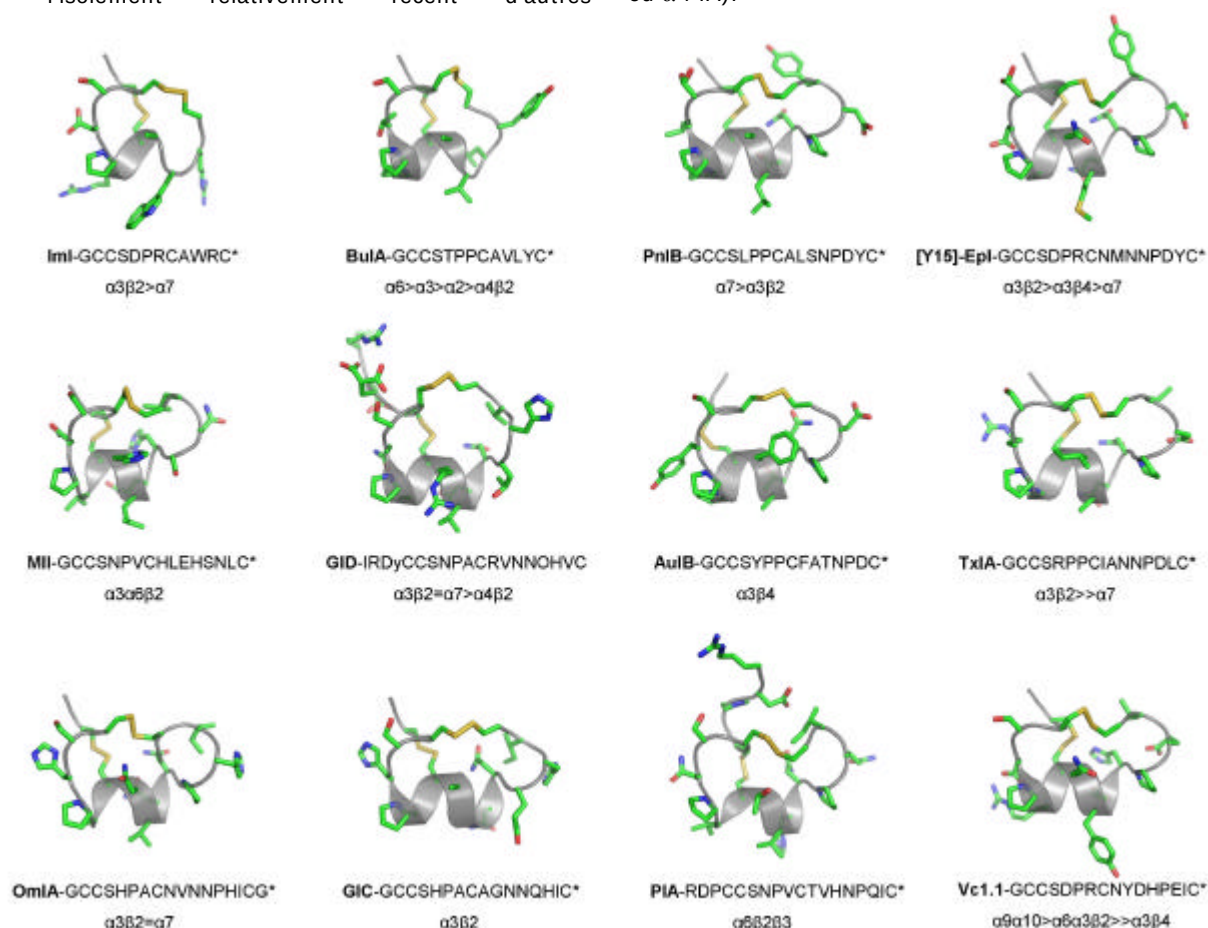


Fig. 1. Structures tridimensionnelles, séquences et cible biologique principale de quelques α -conotoxines neuronales.

Fig. 1. α -Conotoxin structures, sequences and neuronal nAChR subtype preferences.

Aujourd'hui, une vingtaine de ces α -conotoxines dites « neuronales » ont été caractérisées au niveau pharmacologique. On observe une grande diversité de sélectivité vis-à-vis des différents sous-types de

récepteurs nicotiniques neuronaux (Figure 1). Cependant, il apparaît clairement qu'une majorité de ces α -conotoxines cible les récepteurs possédant les sous-unités $\alpha 3$ et $\beta 2$ (voir Figure 1). Il faut rappeler que les

cônes marins ont pour proies naturelles des poissons, des mollusques ou des vers, alors que la plupart des résultats expérimentaux ont été obtenus à partir de récepteurs mammaliens (murins ou humains). Tout au plus peut-on extrapoler à propos de la véritable cible biologique de ces toxines chez la proie, une ressemblance moléculaire par rapport à un récepteur neuronal mammalien de type $\alpha 3\beta 2$.

De façon fortuite ou non, certaines α -conotoxines ciblent d'autres sous-unités, comme α -BuIA ou α -MII, qui ont une préférence pour les récepteurs contenant $\alpha 6$. Une étude de structure-activité a permis d'obtenir un analogue chimique de la conotoxine MII, modifié en position 11 ([E11A]-MII) conférant une affinité et une spécificité spectaculaires pour cette sous-unité $\alpha 6$ (Azam *et al.*, 2008). Le radiomarquage de ce nouveau peptide a permis son utilisation comme traceur pour démontrer la perte sélective d'une population de récepteurs nicotiques de type $\alpha 6^*$, à la fois sur des modèles animaux de la maladie de Parkinson et sur des sujets humains atteints. Sachant que la perte de ces récepteurs intervient à un stade asymptomatique de la maladie, cette nouvelle conotoxine possède un grand potentiel comme outil de diagnostic précoce de la maladie de Parkinson.

Le récepteur nicotinique neuronal de type $\alpha 9\alpha 10$ est un autre exemple de la diversité pharmacologique de ces α -conotoxines. En effet, α -Vc1.1, ainsi que α -RgIA se lient sélectivement à cette protéine membranaire avec une haute affinité (Vincler *et al.*, 2006). De façon tout à fait inattendue, ces deux peptides se sont révélés être de puissants analgésiques. Un nouveau mécanisme de contrôle de la douleur, jusque là totalement insoupçonné a donc pu être identifié grâce à ces 2 peptides. Par ailleurs, le développement de l' α -conotoxine α -Vc1.1 comme médicament anti-douleur a été interrompu au stade II des essais cliniques par manque de spécificité pour le récepteur humain par rapport au récepteur murin.

Interaction entre les α -conotoxines et les récepteurs nicotiques neuronaux

Notre compréhension actuelle de l'interaction entre les α -conotoxines et les différents récepteurs nicotiques neuronaux a bénéficié des nombreuses études de structure-activité publiées lors de cette dernière décennie. Ainsi, le remplacement systématique de chaque acide aminé de la séquence d'une toxine par un résidu alanine permet de déterminer les éléments essentiels pour la liaison au récepteur. Lorsque ces données sont combinées avec les résultats de mutagenèse dirigée sur le récepteur, on peut obtenir un pharmacophore minimum de liaison. Cependant, « l'image » de l'interaction ainsi obtenue reste floue, et en aucun cas, ne permet la conception rationnelle de nouveaux ligands. Une étape importante dans l'obtention d'une meilleure précision de l'interaction a été la découverte de l'AChBP, une protéine homologue de la partie extracellulaire (contenant le site de liaison) du récepteur nicotinique (Brejc *et al.*, 2001). Cette protéine soluble forme des cristaux qui diffractent aux rayons X, ce qui a permis la détermination de sa structure tridimensionnelle à l'échelle atomique. Depuis, trois conotoxines ont pu être co-cristallisées avec l'AChBP (Figure 2 ; Celie *et al.*, 2005 ; Hansen *et al.*, 2005 ; Ulens *et al.*, 2006 ; Dutertre *et al.*, 2007).

L'information structurale extrapolée des complexes α -conotoxines-AChBP apparaît en parfait accord avec les données expérimentales, puisque la grande majorité des

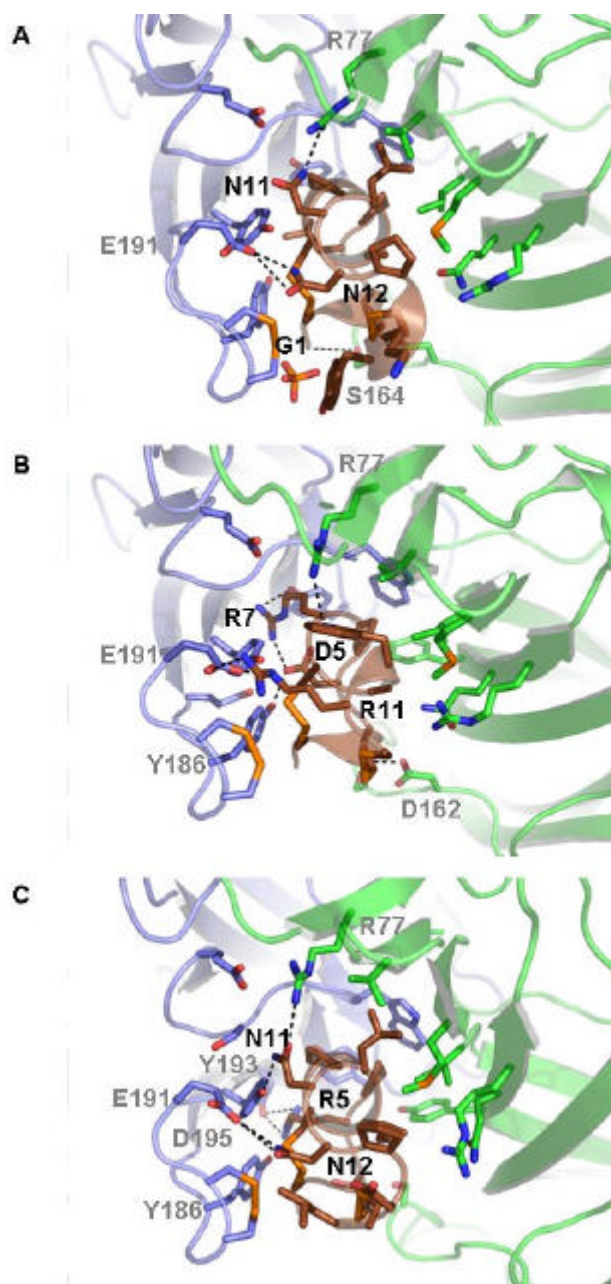


Fig. 2. Structures cristallographiques des complexes entre l'AChBP et trois α -conotoxines. **A**, AChBP-[A10L, D14K]-PnIA. **B**, AChBP-ImI. **C**, AChBP-[A10L]-TxIA. L'AChBP est en bleu (sous-unité +) et vert (sous-unité -), et les conotoxines sont en rouge.

Fig. 2. Structures of α -conotoxin-AChBP complexes. AChBP is depicted in blue (+ side) and green (- side), while the conotoxins are shown in red.

acides aminés identifiés comme étant importants pour la liaison se retrouvent, soit en interaction directe (pont hydrogène, interaction électrostatique ou hydrophobe), soit très proches. Il est particulièrement intéressant et surprenant de constater que l'orientation générale de ces trois conotoxines dans le site de liaison de l'AChBP est quasi-identique, et ce, malgré des séquences parfois très divergentes. Pour expliquer en partie ce résultat, une proline conservée sur toutes les α -conotoxines neuronales en début d'hélice α (Figure 1) sert d'ancrage au niveau de résidus aromatiques et/ou hydrophobes du site de liaison du récepteur (Dutertre *et al.*, 2005). On peut donc généraliser le mode de liaison identifié dans ces complexes conotoxines-AChBP à tous les récepteurs

nicotiniques neuronaux. Ce constat, ajouté au fait que les α -conotoxines neuronales ont une structure tertiaire identique, implique que les différentes sélectivités

observées sont uniquement dues à la complémentarité de séquences entre ces peptides et le site de liaison des différents récepteurs nicotiniques neuronaux (Figure 3).

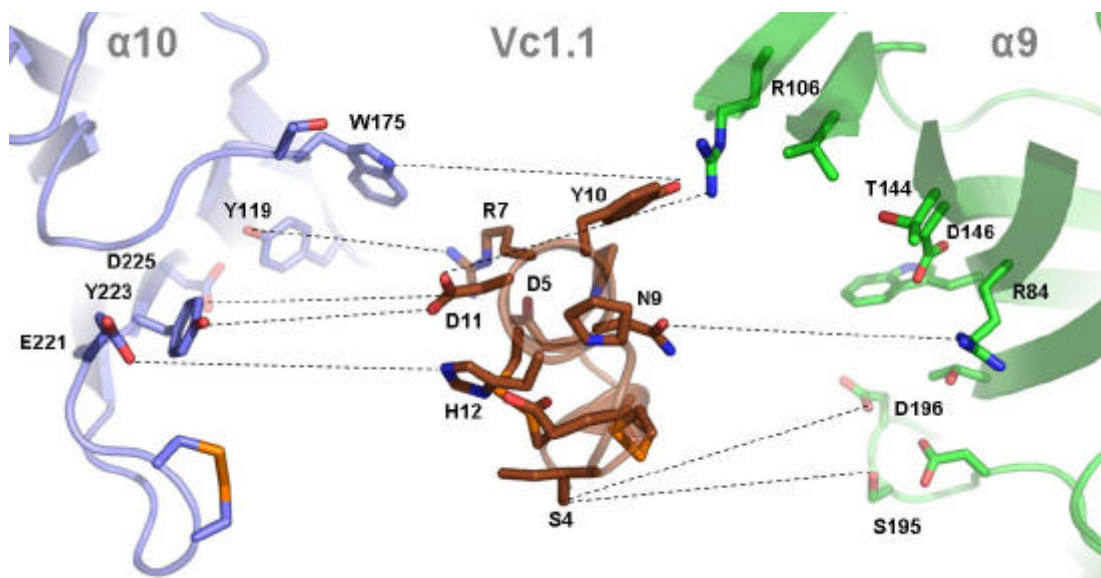


Fig. 3. Modélisation de l'interaction entre le récepteur nicotinique $\alpha 9\alpha 10$ et α -Vc1.1. α -Vc1.1 a une séquence particulièrement hydrophile, et de façon complémentaire, le site de liaison du récepteur $\alpha 9\alpha 10$ l'est aussi, ce qui explique en partie la sélectivité de cette toxine. L'orientation ci-dessus est la même que dans la Figure 2, excepté que les sous-unités $\alpha 9$ et $\alpha 10$ ont été écartées selon l'axe horizontal pour permettre une meilleure visualisation des interactions potentielles.

Fig. 3. Model of the interaction between α -Vc1.1 and $\alpha 9\alpha 10$ nAChR. The sequence of α -Vc1.1 appears relatively hydrophilic, which is matched by the binding site of the $\alpha 9\alpha 10$ nAChR. This figure is in the same orientation as Figure 2.

Conclusions

Aujourd'hui, toutes les pièces du puzzle semblent donc réunies pour permettre le développement rationnel de nouveaux ligands nicotiniques possédant des profils de sélectivités prédéterminés. En se basant sur les structures des complexes AChBP-conotoxines et en utilisant des outils de modélisation moléculaire et de docking de plus en plus performants, nous pouvons espérer atteindre ce but à relativement court terme.

Références bibliographiques

- Azam L., Yoshikami D., McIntosh J.M. (2008) Amino acid residues that confer high selectivity of the $\alpha 6$ nicotinic acetylcholine receptor subunit to α -conotoxin MII[S4A,E11A,L15A]. *J. Biol. Chem.* 283:11625-32.
- Brejč K., van Dijk W.J., Klaassen R.V., Schuurmans M., van Der O.J., Smit A.B., Sixma T.K. (2001) Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411:269-76.
- Celie P.H., Kasheverov I.E., Mordvintsev D.Y., Hogg R.C., van N.P., van E.R., van Rossum-Fikkert S.E., Zhmak M.N., Bertrand D., Tsetlin V., Sixma T.K., Smit A.B. (2005) Crystal structure of nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP in complex with an α -conotoxin PnIA variant. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:582-8.
- Corringer P.J., Le Novère N., Changeux J.P. (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:431-58.
- Dutertre S., Nicke A., Lewis R.J. (2005) $\beta 2$ subunit contribution to 4/7 α -conotoxin binding to the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 280:30460-8.
- Dutertre S., Ulens C., Buttner R., Fish A., van E.R., Kendel Y., Hopping G., Alewood P.F., Schroeder C., Nicke A., Smit A.B., Sixma T.K., Lewis R.J. (2007) AChBP-targeted α -conotoxin correlates distinct binding orientations with nAChR subtype selectivity. *EMBO J.* 26(16):3858-67.
- Hansen S.B., Sulzenbacher G., Huxford T., Marchot P., Taylor P., Bourne Y. (2005) Structures of *Aplysia* AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO J.* 24:3635-46.
- Livett B.G., Sandall D.W., Keays D., Down J., Gayler K.R., Satkunathan N., Khalil Z. (2006) Therapeutic applications of conotoxins that target the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Toxicon* 48:810-29.
- Olivera B.M., Teichert R.W. (2007) Diversity of the neurotoxic *Conus* peptides: a model for concerted pharmacological discovery. *Mol. Interv.* 7:251-60.
- Ulens C., Hogg R.C., Celie P.H., Bertrand D., Tsetlin V., Smit A.B., Sixma T.K. (2006) Structural determinants of selective α -conotoxin binding to a nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103:3615-20.
- Vinclair M., Wittenauer S., Parker R., Ellison M., Olivera B.M., McIntosh J.M. (2006) Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103:17880-4.

Novel roles of highly specific natural inhibitors of the angiotensin-converting enzyme

Mirian A.F. HAYASHI^{1,2*}, Arthur Andrade NERY³, Antonio C.M. CAMARGO², Henning ULRICH³

¹ Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo - SP, 04044-020, Brazil ; ² Center for Applied Toxicology, Instituto Butantan, São Paulo - SP, 05503-900, Brazil ; ³ Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, 05508-900, Brazil.

* Corresponding author ; Tel / Fax : 11-55-37261024 ; E-mail : mirianhayashi@butantan.gov.br

Abstract

The bradykinin-potentiating peptides (BPPs) from Bothrops jararaca venom are the most potent natural inhibitors of the angiotensin-converting enzyme (ACE) described to date. The presence of BPPs precursor mRNAs in the Bothrops jararaca spleen and brain, beside the venom gland was demonstrated by us. Interestingly, the regions of snake brain expressing the BPP precursor are highly correlated to neuroendocrine functions. This strongly suggested to us that these peptides might belong to a novel class of endogenous vasoactive peptides. This stimulated us to pursue potential novel molecular targets for these peptides. We selected nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) for characterization of BPP-induced effects, as these receptors are expressed in both the blood vessel cell surfaces and the central nervous system. No direct effect of the BPPs on nAChR activity could be observed, although the receptor inhibition promoted by the antagonist MK-801 was efficiently reversed by the BPP-10c, which is one of the most efficient to decrease the systolic blood pressure of anaesthetized rats. This interesting find suggests that this peptide might act as endogenous regulator of nAChR, thereby displacing so far unknown endogenous inhibitors and protecting normal receptor function.

De nouveaux rôles pour des inhibiteurs naturels spécifiques de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

Les peptides potentialisant la bradykinine (BPP) issus de Bothrops jararaca sont les plus puissants inhibiteurs naturels de l'enzyme de conversion de l'angiotensine décrits jusqu'à ce jour. Nous avons démontré la présence des précurseurs de l'ARNm des BPP dans la rate et le cerveau, en plus de la glande à venin. Il est intéressant de noter que les régions du cerveau du serpent contenant le précurseur du BPP sont fortement liées aux fonctions neuroendocriniennes. Cela suggère que ces peptides pourraient provenir d'une nouvelle classe de peptides vasoactifs endogènes. Ceci nous a encouragé à rechercher de nouvelles cibles moléculaires pour ces peptides. Nous avons choisi des récepteurs cholinergiques nicotiniques (nAChR) pour caractériser l'effet induit pour BPP, car ils sont présents dans les cellules de surface des vaisseaux sanguins et dans le système nerveux central. Aucun effet direct des BPP sur l'activité nAChR n'a pu être observée, bien que l'inhibition du récepteur provoquée par l'antagoniste MK-801 ait été inversée par le BPP-10c, qui est l'un des plus efficaces pour réduire la pression artérielle systolique des rats anesthésiés. Cette découverte suggère que ces peptides pourraient agir comme régulateurs endogènes du nAChR, déplaçant ainsi ces inhibiteurs endogènes assez peu connus et protégeant la fonction normale des récepteurs.

Keywords : Acetylcholine, bradykinin-potentiating peptides (BPPs), cardiovascular system, nicotinic acetylcholine receptor, MK-801 inhibition.

Discovery of bradykinin-potentiating peptides (BPPs) – historical relevance

In 1949, Rocha e Silva and co-workers (1949) described the discovery of bradykinin, which was achieved by using the venom of the Brazilian pit viper *Bothrops jararaca*. Later, the same group (Ferreira *et al.*, 1970a) was able to show that this snake venom contained large quantities of small molecular weight compounds named bradykinin-potentiating factor (BPF), later re-named as bradykinin-potentiating peptides (BPPs) (Ferreira *et al.*, 1970b). The chemical and pharmacological properties of these peptides allowed characterizing them as natural inhibitors of the

angiotensin-converting enzyme (ACE) (Ondetti *et al.*, 1971 ; Stewart, 1971 ; Collier *et al.*, 1973 ; Gavras *et al.*, 1975 ; Johnson *et al.*, 1975 ; Ondetti and Cushman, 1984). The elucidation of this mechanism was essential for the development of captopril, the first active site directed inhibitor of ACE, currently used to treat human hypertension (Komajda and Wimar, 2000 ; Piepho, 2000 ; McInnes, 2001). To date, a large number of BPPs have been described not only in snake venom (Kato and Suzuki, 1970, 1971 ; Cheung-Wu *et al.*, 1982 ; Politi *et al.*, 1985 ; Cintra *et al.*, 1990 ; Ferreira *et al.*, 1992, 1995, 1998 ; Higuchi *et al.*, 1999), but also in scorpions (Ferreira *et al.*, 1993 ; Meki *et al.*, 1995 ; Zeng *et al.*, 2000), and spiders (Sosnina *et al.*,

1990). Characteristically, BPPs consist of 5 to 14 amino acid residues, with both an invariable pyroglutamyl residue at the N-terminus and a proline residue at the C-terminus (Ferreira *et al.*, 1965, 1970b ; Ianzer *et al.*, 2004). Larger BPPs share similar features including a high content of proline residues and the tripeptide Ile-Pro-Pro at the C-terminus (Ianzer *et al.*, 2004). Typically, these peptides display bradykinin-potentiating activity, which is classically detected on isolated guinea-pig ileum preparations (Ufkes *et al.*, 1977).

Our group was the first to clone and sequence a cDNA encoding the precursor protein of BPPs from a cDNA library of *B. jararaca* venom gland (Murayama *et al.*, 1997). Since that many other cDNA clones have been described for other snakes (Higuchi *et al.*, 1999 ; Soares *et al.*, 2005 ; Higuchi *et al.*, 2006 ; Gomes *et al.*, 2007). The precursor protein from these snakes contained a variable number of in tandem aligned BPPs sequences and an invariable C-type natriuretic peptide (CNP) at the C-terminus. The presence of a vasoactive neuropeptide with a recognized paracrine function in the central nervous system and an endocrine action in peripheral tissues (Itoh and Nakao, 1994 ; Thomas, 1994 ; Nascimento-Gomes *et al.*, 1995 ; Cho *et al.*, 1999 ; Takei, 2000) at the C-terminus of BPPs precursor proteins, led us to verify if this precursor was also expressed in non-venomous tissues of *B. jararaca*. In fact, Northern blot analysis of several tissues of this pit viper indicated the presence of BPP-precursor mRNA in snake brain and spleen (Murayama *et al.*, 1997), besides its occurrence in salivary glands (*unpublished data*). Since the positive hybridization signals were not sufficient to confirm the presence of the BPPs in the neuronal precursor protein, taking into account possible shifts in the open reading frame and/or alternative splicing of this mRNA, then, we have also cloned and characterized the BPPs precursor cDNA of the *B. jararaca* brain (Hayashi *et al.*, 2003).

The sequence analysis of this neuronal precursor protein revealed a high level of sequence similarity to that from the venom gland, of about 91.2% of identity (Hayashi *et al.*, 2003). Homologies of the signal peptide and intervening sequences were stated. However, a couple of substitutions and deletions could be observed mainly in regions containing the biologically active peptides, determining a higher variability in the sequences of BPPs expressed in the venom gland than that found in the brain (Hayashi *et al.*, 2003 ; Hayashi and Camargo, 2005). As possible explanation, the precursor protein from the venom gland, containing a larger variety of bioactive peptides, may provide a set of efficient toxins devoted for disrupting the physiological integrity of the snake's preys or predators. However, the brain BPP sequences may just participate in maintaining the control of endogenous physiology of the snake and it would be therefore restricted to sequences with specificity for the snake endogenous targets, which are still unknown. Interestingly, besides the small peptide of 5-aa long residues BPP-5a, only BPP-10c and BPP-13a were found in the precursor sequence from both venom gland and brain tissues. Although all these peptides were shown to be capable to inhibit the somatic ACE, the peptide BPP-10c with the sequence [$\leq$ ENWPHPQIPP] draw special attention due to its high efficiency to decrease the systolic blood pressure of anaesthetized rats and to inhibit the somatic ACE (Hayashi and Camargo, 2005). It is worth mentioning that this peptide was also the first selective inhibitor for the C-terminus active site of ACE to be

described, showing about 400 times more affinity for the C-terminus than to the N-terminus active site (Cotton *et al.*, 2002).

Based on the results of Northern-blot analysis indicating the expression of BPPs in the snake brain, the cDNA isolated from this tissue was used for *in situ* hybridization studies of coronal sections of adult *B. jararaca* brain. The results of these studies revealed the expression of BPP precursor in regions of the snake central nervous system (CNS) such as the ventromedial hypothalamus, paraventricular nucleus, paraventricular organ, and subcommissural organ, which were shown to be involved in the neuroendocrine fluid control and cardiovascular regulation in mammalian CNS (Hayashi *et al.*, 2003). Although several contradictory hypotheses have been proposed, the functional significance of the subcommissural organ is still unknown. One of the most explored hypotheses postulates the involvement of the subcommissural organ in water and electrolyte metabolism, such as the aldosterone secretion, volume reception, thirst, Na^+ excretion, and diuresis (Rodríguez *et al.*, 1992, 1998). Furthermore, worth mentioning is the presence of angiotensin II receptors in the subcommissural organ cells (Ghiani *et al.*, 1988). Recently, it was shown that spontaneously hypertensive rats displayed an increased secretory activity of the subcommissural organ, which seems to be interrelated with the hypertensive state (Castañeyra-Perdomo *et al.*, 1998). The paraventricular organ is known to possess axonal projections to hypothalamic regions, and may be related to specialized endocrine mechanisms in Vertebrates (von Bartheld *et al.*, 1990). Moreover, the efferent neural pathway from the *lamina terminalis* to the hypothalamic paraventricular organ mediates vasopressin secretion in response to the plasma hypertonicity and increased circulating levels of angiotensin II (McKinley *et al.*, 2001). We believe that distribution of this precursor in such regions corroborates with the neuroendocrine functions of these peptides.

Taken together, the presence of BPPs in other tissues of the snake, besides the gland venom, strongly suggests a physiological role for these peptides in the animal (Hayashi and Camargo, 2005). In addition, systematic kinetic and pharmacological study of newly identified BPPs showed that even those showing to be weak inhibitors of somatic ACE could present strong pharmacological activity, acting either as a good potentiator of bradykinin-induced effects or being efficient in anti-hypertensive action (Hayashi *et al.*, 2003 ; Ianzer *et al.*, 2004 ; Hayashi and Camargo, 2005). Based on these observations, our group has dedicated a great effort in order to better understand the mechanism of action of BPPs, which does not seem to be restricted to their ability to inhibit the ACE. So far, the identification of potential novel targets seems to be the next great challenge.

Nicotinic acetylcholine receptors and blood pressure

Some of the regions described for the BPPs expression present a high level of several neurotransmitters receptors with the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) being most commonly expressed. The presence of nAChR subunits in blood vessels allows inferring possible functions for this receptor in the blood pressure regulation and stroking (Kalaria *et al.*, 1994 ; Hawkins *et al.*, 2005). The direct function of the nAChR in the arterial pressure control is supported by

expression of $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ and $\alpha 10$ subunits in the rat vascular system (Bruggmann *et al.*, 2002).

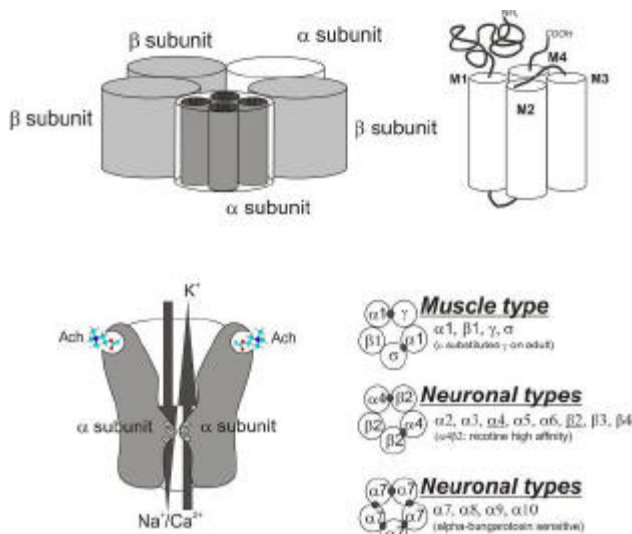


Fig. 1. Structure et sous-unités des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR). (A) Chaque nAChR est composé par cinq sous-unités, dont au moins deux sous-unités alpha. Chaque sous-unité est une protéine composée de 4 domaines transmembranaires (M1, M2, M3 et M4). M4 forme le pore du canal et contrôle le mécanisme d'entrée qui est modifié par la liaison d'un agoniste. (B) La liaison de l'agoniste de l'acétylcholine (ACh) au récepteur provoque un changement de la conformation des sous-unités alpha, ce qui aboutit à l'ouverture du pore au centre du canal. Ce pore permet l'entrée d'ions sodium et calcium et la sortie d'ions potassium. Différents agencements des sous-unités peuvent se rencontrer dans chacun des différents types de nAChR distribués dans tout l'organisme. Certains d'entre eux sont homomériques, comme $\alpha 7$, 8, 9 et 10. Dans certains cas, plus d'un site de liaison de l'ACh est observé (indiqué par les petits points noirs entre les sous-unités du côté droit du schéma B).

Acetylcholine (ACh) is a neurotransmitter, leading to signaling cascades that, depending on the cell type, can result in continuation of a nerve impulse, movement of muscle, or other responses in other tissues (Kandel *et al.*, 1995). Receptors for acetylcholine and other cholinergic receptor agonists including carbamylcholine (Cch) can be divided into two types, nicotinic ligand-gated ion channels and muscarinic metabotropic receptors (Kalamida *et al.*, 2007). nAChR are present in many tissues in the body : (1) neuronal nAChR are present in the central and peripheral nervous system and also in blood vessel surface cells ; and (2) neuromuscular nAChR are present in neuromuscular junctions of somatic muscles (Kandel, 2000). Different compositions of subunits can be found in each different

types of nAChR distinctly distributed throughout the living organism causing influx of sodium and calcium and efflux of potassium through the pore opened after the binding of two agonists molecules (acetylcholine) at the alpha subunits, although activation at low frequency has been observed with a single agonist molecule at the receptors (Sine *et al.*, 2006). Each subunit is composed of four transmembrane alpha-helix named M1, M2, M3 and M4. M2 is the principal component forming the pore when five subunits are assembled together at the cell membrane (Figure 1). nAChR is inhibited by anesthetics (procaine, lidocaine and others), the anti-convulsant MK-801, abused drugs (cocaine, phencyclidine) and animal neurotoxins (snake bungarotoxins, cembranoid coral toxins among others ; see illustration in Figure 2). The nAChR is a prototype member of membrane proteins and it is structurally related to ligand-gated ion channels (Lester *et al.*, 2004 ; Sine *et al.*, 2006 ; Corringer *et al.*, 2008). These proteins regulate intercellular communication between cells of the mammalian nervous system, a process considered to be essential for brain function (Crick, 1994). The mechanisms by which these compounds inhibit nAChR have been studied throughout the last decades. An initial proposed mechanism based on single-channel-recording measurements suggested that inhibitors enter the open channel and block it (Adams, 1976 ; Neher and Steinbach, 1978). A variation of this model proposes that inhibitors bind open or closed channels – possibly at a second “regulatory” site – and disable the channels. A more recent model – based on transient kinetic studies using MK-801 (an anti-convulsant drug) and cocaine – suggests that inhibitors bind both open or closed channels, but only the inhibitor-bound closed channel is disabled and will not open (Hess *et al.*, 2000 ; Ulrich and Gameiro, 2001).

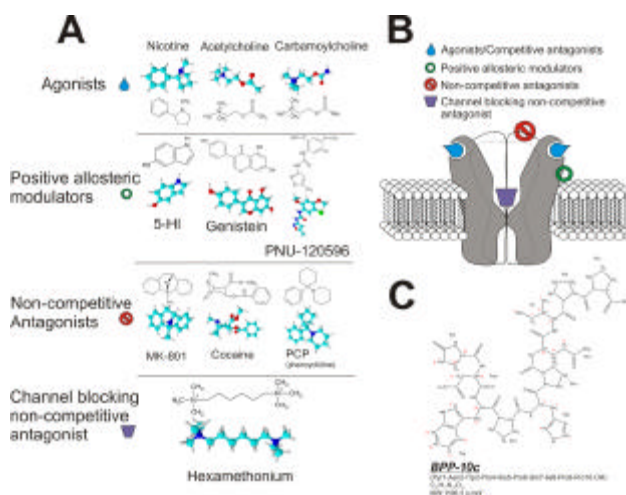


Fig. 2. Composés affectant les nAChR. Les composés montrés en (A) stimulent l'activité du récepteur en tant qu'agonistes, ou se lient à des sites différents du site de liaison du ligand. Ils peuvent activer ou inhiber la fonction des nAChR de façon allostérique. (B) Présentation schématique d'un agoniste allostérique liant le site du nAChR. (C) L'oligopeptide BPP-10c riche en proline, qui restaure la fonction normale du nAChR en se liant au site allostérique.

types of nAChR distinctly distributed throughout the living organism causing influx of sodium and calcium and efflux of potassium through the pore opened after the binding of two agonists molecules (acetylcholine) at the alpha subunits, although activation at low frequency has been observed with a single agonist molecule at the receptors (Sine *et al.*, 2006). Each subunit is composed of four transmembrane alpha-helix named M1, M2, M3 and M4. M2 is the principal component forming the pore when five subunits are assembled together at the cell membrane (Figure 1). nAChR is inhibited by anesthetics (procaine, lidocaine and others), the anti-convulsant MK-801, abused drugs (cocaine, phencyclidine) and animal neurotoxins (snake bungarotoxins, cembranoid coral toxins among others ; see illustration in Figure 2). The nAChR is a prototype member of membrane proteins and it is structurally related to ligand-gated ion channels (Lester *et al.*, 2004 ; Sine *et al.*, 2006 ; Corringer *et al.*, 2008). These proteins regulate intercellular communication between cells of the mammalian nervous system, a process considered to be essential for brain function (Crick, 1994). The mechanisms by which these compounds inhibit nAChR have been studied throughout the last decades. An initial proposed mechanism based on single-channel-recording measurements suggested that inhibitors enter the open channel and block it (Adams, 1976 ; Neher and Steinbach, 1978). A variation of this model proposes that inhibitors bind open or closed channels – possibly at a second “regulatory” site – and disable the channels. A more recent model – based on transient kinetic studies using MK-801 (an anti-convulsant drug) and cocaine – suggests that inhibitors bind both open or closed channels, but only the inhibitor-bound closed channel is disabled and will not open (Hess *et al.*, 2000 ; Ulrich and Gameiro, 2001).

As stated above, the nicotinic acetylcholine receptors have also been found on mammalian cerebral blood vessels, indicating their possible function in blood pressure regulation and stroke. Both, muscarinic as well as nicotinic receptors are present in vascular endothelial cells even in the brain (Furchgott and Zawadzki, 1980 ; Kalaria *et al.*, 1994 ; Bruggmann *et al.*, 2002). The direct function of the nAChR in the arterial blood pressure control is not only supported by the work of Bruggmann and collaborators (Bruggmann *et al.*, 2002), where the expression of several alpha subunits were detected in the vascular system of the rat. It was also shown that ACh induces a concentration-dependent vasodilatation in skin slices affected by nicotine, an agonist/antagonist of this receptor (Black *et al.*, 2001). A number of natural products, specially toxins, have been shown to act on membrane proteins, contributing to the identification of ion channels, the understanding of several channelopathies at molecular level and also to the discovery of peptide toxins with high potential to be used as "leads" for development of new drugs (Yamazaki *et al.*, 2002 ; Lewis and Garcia, 2003 ; Ellis and Smith, 2004 ; Bogin, 2005).

Inhibition of nAChR activity

The flow method used for rapid ligand application has been previously described (Krishtal and Pidoplichko, 1980 ; Udgaonkar and Hess, 1987). In this system, a cell in the whole-cell recording configuration is placed at the porthole of a U-tube made of a stainless steel needle accordingly with the cell flow method (Udgaonkar and Hess, 1987). Carbamoylcholine (CCh), a stable analog of acetylcholine, is applied to induce ion flow through nAChR channels, while MK-801 was used as non-competitive antagonist of these channels. Ion flow as measure for nAChR activity was induced by 2 s perfusion of the cells from the U-tube with various concentrations of CCh either in the absence or in the presence of MK-801 (Figure 3).

The maximum amplitude of current is a measure of the concentration of open channels. As receptor desensitization already occurs while the ligand solution is flushed over the cell surface, the observed current amplitudes were corrected for receptor desensitization, using the equation (Udgaonkar and Hess, 1987 ; Ulrich *et al.*, 2008) :

$$I(t) = I_{1e}^{-t/\tau_1} + I_{2e}^{-t/\tau_2} + I_e$$

where $I(t)$ is the maximum current amplitude at time t . I_1 , I_2 , and I_e are the maximum current amplitudes for the first, second, and equilibrium components. τ_1 and τ_2 are the time constants for the first and second components. This equation was fitted to the decreasing part of the recording, and the observed maximum current amplitude was corrected for receptor desensitization accordingly. In order to assess BPP-10c effects on nicotinic receptor activity, whole-cell currents induced by CCh concentrations between 0.02 and 3 mM CCh were determined by the cell-flow technique.

For these assays, we have used PC12 cells on day 6 of neuronal differentiation for the determination of nAChR activity, as the cells were shown to endogenously express alpha3, alpha5, alpha7, beta2 and beta4 nAChR subunits (Magdesian *et al.*, 2005).

Employing this method on these cells, the EC_{50} (percentage of ligand concentration needed for half maximal receptor activation) was determined as $157 \pm 2 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0.96$) for CCh as an agonist, and Hill slope

was 1.49 ± 0.04 (solid line ; $R^2 = 0.96$), suggesting the presence of the two classical CCh binding sites for channel opening (Herz *et al.*, 1989). The dissociation constant for CCh to the receptor (K_1) for receptor activation was calculated as $0.11 \pm 0.01 \text{ mM}$, according to equation 2 below. Remember that BPP-10c by itself (25-200 μM) neither provoked nAChR activity nor acted as an allosteric potentiator of CCh-induced ion flow (Nery *et al.*, 2008).

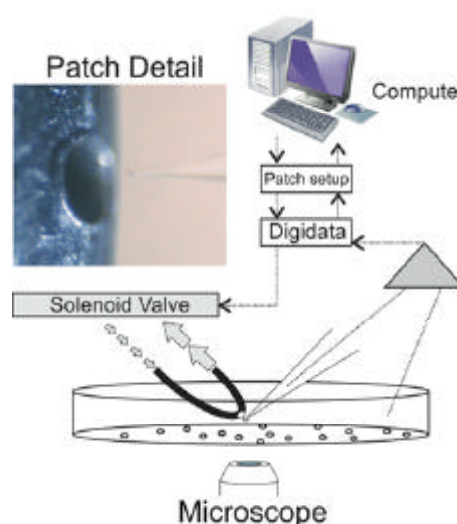


Fig. 3. Cell flow technique with ms time resolution in whole-cell recording patch-clamp experiments. Ligand flows through a U-tube device. Upon triggering a solenoid valve, the outflow of the U-tube is closed and the ligand solution subsequently is dispensed over the cell in a laminar flow within 10 ms. The ligand solution remains in contact with the cell surface for 2 s. Then the solenoid valve opens again and the ligand solution is sucked back through the porthole of the U-tube (more details can be found in the text).

Fig. 3. Technique de flux cellulaire à résolution temporelle dans des expériences de "patch-clamp" en configuration "cellule entière". La solution contenant le ligand s'écoule au travers d'un système de tube en forme de "U". En actionnant une valve solénoïdale, l'écoulement du tube en "U" est fermé. Par la suite, la solution contenant le ligand est dispensée sur la cellule en moins de 10 ms, selon un flux laminaire, et reste en contact avec la surface cellulaire pendant 2 s. Finalement, la valve solénoïdale s'ouvre de nouveau et la solution contenant le ligand est aspirée via un petit trou se trouvant sur le tube en "U" (voir le texte pour plus de détails).

The relation between A , the measured whole-cell current amplitude, and the concentration of open receptor channels had been already derived for acetylcholine as an agonist and adapted to apply to cell-flow measurements (Hess *et al.*, 2000). When the initial ligand concentration is much larger than the number of moles of receptor in the absence of desensitization, this relation is given by (Udgaonkar and Hess, 1987) :

$$A = A_{\max} \left[\frac{K_1}{([CCh] + 1)} \Phi + 1 \right]^{-1}$$

A least-squares regression to the logistic equation was used to evaluate the constants. $A_{\max}$ is the maximum current that can be obtained from one cell when all the receptor channels are open. K_1 is the dissociation constant of the neurotransmitter from the receptor, Φ^{-1} is the channel-opening equilibrium constant, and $[CCh]$ denotes the concentration of the agonist.

The equation used to analyze the inhibition of the

nicotinic acetylcholine receptors by MK-801 is described below :

$$A/A_i = 1 + [i]/K_i$$

A and A_i are measured whole-cell current amplitudes in the absence or presence of the inhibitor, respectively. $[i]$ represents the molar concentration of the inhibitor MK-801, and K_i is the dissociation constant for the inhibitor-receptor binding.

BPP-induced alleviation of nAChR inhibition

The alleviation of the nAChR inhibition was analyzed using the following equation, according to (Hess *et al.*, 2000) :

$$A/A_i = 1 + (K_{BPP}/(K_{BPP} + [BPP]))([i]/K_i)$$

[BPP] is the concentration of BPP-10c or scramble peptide, K_{BPP} is the dissociation constant for displacement of MK-801 by BPP-10c or scramble peptide, and all the other constants have been described before.

As mechanism for MK-801-induced inhibition of nAChR, it has been suggested that the drug binds with higher affinity to the regulatory sites present on closed channel-forms than to those present on open-channel forms, thereby affecting the channel-opening and closing equilibrium towards inactive receptor forms (Hess and Grewer, 1998 ; Hess *et al.*, 2000) this binding site, in accordance with recent works, should be at the non- α interfaces as the cocaine one (Hansen and Taylor 2007). In addition to MK-801, other small structure-related compounds, including cocaine, phencyclidine (PCP) and tenocyclidine (TCP, thienyl cyclohexyl piperidine), compete with MK-801 for receptor binding and inhibit nAChR activity (Hess *et al.*, 2000 ; Ulrich *et al.*, 1998 ; Ulrich and Gameiro, 2001). Similar mechanisms for receptor inhibition are proposed for other compounds of therapeutic importance including procaine (Karpen *et al.*, 1986 ; Hess, 1996). The mechanism of inhibition and protection of the nAChR has been extensively studied, and the existence of compounds that reverse the inhibition of the receptor was presumed (Ulrich *et al.*, 1998 ; Hess *et al.*, 2000, 2003). Using fast kinetics electrophysiological techniques named "cell flow", combinatory chemistry synthesis and drug design based on known structures led to the discovery of compounds that are able to displace the inhibitor of the regulatory site of the receptor, without the inhibition of the receptor. These studies led to the development of RNA aptamers and a cocaine analogue (RTI-4229-70), which in nanomolar or low micromolar concentrations protect the muscular nAChR against inhibition by 150 μ M MK-801 or cocaine (Hess *et al.*, 2000, 2003 ; Cui *et al.*, 2004). RNA aptamers and cocaine analogues have been used for studying the mechanism of nAChR inhibition and led to the discovery that compounds that bind with equal affinities to the allosteric sites present on open and closed receptor channels do not interfere with normal receptor function. These compounds displace inhibitors from their binding sites on receptors and, therefore, alleviate nAChR inhibition (Hess *et al.*, 2000, 2003 ; Ulrich and Gameiro, 2001 ; Nery *et al.*, 2008).

However, we were the first to describe a concentration dependent displacement of the allosteric inhibitor MK-801 from the regulatory site of nAChR by a natural peptide. Using the above-described model, we

could show that, in spite of the fact that the bradykinin-potentiating peptide BPP-10c did not potentiate the agonist-induced receptor activity, the peptide alleviated, in a dose-dependent manner, MK-801-induced receptor inhibition (Nery *et al.*, 2008). These data confirm that endogenous compounds exist in addition to RNA aptamers and synthetic analogues of cocaine. Neither the less, more yet unknown endogenous compounds may also induce allosteric regulation of nAChR activity.

The implication of nAChR on blood pressure control was demonstrated in several works in which cholinergic receptor agonists elicited dose-dependent changes in blood pressure (Khan *et al.*, 1994, 2001 ; Gattu *et al.*, 1997). As already pointed out, nAChR are expressed in the cardiovascular system. Moreover, α 3 subunits containing nAChR, which are also expressed by PC12 cells, participate as main mediators of fast synaptic transmission in the autonomic nervous system and are involved in neurotransmission of sympathetic and parasympathetic nerves innervating the heart (De Biasi, 2002). In agreement, α 3 receptor knock-out mice suffer from severe heart disease (De Biasi, 2002). Consequently, inhibition of sympathetic neural activity can cause vascular and heart disease. It is also worth mentioning that Buyukcoskun and collaborators (Buyukcoskun *et al.*, 2001) have shown a participation of the cholinergic system for the dose-dependent increase of conscious rat blood pressure determined by intracerebroventricular : injection of angiotensin II. In view of that, anti-hypertensive actions exerted by BPPs are supposed to be due to both the inhibition of ACE as well as the recovery of the nAChR normal function. In this regard, our work foresees the existence of endogenous compounds that allosterically inhibit nAChR. The reversion of such inhibition would be one of the crucial effects of BPPs.

Although further studies are needed to accomplish the action of natural ACE inhibitors as hypertension modulators through other mediators, BPPs from *B. jararaca* venom have been related in establishing nAChR normal activity, which could contribute to the hypotensive properties of these peptides additionally to the classical ACE inhibiting pathway. The demonstration that BPPs were able to displace specific blockers of this receptor in a dose dependent manner, besides not showing a direct agonist or antagonist effect on the AChR, reveals also possible therapeutic applications for BPP-10c in establishing normal acetylcholine receptor activity.

In summary, we suggest here that the BPPs are strong candidates to be used for the treatment of cardiovascular and cerebral effects of cocaine and other agents that are able to act by similar manner, e.g. by inhibiting the nAChR through binding to a common regulatory site.

Acknowledgements. This study was supported by a grant from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Adams P.R. (1976) Drug blockade of open end-plate channels. *J. Physiol. (London)* 260:531-2.
- Black C.E., Huang N., Neligan P.C., Levine R.H., Lipa J.E., Lintlop S., Forrest C.R., Pang C.Y. (2001) Effect of nicotine on vasoconstrictor and vasodilator responses in human skin vasculature. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*

- 281:R1097-104.
- Brüggmann D., Lips K.S., Pfeil U., Haberberger R.V., Kummer W. (2002) Multiple nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits are expressed in the arterial system of the rat. *Histochem. Cell. Biol.* 118:441-7.
- Buyukcoskun N.I., Gulec G., Ozluk K. (2001) A central link between angiotensinergic and cholinergic systems; role of vasopressin. *Peptides* 22:1415-20.
- Castañeyra-Perdomo A., Carmona-Calero E., Meyer G., Pérez-González H., Pérez-Delgado M.M., Marrero-Gordillo N., Rodríguez S., Rodríguez E. (1998) Changes in the secretory activity of the sub-commissural organ of spontaneously hypertensive rats. *Neurosci. Lett.* 246:133-6.
- Cheung-Wu C., Mao-Ying W., Shan-Shan L., Ting-Hwo C. (1982) Structure-function studies on the bradykinin potentiating peptide from Chinese snake venom (*Agkistrodon halys pallas*). *Agents and Actions* 9:282-8.
- Cho Y., Somer B.G., Amatya A. (1999) Natriuretic peptides and their therapeutic potential. *Heart Dis.* 1:305-28.
- Cintra A.C.O., Vieira C.A., Giglio J.R. (1990) Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom. *J. Prot. Chem.* 9:221-7.
- Collier J.G., Robinson B.F., Vane J.R. (1973) Reduction of pressor effects of angiotensin I in man by synthetic nonapeptide (B.P.P. 9a or SQ 20,881) which inhibits converting enzyme. *Lancet* 1:72-4.
- Corringer P.J., Changeux J.P. (2008) Nicotinic acetylcholine receptors. *Scholarpedia* 3:3468.
- Cotton J., Hayashi M.A., Cuniasse P., Vazeux G., Ianzer D., De Camargo A.C., Dive V. (2002) Selective inhibition of the C-domain of angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiating peptides. *Biochemistry* 41:6065-71.
- Crick F. (1994) The Astonishing Hypothesis. New York: Scribner's.
- Cui Y., Ulrich H., Hess G.P. (2004) Selection of 2'-fluoro-modified RNA aptamers for alleviation of cocaine and MK-801 inhibition of the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Membr. Biol.* 202(3): 137-49.
- De Biasi M. (2002) Nicotinic receptor mutant mice in the study of autonomic function. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 1:331-6. Review.
- Ellis C., Smith A. (2004) Highlighting the pitfalls and possibilities of drug research. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3:238-78.
- Ferreira L.A., Alves E.W., Henriques O.B., Peptide T. (1993) A novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* 31:941-7.
- Ferreira L.A., Galle A., Raida M., Schrader M., Lebrun I., Habermehl, G. (1998) Isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. *J. Protein Chem.* 17: 285-9.
- Ferreira L.A., Henriques O.B., Lebrun I., Batista M.B., Prezoto B.C., Andreoni A.S., et al. (1992b) A new bradykinin-potentiating peptide (peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (jararacucu tapete, urutu dourado). *Toxicon* 30:33-40.
- Ferreira L.A., Mollring T., Lebrun F.L., Raida M., Znottk R., Habermehl G.G. (1995) Structure and effects of a kinin potentiating fraction F (AppF) isolated from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* venom. *Toxicon* 33:1313-9.
- Ferreira S.H., Bartelt D.C., Greene L.J. (1970b) Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 9:2583-93.
- Ferreira S.H., Greene L.H., Alabaster V.A., Bakhle Y.S., Vane J.R. (1970a) Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin I converting enzyme. *Nature* 225:379-80.
- Ferreira S.H., Rocha e Silva M. (1965) Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia* 21:347-9.
- Furchgott R.F., Zawadzki J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-6.
- Gattu M., Terry A.V. Jr., Pauly J.R., Buccafusco J.J. (1997) Cognitive impairment in spontaneously hypertensive rats: role of central nicotinic receptors. Part II. *Brain Res.* 771:104-14.
- Gavras H., Brunner H.R., Laragh J.H., Gavras I., Vukovich R.A. (1975) The use of angiotensin-converting enzyme inhibitor in the diagnosis and treatment of hypertension. *Clin. Sci. Mol. Med. (Suppl.)* 48:57s-60s.
- Ghiani P., Uva B., Vallarino M., Mandich A., Masini M. (1988) Angiotensin II specific receptors in subcommissural organ. *Neurosci Lett.* 85:212-6.
- Gomes C.L., Konno K., Conceição I.M., Ianzer D., Yamanouye N., Prezoto B.C., Assakura M.T., Rádis-Baptista G., Yamane T., Santos R.A., Camargo A.C., Hayashi M.A. (2007) Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. *Biochem. Pharmacol.* 74:1350-60.
- Hansen S.B., Taylor P. (2007) Galanthamine and non-competitive inhibitor binding to ACh-binding protein: evidence for a binding site on non-alpha-subunit interfaces of heteromeric neuronal nicotinic receptors. *J. Mol. Biol.* 369:895-901.
- Hawkins B.T., Egleton R.D., Davis T.P. (2005) Modulation of cerebral microvascular permeability by endothelial nicotinic acetylcholine receptors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289:H212-9.
- Hayashi M.A., Camargo A.C. (2005) The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicon* 45:1163-70. Review.
- Hayashi M.A., Murbach A.F., Ianzer D., Portaro F.C., Prezoto B.C., Fernandes B.L., Silveira P.F., Silva C.A., Pires R.S., Britto L.R., Dive V., Camargo A.C. (2003) The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. *J. Neurochem.* 85:969-977.
- Herz J.M., Johnson D.A., Taylor P. (1989) Distance between the agonist and noncompetitive inhibitor sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 264:12439-48.
- Hess G.P. (1996) Determination of the chemical mechanism of neurotransmitter receptor-mediated reactions by rapid chemical kinetic methods. *Arch. Physiol. Biochem.* 104:752-61. Review.
- Hess G.P., Gameiro A.M., Schoenfeld R.C., Chen Y., Ulrich H., Nye J.A. (2003) Reversing the action of non-competitive inhibitors (MK-801 and cocaine) on a protein (nicotinic acetylcholine receptor) mediated reacted. *Biochemistry* 42: 6106-14.
- Hess G.P., Grever C. (1998) Development and application of caged ligands for neurotransmitter receptors in transient kinetic and neuronal circuit mapping studies. *Methods Enzymol.* 291: 443-73. Review.
- Hess G.P., Ulrich H., Breiting H.G., Niu L., Gameiro A.M., Grever C., Srivastava S., Ippolito J.E., Lee S.M., Jayaraman V., Coombs S.E. (2000) Mechanism-based discovery of ligands that counteract inhibition of the nicotinic acetylcholine receptor by cocaine and MK-801. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:13895-900.
- Higuchi S., Murayama N., Saguchi K., Ohi H., Fujita Y., Camargo A.C., Ogawa T., Deshimaru M., Ohno M. (1999) Bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptides from snake venom. *Immunopharmacology* 44:129-35.
- Higuchi S., Murayama N., Saguchi K., Ohi H., Fujita Y., Silva N.J. Jr, Siqueira R.J., Lahlou S., Aird S.D. (2006) A novel peptide from the ACEI/BPP-CNP precursor in the venom of *Crotalus durissus collilineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 144:107-21.
- Ianzer D., Konno K., Marques-Porto R., Vieira Portaro F.C., Stöcklin R., Martins de Camargo A.C., Pimenta D.C. (2004)

- Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides* 25:1085-92.
- Ianzer D., Santos R.A., Etelvino G.M., Xavier C.H., Almeida Santos J., Mendes E.P., et al. (2007) Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) I involve ACE-independent mechanisms? New insights from proline-rich peptides of *Bothrops jararaca*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322: 795-805.
- Itoh H., Nakao K. (1994) Antagonism between the vascular rennin-angiotensin and natriuretic peptide systems in vascular remodeling. *Blood Pressure (Suppl.)* 5:49-53.
- Johnson J.G., Black W.D., Vukovich R.A., Hatch Jr. F.E., Friedman B.I., Blackwell C.F. (1975) Treatment of patients with severe hypertension by inhibition of angiotensin-converting enzyme. *Clin. Sci. Mol. Med. (Suppl.)* 48:53s-6s.
- Kalamida D., Poulas K., Avramopoulou V., Fostieri E., Lagoumintzis G., Lazaridis K., Sideri A., Zouridakis M., Tzartos S.J. (2007) Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *FEBS J.* 274:3799-845.
- Kalaria R.N., Homayoun P., Whitehouse P.J. (1994) Nicotinic cholinergic receptors associated with mammalian cerebral vessels. *J. Auton. Nerv. Syst.* 49 (Suppl.):S3-7.
- Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. (2000) Principles of Neural Science. New York, US, McGraw-Hill, 11, 187-202.
- Karpen J.W., Hess G.P. (1986) Cocaine, phencyclidine, and procaine inhibition of the acetylcholine receptor: characterization of the binding site by stopped-flow measurements of receptor-controlled ion flux in membrane vesicles. *Biochemistry* 25:1777-85.
- Kato H., Suzuki T. (1970) Structure of bradykinin-potentiating peptide containing tryptophan from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. *Experientia* 26:1205-6.
- Kato H., Suzuki T. (1971) Bradykinin-potentiating peptides from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. Isolation of five bradykinin potentiators and the amino acid sequences of two of them, potentiators B and C. *Biochemistry* 10:972-80.
- Khan I.M., Printz M.P., Yaksh T.L., Taylor P. (1994) Augmented responses to intrathecal nicotinic agonists in spontaneous hypertension. *Hypertension* 24:611-9.
- Khan I.M., Stanislaus S., Zhang L., Vaughn D., Printz M.P., Yaksh T.L., Taylor P. (2001) Spinal nicotinic receptor activity in a genetic model of hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 23:555-68.
- Komajda M., Wimart M.C. (2000) Angiotensin converting enzyme inhibition: from viper to patient. *Heart* 84 (Suppl. 1):i11-4: discussion i50. Review.
- Krishtal O., Pidoplichko V.I. (1980) A receptor for protons in the nerve cell membrane, *Neuroscience* 5:2324-7.
- Lester H.A., Dibas M.I., Dahan D.S., Leite J.F., Dougherty D.A. (2004) Cys-loop receptors : new twists and turns. *Trends Neurosci.* 27:329-36.
- Lewis R.J., Garcia M.L. (2003) Therapeutic potential of venom peptides. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:790-802. Review
- Magdesian M.H., Nery A.A., Martins A.H., Juliano M.A., Juliano L., Ulrich H. (2005) Peptide blockers of the inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by amyloid beta. *J. Biol. Chem.* 280:31085-90.
- McInnes G.T. (2001) Clinical potential: angiotensin converting enzyme inhibitor or angiotensin II antagonist? *J. Hypertens. (Suppl.)* 19:S61-7. Review.
- McKinley M.J., Allen A.M., May C.N., McAllen R.M., Oldfield B.J., Sly D., Mendelsohn F.A.O. (2001) Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28:990-2.
- Meki A.R., Nassar A.Y., Rochat H (1995) A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. *Peptides* 16:1359-65.
- Murayama N., Hayashi M.A.F., Ohi H., Ferreira L.A.F., Hermann V.V., Saito H., Fujita Y., Higuchi S., Fernandes B.L., Yamane T., Camargo A.C.M. (1997) Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1189-93.
- Nascimento-Gomes G., Souza M.O., Vecchia M.G., Oshiro M.E.M., Ferreira A.T., Mello-Ayres M. (1995) Atrial natriuretic peptide modulates the effects of angiotensin II on the concentration of free calcium in the cytosol of Mandin-Darby canine kidney cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28:609-13.
- Neher E, Steinbach J.H. (1978) Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *J. Physiol.* 277:153-76.
- Nery A.A., Trujillo C.A., Lameu C., Konno K., Oliveira V., Camargo A.C.M., Ulrich H., Hayashi M.F. (2008) A novel physiological property of snake bradykinin-potentiating peptides – reversion of MK-801 inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. *Peptides* 29:1708-15.
- Ondetti M.A., Cushman D.W. (1984) Angiotensin-converting enzyme inhibitors: biochemical properties and biological actions. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 16:381-411.
- Ondetti M.A., Williams N.J., Sabo E.F., Pluscec J., Weaver E.R., Kocy O. (1971) Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* 10:4033-9.
- Piepho R.W. (2000) Overview of the angiotensin-converting-enzyme inhibitors. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 57 (Suppl. 1):S3-7. Review.
- Politi V., De Luca G., Di Stazio G., Schinina E., Bossa F. (1985) A new peptide from *Crotalus atrox* snake venom. *Peptides* 6:343-6.
- Rocha e Silva M., Beraldo W.T., Rosenfeld G. (1949) Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* 156:261-73.
- Rodriguez E.M., Oksche A., Hein S., Yulis C.R. (1992) Cell biology of the subcommissural organ. *Int. Rev. Cytol.* 135:39-121.
- Rodríguez E.M., Rodríguez S., Hein S. (1998) The subcommissural organ. *Microsc. Res. Tech.* 41:98-123.
- Sine S.M., Engel A.G. (2006) Recent Advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* 440:445-55.
- Soares M.R., Oliveira-Carvalho A.L., Wermelinger L.S., Zingali R.B., Ho P.L., Junqueira-de-Azevedo I.L., Diniz M.R. (2005) Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. *Toxicon* 46:31-8.
- Sosnina N.A.A., Golubenco Z., Akhunov A.A., Kugaevskaya E.V., Eliseeva Y.E., Orekhovich V.N. (1990) Bradykinin-potentiating peptides from the spider *Latrodectus tredecimguttatus*—inhibitors of carboxypeptidase and of a preparation of karakurt venom kininase. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 315:281-4.
- Stewart M.J., Ferreira S.H., Greene L.J. (1971) Bradykinin potentiating peptide PCA-Lys-Trp-Ala-Pro – an inhibitor of the pulmonary inactivation of bradykinin and conversion of angiotensin I to II. *Biochem. Pharmacol.* 20:1557-67.
- Takei Y. (2000) Structural and functional evolution of the natriuretic peptide system in vertebrates. *Int. Rev. Cytol.* 194: 1-66.
- Thomas H.C. (eds.) (1994) Minisymposium: The natriuretic peptide hormones. *J. Int. Med.* 235:505-76.
- Udgaonkar J.B., Hess G.P. (1987) Acetylcholine receptor: channel-opening kinetics evaluated by rapid chemical kinetic and single-channel current measurements. *Biophys. J.* 52:873-83.
- Udgaonkar J.B., Hess G.P. (1987) Chemical kinetic measurements of a mammalian acetylcholine receptor using a fast reaction technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:8758-62.
- Ufkes J.G., Aarsen P.N., van der Meer C. (1977) The mechanism of action of two bradykinin-potentiating peptides on isolated smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 44:89-97.

- Ulrich H., Akk G., Nery A.A., Trujillo C.A., Rodriguez A.D., Eterovic V.A. (2008) Mode of cembranoid action on embryonic muscle acetylcholine receptor. *J. Neurosci. Res.* 86:93-107.
- Ulrich H., Ippolito J.E., Pagan O.R., Eterovic V.E., Hann R.M., Shi H., Lis J.T., Eldefrawi M.E., Hess G.P. (1998) *In vitro* selection of RNA molecules that displace cocaine from the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:14051-6.
- von Bartheld C.S., Meyer D.L. (1990) Paraventricular organ of the lungfish *Protopterus dolloi*: morphology and projections of CSF-contacting neurons. *J. Comp. Neurol.* 297:410-34.
- Yamazaki Y., Koike H., Sugiyama Y., Motoyoshi K., Wada T., Hishinuma S., Mita M., Morita T. (2002) Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction. *Eur. J. Biochem.* 269:2708-15.
- Zeng X.C., Li W.X., Peng F., Zhu Z.H. (2000) Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpp) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii*. *Karsch IUBMB Life* 49:207-10.
-

Toxines et identification des sous-types de récepteurs nicotiniques neuronaux d'insectes

Béatrice BODEREAU, Hélène TRICOIRE-LEIGNEL, Bruno LAPIED, Steeve H. THANY*

Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), UPRES EA 2647/USC INRA IFR QUASAV, Université d'Angers, UFR Sciences, 49045 Angers, France.

* Auteur correspondant ; Tél : +33 (0)2 42 73 52 13 ; Fax : +33 (0)2 41 73 52 15 ;

Courriel : steeve.thany@univ-angers.fr

Résumé

Les récepteurs neuronaux de l'acétylcholine de type nicotinique (nAChR) forment une famille de récepteurs multigéniques constitués de cinq sous-unités organisées autour d'un axe de pseudo-symétrie qui est le pore du canal. Ces récepteurs ont plusieurs fonctions spécifiques chez les insectes. Compte tenu de leur importance fondamentale au sein du système nerveux central, ils constituent une cible principale pour les insecticides néonicotinoïdes. Deux sous-types de récepteurs nicotiniques neuronaux ont été identifiés dans le système nerveux en fonction de leur sensibilité ou non à l'alpha-bungarotoxine (α -Bgt). Des études récentes montrent que les récepteurs sensibles à l' α -Bgt seraient, notamment, impliqués dans la neurotransmission rapide, la régulation de la plasticité cellulaire ainsi que dans les processus de mémorisation à long terme. Par ailleurs, des récepteurs insensibles à l' α -Bgt mais sensibles à l' α -conotoxine ImI ont été identifiés, suggérant des sites de liaison différents pour ces deux toxines sur les nAChR d'insectes. La comparaison des séquences des sous-unités des nAChR de mammifères et d'insectes confirme la présence de sites de liaison potentiels de différentes toxines sur les nAChR d'insectes. Les toxines animales demeurent ainsi des outils fondamentaux pour la caractérisation des sous-types de récepteurs nicotiniques neuronaux et aussi pour la mise en place de modèles d'étude des interactions ligand-récepteur. Cette revue a pour objectif de montrer le rôle des toxines dans l'étude des propriétés pharmacologiques et fonctionnelles des nAChR d'insectes.

Toxins and identification of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes in insects

Neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), a multigenic receptors' family, are constituted of five subunits organized around a pseudosymmetric axis, the channel pore. These homomeric or heteromeric pentamers play crucial physiological functions in the insect central nervous system. They represent a major target for neonicotinoid insecticides. In the insect nervous system, two distinct alpha-bungarotoxin (α -Bgt)-sensitive and -insensitive nAChRs have been identified. Recent studies have demonstrated that the α -Bgt-sensitive nAChRs participate in fast neurotransmission, in the regulation of cellular plasticity, as well as in long term memory processes. Moreover, insect α -Bgt-insensitive nAChRs subtypes but sensitive to α -conotoxin ImI have also been identified, suggesting distinct toxin binding domains. In fact, subunit sequence comparison between mammals and insects confirms that potential toxin binding sites exist on insect nAChRs. Consequently, animal toxins remain fundamental tools to characterize neuronal nAChRs subtypes as well as to set ligand-receptor interaction models. The aim of this review is to explore the interest of toxins in the study of functional and pharmacological properties of insect nAChRs.

Keywords : Insect, acetylcholine, nicotinic receptor, toxins.

Introduction

La transmission cholinergique au niveau de la jonction neuromusculaire a été le tout premier modèle d'étude de la transmission nerveuse. Au début des années 70, Changeux et ses collaborateurs ont identifié le récepteur *in vitro* grâce à une toxine purifiée à partir du venin d'un serpent « le Bungare » : l' α -bungarotoxine (α -Bgt) (Lee et Chang, 1966). L' α -Bgt bloque la réponse *in vivo* de l'électroplaque à la carbamylcholine, un agoniste des récepteurs nicotiniques (Changeux et al., 1970). Ces résultats ont permis de purifier et d'étudier la physico-chimie du récepteur nicotinique des Vertébrés et de faire du récepteur de l'organe électrique de la torpille, le prototype de la superfamille des récepteurs canaux chimio-dépendants (Changeux, 1991).

Les récepteurs nicotiniques sont constitués de protéines transmembranaires pentamériques, formant un canal ionique à travers la membrane plasmique dont l'ouverture est provoquée par la liaison à un ligand endogène, l'acétylcholine (ACh) ou par des substances exogènes comme la nicotine. La structure secondaire de chaque sous-unité révèle une organisation commune. Un large domaine amino-terminal (NH_2) extracellulaire porte les composants du site de liaison et la boucle glycosylée « Cys-loop », indispensable au maintien de la structure spatiale du récepteur (Karlin, 2002). Cette partie amino-terminale est suivie de trois segments transmembranaires (M1, M2 et M3), d'un large domaine intracellulaire très variable et enfin d'un quatrième segment transmembranaire (M4) suivi d'un domaine carboxy-terminal extracellulaire (COOH) (Figure 1).

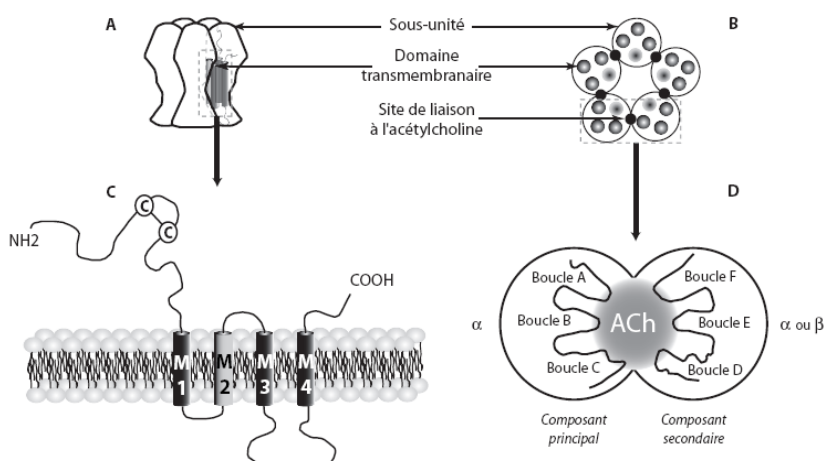


Fig. 1. Le récepteur nicotinique. Schéma d'organisation du récepteur de l'ACh de type nicotinique vu de profil (A) et de dessus (B). Les 5 sous-unités, qui composent le récepteur, sont organisées autour d'un axe pseudo-symétrique, le pore du canal. Chaque sous-unité est composée de 4 domaines transmembranaires de M1 à M4, avec M2 qui participe à la formation du canal (C). Les sous-unités qui possèdent deux cystéines adjacentes au niveau de la partie amino-terminale sont appelées des sous-unités α . Les autres sous-unités sont appelées des sous-unités β . Le site de liaison de l'ACh est formé de deux sous-unités : une sous-unité α et une sous-unité α ou β (D). La première porte le composant principal du site de liaison formé des boucles A, B et C ; la seconde porte le composant secondaire formé des boucles D, E et F.

Fig. 1. The nicotinic receptor. Scheme of nicotinic acetylcholine receptor organisation in sight of profile (A) and top (B). The 5 subunits which compose nicotinic receptor are organized around a pseudosymmetric axis called the central pore. Each subunit consists of 4 transmembrane domains from M1 to M4, in which M2 participates in the channel formation (C). The subunits which present two neighboring cysteines are called α subunits and the others subunits are called β subunits. The acetylcholine binding site is composed of two subunits : an α subunit and an α or β subunit (D). The first one carries the main constituent formed by loops A, B and C ; the second carries the secondary constituent formed by loops D, E and F.

La structure secondaire des sous-unités comporte environ 9 hélices α et 17 feuillets β (Le Novère *et al.*, 1999). Ainsi, le segment amino-terminal extracellulaire est constitué majoritairement de feuillets β , entourés de deux hélices α . Les quatre segments transmembranaires présentent des structures secondaires irrégulières, faites d'alternance de feuillets β et d'hélices α . Le segment M1, par exemple, traverse la membrane sous la forme de feuillets β , alors que le segment M2 est constitué à 75% d'hélices α (Le Novère *et al.*, 1999). Les conséquences de cette organisation en hélices α et feuillets β sur l'affinité des toxines sont détaillées dans les paragraphes suivants.

Généralement, les toxines de serpents qui exercent une action sur les récepteurs nicotiniques neuronaux au niveau de la jonction neuromusculaire sont divisées en deux catégories, les formes longues et les formes courtes (Tsetlin *et al.*, 2004). Les toxines de forme courte présentent une chaîne de 60-62 acides aminés avec 4 ponts disulfure alors que celles de forme longue possèdent 66-74 acides aminés et 5 ponts disulfure. Les études de liaison par affinité ont montré que des toxines comme l' α -Bgt ou l' α -cobratoxine se fixent sur un site de liaison situé à l'interface entre deux sous-unités (Mordvintsev *et al.*, 2005) mais surtout qu'elles sont sélectives de différents sous-types de récepteurs de l'acétylcholine de type nicotinique (nAChR). Ainsi, à l'instar des nAChR de Vertébrés, les toxines constituent un outil pharmacologique fondamental pour la caractérisation des sous-types de récepteurs nicotiniques du système nerveux central (SNC) d'insectes.

Rôles physiologiques des récepteurs de l'acétylcholine de type nicotinique

Les récepteurs de type nicotinique synaptiques

La neurotransmission excitatrice rapide au sein du SNC

d'insectes, implique majoritairement l'ACh qui agit principalement par l'intermédiaire de nAChR. Chez les insectes, aujourd'hui encore, peu de modèles permettent d'étudier avec précision le mode de fonctionnement d'une synapse identifiée entre deux neurones. C'est en partie grâce à la mise au point de la technique électro-physiologique dite de « oil-gap » sur des fibres nerveuses isolées (Hue et Callec, 1990) qu'il a été possible d'étudier la transmission chimique de l'influx nerveux entre les nerfs cercaux et les interneurons géants, en particulier du dernier ganglion abdominal (A6) de la blatte *Periplaneta americana* (Figure 2A). Au niveau de ces synapses, la libération d'ACh déclenche un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE, Figure 2D). Dans ce cas, l'activation des nAChR post-synaptiques, sensibles à l' α -Bgt, produit un courant ionique entrant qui implique les ions potassium et sodium. Des structures synaptiques similaires, qui permettent la transmission excitatrice, ont été identifiées également au niveau du SNC de la mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster* (Su et O'Dowd, 2003), d'*Apis mellifera* (Oleskevich, 1999), mais aussi au niveau des ganglions thoraciques des criquets *Locusta migratoria* et *Schistocerca gregaria* et du papillon *Manduca sexta* (Trimmer et Weeks, 1989 ; Benson, 1992). Dans ce dernier cas, les nAChR impliqués sont insensibles à l' α -Bgt.

Les nAChR synaptiques sensibles à l' α -Bgt sont également connus pour être impliqués dans la régulation de la plasticité cellulaire (Gu *et al.*, 2006). En effet, l'activation de ces récepteurs synaptiques, situés sur les cellules de Kenyon de la drosophile, induirait une entrée de calcium dans la cellule, via ces récepteurs. Cet influx calcique serait suffisant pour produire des changements au cours d'un apprentissage associatif. Il est à noter que l'implication de ces nAChR sensibles à l' α -Bgt dans les processus de mémorisation et d'apprentissage a été confirmée par des travaux récents de Gauthier et collaborateurs qui ont montré

chez l'abeille que les nAChR sensibles à l' α -Bgt sont impliqués dans la mémoire à long terme alors que ceux insensibles à l' α -Bgt mais bloqués par la mécamylamine le sont dans la mémoire à moyen terme (Dacher *et al.*, 2005 ; Gauthier *et al.*, 2006).

Enfin, certaines structures nerveuses chez l'insecte expriment des nAChR au niveau pré-synaptique. Il

s'agit, par exemple, du motoneurone FETi (pour « *Fast Extensor Tibia* ») à la jonction neuromusculaire du criquet *Locusta migratoria* et des neurones de type LFSHN (pour « *Lateral Filiform Sensory Hair Neuron* ») des juvéniles de la blatte *Periplaneta americana*. Ces nAChR dont le rôle physiologique n'a jamais été déterminé de façon précise, seraient impliqués dans la modulation de la libération d'ACh.

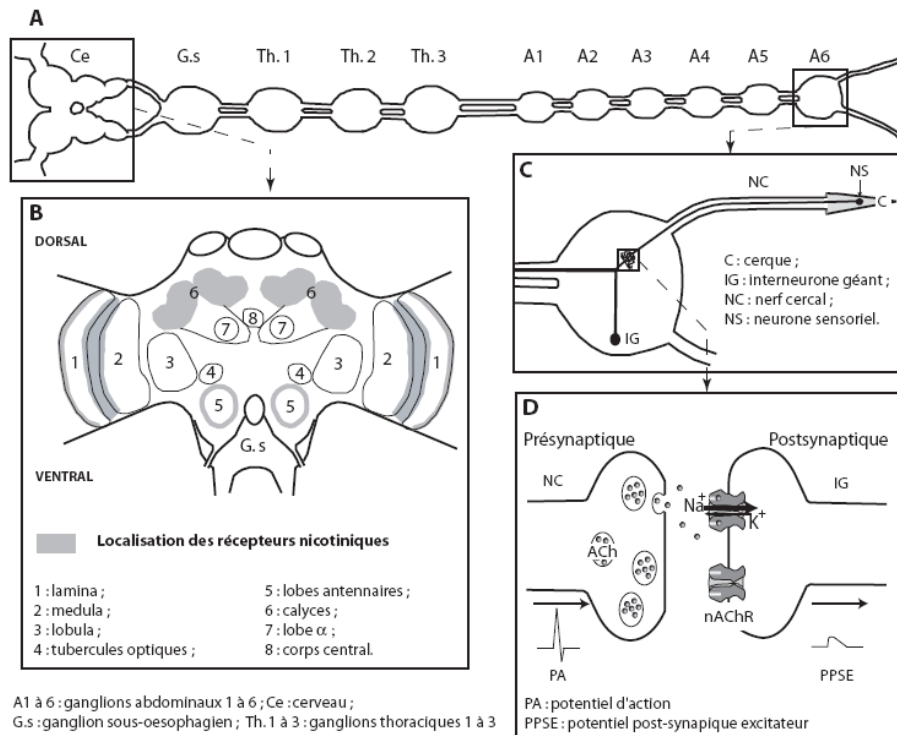


Fig. 2. Localisation des nAChRs dans le SNC des insectes. Le système cholinergique nicotinique est un système excitateur impliqué dans la communication neuronale chez les insectes. Il est présent au niveau du cerveau et de la chaîne nerveuse ventrale (A, C). Dans le cerveau, les nAChR ont été localisés dans différentes parties spécifiques. Dans le cas de l'abeille, ils se situent dans les couches externes de la lamina, entre la lamina et la medulla, dans la couche externe de la medulla, en périphérie des lobes antennaires et dans les corps pédonculés (B). Chez la blatte, ils sont également présents au niveau du dernier ganglion abdominal de la chaîne nerveuse (C). Dans ce ganglion, il existe une connexion synaptique entre les neurones sensoriels des cerques et les interneurons géants qui permettent le cheminement du message nerveux (C). Dans ce cas, les nAChR sont impliqués dans la transmission synaptique rapide. La libération d'ACh par le neurone sensoriel active les nAChR post-synaptiques de l'interneurone géant. Une fois activés, ceux-ci génèrent une dépolarisation de la membrane, i.e. un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE), permettant la transmission du message nerveux (D).

Fig. 2. Nicotinic receptors localization in the insect central nervous system. The nicotinic cholinergic system is involved in the neuronal communication of insects. They are mainly localized in both brain and ganglia of the ventral nerve cord (A, C). In the brain, nAChRs are localized in various specific parts. In the case of the bee brain, nAChRs are situated in external layers of the lamina, in layers between the lamina and the medulla, in external layer of the medulla, in periphery of antennal lobes and in mushroom bodies (B). In the cockroach central nervous system, nAChRs are also present in the terminal abdominal ganglion of the ventral nerve cord (C). In this ganglion, they are involved in fast synaptic transmission between hair sensory neurons and giant interneurons (C). The release of ACh from the pre-synaptic endings activates post-synaptic nAChRs of giant interneurons, which thereby produces an excitatory post-synaptic potential (EPSP) (D).

Les récepteurs nicotiniques neuronaux extra-synaptiques

Les nAChR sont impliqués à la fois dans la transmission synaptique rapide (nAChR synaptiques) et dans la régulation de l'activité électrique somatique (nAChR extra-synaptiques). En effet, des études électropharmacologiques ont montré que les corps cellulaires de différents neurones d'insectes (pourtant dépourvus de contacts synaptiques) expriment des nAChR. Parmi ces corps cellulaires, les motoneurons (comme, par exemple, les motoneurons Df pour *fast Depressor*), les inter-neurons géants et les cellules neurosécrétrices octopaminergiques identifiées comme les neurones DUM (pour *Dorsal Unpaired Median*), sont maintenant connus

pour exprimer des nAChR présentant des profils pharmacologiques distincts, résistants ou sensibles à l' α -Bgt et/ou à la kappa-bungarotoxine (κ -Bgt) (Benson, 1992 ; David et Pitman, 1993 ; Tribut *et al.*, 1994 ; Courjaret et Lapied, 2001). D'autres corps cellulaires, comme ceux des cellules de Kenyon localisés au niveau des corps pédonculés de l'abeille adulte (Goldberg *et al.*, 1999 ; Deglise *et al.*, 2002 ; Wüstenberg et Grünwald, 2004) ou au niveau de leurs lobes antennaires (Barbara *et al.*, 2008), expriment également des nAChR (Figure 2B). Dans le cas des corps cellulaires excitateurs comme les cellules neurosécrétrices, certains nAChR pourraient être impliqués dans la mobilisation et la maturation des produits de neurosécrétion via une modulation de

l'activité électrique somatique. La fonction des nAChR, dans le cas des neurones non excitables, est par contre souvent ambiguë. Cependant, dans certains cas (e.g. les neurones du papillon de nuit *Manduca sexta*), l'activation des nAChR permet l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Le couplage de ces nAChR à la production du GMPcyclique, via le calcium intracellulaire, met en évidence un nouveau rôle physiologique de ces récepteurs dans le contrôle de l'activation de certaines voies de signalisation intracellulaire, telles que la production de monoxyde d'azote, ou de celle de systèmes enzymatiques (guanylate cyclase, adénylate cyclase...) impliqués dans la production de seconds messagers (GMPcyclique, AMPcyclique, IP3/diacétyl-glycérol).

De plus, grâce à l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes nicotiniques spécifiques dont les toxines, il a été possible de révéler qu'un seul et même neurone peut exprimer plusieurs sous-types de nAChR bien différenciés par des profils électropharmacologiques et des mécanismes de régulations intracellulaires spécifiques (Courjaret et Lapied, 2001 ; Courjaret *et al.*, 2003 ; Thany *et al.*, 2007). C'est le cas, en particulier, des neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana*, situés sur la ligne médio-dorsale du dernier ganglion abdominal de la chaîne nerveuse. Ces cellules neurosécrétrices expriment deux types de nAChR (nAChR1 et nAChR2) qui sont insensibles à l' α -Bgt. L'utilisation d'une toxine isolée du venin du cône *Conus imperialis*, l' α -conotoxine Iml (α -Iml), a permis de mieux discriminer ces deux types de nAChR puisque nAChR1 est insensible à l' α -Iml alors que nAChR2 est inhibé par cette toxine (Courjaret et Lapied, 2001).

Enfin, certains corps cellulaires des neurones d'insectes (Dictyoptères, Orthoptères), comme les motoneurones et les neurones DUM, présentent un type particulier de nAChR, sensibles à l' α -Bgt et appelés « mixte » du fait qu'ils sont sensibles à la fois aux agonistes et antagonistes de types nicotiniques et muscariniques (Lapied *et al.*, 1990 ; Benson, 1992 ; David et Pitman, 1993). L'activation de ces récepteurs sensibles à l' α -Bgt et perméables au calcium (Grolleau *et al.*, 1996), interviendrait dans (i) le contrôle des processus de neurosécrétion et (ii) l'homéostasie calcique des neurones.

Diversité moléculaire des sous-unités de récepteurs nicotiniques neuronaux d'insectes

Identification et caractérisation des différentes sous-unités des nAChR d'insectes

Il faut souligner que si l'utilisation de toxines comme l' α -Bgt, le κ -Bgt ou l' α -Iml permet de déterminer l'existence de différents sous-types de nAChR neuronaux, l'identification de la composition en sous-unités des nAChR d'insectes reste difficile. Dans la continuité des travaux réalisés sur les récepteurs nicotiniques neuronaux des Vertébrés, des études de clonage ont permis d'identifier la première sous-unité α d'insecte, sur la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster*, appelée ARD ou AChR64B (Hermans-Borgmeyer *et al.*, 1986 ; Sawruk *et al.*, 1986), suivie de plusieurs autres (pour une revue, voir Thany *et al.*, 2007). Actuellement, plus d'une soixantaine de sous-unités sont identifiées et clonées chez le papillon de nuit *Manduca sexta* (Eastham *et al.*, 1998), le criquet pèlerin *Locusta migratoria* (Hermesen *et al.*, 1998), le puceron vert du pêcher *Myzus persicae* (Sgard *et al.*, 1998 ; Huang *et al.*, 1999), l'abeille *Apis mellifera* (Thany *et al.*, 2003, 2005 ; Jones *et al.*, 2006), le moustique *Anopheles gambiae* (Jones *et al.*, 2005), le ver de la farine *Tribolium castaneum* (Jones et Sattelle, 2007) et le ver à soie *Bombyx mori* (Shao *et al.*, 2007).

Il faut également noter le séquençage récent des génomes de *Drosophila melanogaster* (Adams *et al.*, 2000), d'*Apis mellifera* (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006), d'*Anopheles gambiae* (Malaria mosquito *Anopheles Gambiae*, Genome Sequencing Consortium, 2002) et de *Tribolium castaneum* (*Tribolium* Genome Sequencing Consortium, 2008) qui permet d'envisager l'existence d'une dizaine de gènes codant pour ces sous-unités chez chaque insecte. Cependant, aucune étude n'a permis à ce jour de déterminer la composition en sous-unités d'un récepteur nicotinique d'insecte. Les travaux les plus pertinents utilisent soit des récepteurs hétéromériques co-exprimant des sous-unités α d'insectes avec des sous-unités β de Vertébrés (Landsell et Millar, 2000 ; Liu *et al.*, 2005, 2008 ; Raymond-Delpech *et al.*, 2003), soit des récepteurs chimères (Landsell et Millar, 2004). Dans ce dernier cas et pour la première fois, il a été possible de construire un récepteur fonctionnel à partir uniquement de sous-unités d'insectes et de montrer qu'un récepteur hétéromérique sensible à l' α -Bgt pouvait être envisagé (Landsell et Millar, 2004), contrairement à l'idée préconçue selon laquelle les nAChR sensibles à cette toxine seraient homomériques. Ces résultats suggèrent une complexité dans la composition en sous-unités et également dans l'affinité des nAChR d'insectes pour la plupart des ligands et les toxines en particulier (Chamaon *et al.*, 2000, 2002 ; Landsell et Millar, 2002).

Sites de liaison fonctionnels

Les acides aminés impliqués dans l'interaction entre le récepteur et le ligand, au niveau des nAChR des Vertébrés, ont été largement décrits pour certaines α -conotoxines ainsi que pour l' α -Bgt et l' α -cobratoxine (α -CBX) (Dutertre et Lewis, 2004 ; Tsetlin et Hucho, 2004). Les résidus d'acide aspartique en position 5 (D5), de proline en position 6 (P6) et d'arginine en position 7 (R7) de l' α -Iml, par exemple, forment des interactions de type « Van der Waals » avec la tyrosine en position 193 (Y193) et le tryptophane en position 147 (W147) situés dans les feuillets β au-dessus de la boucle C du récepteur homomérique $\alpha 7$ (Figure 3) (Terlau et Olivera, 2004). Par contre, pour l' α -Bgt et l' α -CBX, le résidu Y193 associé à la phénylalanine en position 185 (F185) et à la tyrosine en position 186 (Y186) est également nécessaire à la fixation de ces deux toxines sur le récepteur $\alpha 7$ (Tsetlin et Hucho, 2004). Par ailleurs, il semble que de faibles variations de séquences, entre les toxines d'un même animal, modifient le sous-type de nAChR ciblé. Ainsi, selon la nature de l'acide aminé en position 10 des α -conotoxines PnIA (α -PnIA) et PnIB (α -PnIB), la liaison du ligand au récepteur s'effectue soit avec l'acide aminé Y193 du récepteur $\alpha 7$ (c'est le cas de l' α -PnIB), soit avec la proline en position 180 (P180) de la sous-unité $\alpha 3$ du récepteur $\alpha 3\beta 2$ (c'est le cas de l' α -PnIA) (Dutertre et Lewis, 2004). Cependant, l'asparagine en position 11 (N11) de l' α -PnIA qui s'associe à l'isoleucine en position 186 (I186) de la sous-unité $\alpha 3$, semble également jouer un rôle important dans la caractérisation pharmacologique des récepteurs $\alpha 7$ et $\alpha 3\beta 2$ (Dutertre et Lewis, 2004). De même, l' α -PIA, une toxine issue du cône *Conus purpuraceus*, est capable de discriminer les récepteurs hétéromériques $\alpha 3\beta 2$ et $\alpha 6\beta 2$ (Janes, 2005). Ainsi, les variations d'acides aminés au niveau des sites de liaison formés par les différentes sous-unités qui composent chaque sous-type de récepteurs permettent de prédire le type de toxine qui, potentiellement, pourra se lier à un sous-type donné de récepteurs.

Bien que la diversité des sous-unités de nAChR soit très importante chez les insectes, l'homologie de séquences de près de 50% indique une certaine

conservation de motifs spécifiques entre les sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 7$ des Vertébrés et leurs homologues chez les insectes.

Ainsi, les résidus Y186, Y193, W147 et P180 sont fortement conservés sur l' $\alpha 7$ et l' $\alpha 3$ de *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Tribolium castaneum*, *Myzus persicae*, *Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis* et *Heliothis virescens*. Dans la mesure où ces acides aminés sont des signatures d'interaction entre une toxine et une sous-unité donnée, la liaison des toxines aux nAChR d'insectes pourrait permettre d'identifier les sous-unités concernées, lorsque les résidus impliqués sont présents. En effet, sur six acides aminés impliqués dans le site de liaison de l' α -PnIB sur

l' $\alpha 7$ humain, quatre sont conservés, les deux autres étant substitués en un ou plusieurs acides aminés selon l'espèce d'insecte. Par contre, parmi les trois résidus du site de liaison de l' α -PnIA sur la sous-unité $\alpha 3$ humaine, deux sont substitués en K183R (substitution de même nature) et en I186K ou I186E selon les insectes.

Les sites de liaison des toxines de serpents α -BTX et α -CBX, impliquant trois résidus identiques, sont également conservés entre les sous-unités $\alpha 7$ humaines et d'insecte, excepté la phénylalanine en position 185 substituée en un autre acide aminé aromatique, la tyrosine.

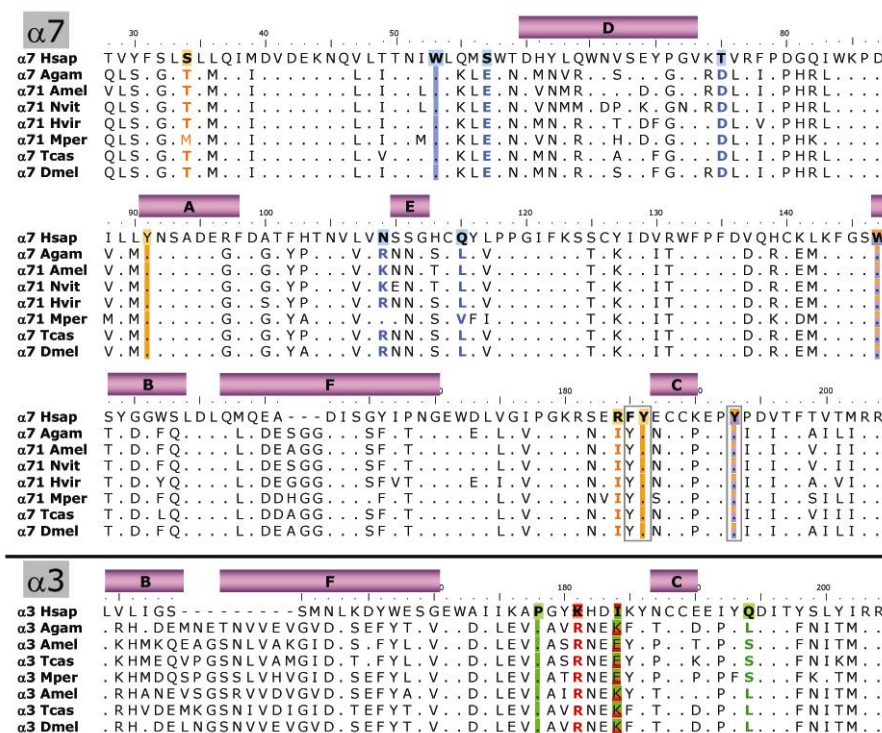


Fig. 3. Alignement des séquences protéiques partielles des domaines extracellulaires des sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 7$ de nAChR humains (**Hsap** : *Homo sapiens*) et de sept espèces d'insectes (**Agam** : *Anopheles gambiae*, **Amel** : *Apis mellifera*, **Nvit** : *Nasonia vitripennis*, **Hvir** : *Heliothis virescens*, **Mper** : *Myzus persicae*, **Tcas** : *Tribolium castaneum*, **Dmel** : *Drosophila melanogaster*). Les rectangles A, B, C, D, E et F indiquent la position des boucles impliquées dans les sites de liaison de l'ACh. Les résidus notés en gras, sur les séquences humaines, correspondent aux sites de liaison de différentes toxines (bleu : α -ImI, orange : α -PnIB, vert : α -PnIA, rouge : α -ImI, encadrés en gris : α -bgt et α -CBX). Certains résidus sont conservés d'une espèce à l'autre pour une toxine donnée, d'autres sont substitués, en un unique ou en plusieurs acides aminés, chez les insectes.

Fig. 3. Partial amino-acid sequence alignment of extra-cellular domains of nAChRs $\alpha 3$ and $\alpha 7$ subunits from human (**Hsap** : *Homo sapiens*) and seven insect species (**Agam** : *Anopheles gambiae*, **Amel** : *Apis mellifera*, **Nvit** : *Nasonia vitripennis*, **Hvir** : *Heliothis virescens*, **Mper** : *Myzus persicae*, **Tcas** : *Tribolium castaneum*, **Dmel** : *Drosophila melanogaster*). A, B, C, D, E and F boxes underline the loops position involved in ACh binding site. Bold residues on human sequences correspond to various toxins binding sites (blue : α -ImI, orange : α -PnIB, green : α -PnIA, red : α -ImI, grey boxes : α -bgt and α -CBX). Some residues are well-conserved between species, while others are substituted for unique or several amino-acids in insects.

Perspectives

Comme dans le cas des Vertébrés, il est maintenant évident que le SNC des insectes exprime une grande diversité de nAChR qui se caractérisent par leurs propriétés biophysiques et leurs profils électrophysiologiques et pharmacologiques. Ces différents types de nAChR synaptiques et/ou extra-synaptiques, en fonction de leurs localisations tissulaires, ont également des rôles physiologiques spécifiques. Les nAChR d'insectes présentent en plus un intérêt particulier du point de vue phytosanitaire. En effet, ils sont connus pour être les cibles moléculaires d'une

famille d'insecticides correspondant aux néonicotinoïdes (Tomizawa et Casida, 2003). Il apparaît donc clairement que l'identification des sous-unités composant les nAChR fonctionnels d'insectes est nécessaire à l'établissement de molécules insecticides spécifiques. C'est la raison pour laquelle l'utilisation de toxines, en complément d'autres agents pharma-cologiques, peut nous permettre d'élucider, en partie, les conformations fonctionnelles des nAChR d'insectes.

Remerciements. Béatrice Bodereau est financée, pour sa thèse de Doctorat, par un contrat de recherche de la Région Pays de la Loire.

Références bibliographiques

- Adams M.D. *et al.* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-95.
- Barbara G.S., Grunewald B., Paute S., Gauthier M., Raymond-Delpech V. (2008) Study of nicotinic acetylcholine receptors on cultured antennal lobe neurones from adult honeybee brains. *Invert. Neurosci.* 8:19-29.
- Benson J.A. (1992) Electrophysiological pharmacology of the nicotinic and muscarinic cholinergic responses of isolated neuronal somata from locust thoracic ganglia. *J. exp. Biol.* 170:203-33.
- Chamaon K., Schulz R., Smalla K.H., Seidel B., Gundelfinger E.D. (2000) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors of *Drosophila melanogaster*: the alpha-subunit $\alpha 3$ and the beta-type subunit ARD co-assemble within the same receptor complex. *FEBS Lett.* 482:189-92.
- Chamaon K., Smalla K.H., Thomas U., Gundelfinger E.D. (2002) Nicotinic acetylcholine receptors of *Drosophila*: three subunits encoded by genomically linked genes can co-assemble into the same receptor complex. *J. Neurochem.* 80:149-57.
- Changeux J.P. (1990) The TiPS lecture. The nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 11:485-92.
- Changeux J.P., Kasai M., Huchet M., Meunier J.C. (1970) Extraction a partir du tissu électrique de gymnote d'une protéine présentant plusieurs propriétés caractéristiques du récepteur physiologique de l'acétylcholine. *CR Acad. Sci. (Paris)* 370D:2864-7.
- Courjaret R., Lapied B. (2001) Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Mol. Pharmacol.* 60:80-91.
- Courjaret R., Grolleau F., Lapied B. (2003) Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an alpha-bungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Eur. J. Neurosci.* 17:2023-34.
- Dacher M., Lagarrigue A., Gauthier M. (2005) Antennal tactile learning in the honeybee: effect of nicotinic antagonists on memory dynamics. *Neuroscience* 130:37-50.
- David J.A., Pitman R.M. (1993) The pharmacology of alpha-bungarotoxin-resistant acetylcholine receptors on an identified cockroach motoneurone. *J. Comp. Physiol A*, 172:359-68.
- Deglise P., Grunewald B., Gauthier M. (2002) The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neurosci. Lett.* 321:13-6.
- Dutertre S., Lewis R.J. (2004) Computational approaches to understand alpha-conotoxin interactions at neuronal nicotinic receptors. *Eur. J. Biochem.* 271:2327-34.
- Eastham H.M., Lind R.J., Eastlake J.L., Clarke B.S., Towner P., Reynolds S.E., Wolstenholme A.J., Wonnacott S. (1998) Characterization of a nicotinic acetylcholine receptor from the insect *Manduca sexta*. *Eur. J. Neurosci.* 10:879-89.
- Gauthier M., Dacher M., Thany S.H., Niggebrugge C., Deglise P., Kljucic P., Armengaud C., Grunewald B. (2006) Involvement of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*). *Neurobiol. Learn. Mem.* 86:164-74.
- Goldberg F., Grunewald B., Rosenboom H., Menzel R. (1999) Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kenyon cells from the mushroom bodies of the honey bee *Apis mellifera*. *J. Physiol.* 514:759-68.
- Grolleau F., Lapied B., Buckingham S.D., Mason W.T., Sattelle D.B. (1996) Nicotine increases $[Ca^{2+}]_i$ and regulates electrical activity in insect neurosecretory cells (DUM neurons) via an acetylcholine receptor with 'mixed' nicotinic-muscarinic pharmacology. *Neurosci. Lett.* 220:142-6.
- Gu H., O'Dowd D.K. (2006) Cholinergic synaptic transmission in adult *Drosophila* Kenyon cells *in situ*. *J. Neurosci.* 26:265-72.
- Hermans-Borgmeyer I., Zopf D., Ryseck R.P., Hovemann B., Betz H., Gundelfinger E.D. (1986) Primary structure of a developmentally regulated nicotinic acetylcholine receptor protein from *Drosophila*. *Embo J.* 5:1503-8.
- Hermesen B., Stetzer E., Thees R., Heiermann R., Schrattenholz A., Ebbinghaus U., Kretschmer A., Methfessel C., Reinhardt S., Maelicke A. (1998) Neuronal nicotinic receptors in the locust *Locusta migratoria*. Cloning and expression. *J. Biol. Chem.* 273:18394-404.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium: Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera* (2006). *Nature* 443:931-49.
- Huang Y., Williamson M.S., Devonshire A.L., Windass J.D., Lansdell S.J., Millar N.S. (1999) Molecular characterization and imidacloprid selectivity of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *J. Neurochem.* 73:380-9.
- Hue B., Callec J.J. (1990) Electrophysiology and pharmacology of synaptic transmission in the central nervous system of the cockroach. In: Huber I., Masler E.P., Asidi A., Rao B.R., editors. *Cockroaches as models for neurobiology: application in biomedical research*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.; p.149-68.
- Janes R.W. (2005) Alpha-Conotoxins as selective probes for nicotinic acetylcholine receptor subclasses. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:280-92.
- Jones A.K., Grauso M., Sattelle D.B. (2005) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics* 85:176-87.
- Jones A.K., Raymond-Delpech V., Thany S.H., Gauthier M., Sattelle D.B. (2006) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res.* 16:1422-30.
- Jones A.K., Sattelle D.B. (2007) The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics* 8:327.
- Karlin A. (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 3:102-14.
- Lapied B., Le Corrionc H., Hue B. (1990) Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells. *Brain Res.* 533:132-6.
- Lansdell S.J., Millar N.S. (2000) The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, alpha-bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity. *Neuropharmacology* 39:671-9.
- Lansdell S.J., Millar N.S. (2002) Dbeta3, an atypical nicotinic acetylcholine receptor subunit from *Drosophila*: molecular cloning, heterologous expression and coassembly. *J. Neurochem.* 80:1009-18.
- Lansdell S.J., Millar N.S. (2004) Molecular characterization of Dalpha6 and Dalpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunits from *Drosophila*: formation of a high-affinity alpha-bungarotoxin binding site revealed by expression of subunit chimeras. *J. Neurochem.* 90:479-89.
- Le Novère N., Corringier P.J., Changeux J.P. (1999) Improved secondary structure predictions for a nicotinic receptor subunit: incorporation of solvent accessibility and experimental data into a two-dimensional representation. *Biophys. J.* 76:2329-45.
- Lee C.Y., Chang C. (1966) Modes of actions of purified toxins from elapid venoms on neuromuscular transmission. *Mem. Inst. Butantan Sao Paulo* 33:555-72.
- Liu Z., Williamson M.S., Lansdell S.J., Denholm I., Han Z., Millar N.S. (2005) A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:8420-5.
- Liu Z., Han Z., Liu S., Zhang Y., Song F., Yao X., Gu J. (2008) Amino acids outside of the loops that define the agonist binding site are important for ligand binding to insect nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.* 106:224-30.
- Malaria mosquito, *Anopheles Gambiae*, Genome Sequencing Consortium (2002). *Science* 298:129-49.
- Mordvintsev D.Y., Polyak Y.L., Levstova O.V., Tourleigh Y.V., Kasheverov I.E., Shaitan K.V., Utkin Y.N., Tsetlin V.I. (2005) A model for short alpha-neurotoxin bound to nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*: comparison with long-chain alpha-neurotoxins and alpha-conotoxins. *Comput. Biol. Chem.* 29:398-411.

- Oleskevich S. (1999) Cholinergic synaptic transmission in insect mushroom bodies *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 82:1091-6.
- Raymond Delpech V., Ihara M., Coddou C., Matsuda K., Sattelle D.B. (2003) Action of nereistoxin on recombinant neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Invert. Neurosci.* 5:29-35.
- Sawruk E., Hermans-Borgmeyer I., Betz H., Gundelfinger E.D. (1988) Characterization of an invertebrate nicotinic acetylcholine receptor gene: the *ard* gene of *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.* 235:40-6.
- Sgard F., Fraser S.P., Katkowska M.J., Djamgoz M.B., Dunbar S.J., Windass J.D. (1998) Cloning and functional characterisation of two novel nicotinic acetylcholine receptor alpha subunits from the insect pest *Myzus persicae*. *J. Neurochem.* 71:903-12.
- Shao Y.M., Dong K., Zhang C.X. (2007) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 8:324.
- Su H., O'Dowd D.K. (2003) Fast synaptic currents in *Drosophila* mushroom body Kenyon cells are mediated by α -bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors and picrotoxin-sensitive GABA receptors. *J. Neurosci.* 23:9246-53.
- Terlau H., Olivera B.M. (2004) *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.* 84:41-68.
- Thany S.H., Lenaers G., Crozatier M., Armengaud C., Gauthier M. (2003) Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor alpha3 mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* 12:255-62.
- Thany S.H., Crozatier M., Raymond-Delpech V., Gauthier M., Lenaers G. (2005) Apisalpha2, Apisalpha7-1 and Apisalpha7-2: three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits in the honeybee brain. *Gene* 344:125-32.
- Thany S.H., Lenaers G., Raymond-Delpech V., Sattelle D.B., Lapied B. (2007) Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 28:14-22.
- Tomizawa M., Casida J.E. (2003) Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48:339-64.
- Tribolium* Genome Sequencing Consortium (2008) The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452:949-55.
- Tribut F., Duval A., Lapied B. (1994) Two distinct receptors are activated by arecoline on cockroach sixth abdominal ganglion DUM neurones. *J. exp. Biol.* 186:325-31.
- Trimmer B.A., Weeks J.C. (1989). Effects of nicotinic and muscarinic agents on an identified motoneurone and its direct afferent inputs in larval *Manduca sexta*. *J. exp. Biol.* 144:303-37.
- Tsetlin V.I., Hucho F. (2004) Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Lett.* 557:9-13.
- Wustenberg D.G., Grunewald B. (2004) Pharmacology of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor of cultured Kenyon cells of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp. Physiol. A Neuroethol Sens. Neural Behav. Physiol.* 190:807-21.
-

Neuronal cholinergic toxins : possible drugs for lung cancer treatment

Patrizia RUSSO^{1*}, Laura PALEARI¹, Alessia CATASSI¹, Carole FRUCHART-GAILLARD², Gilles MOURIER², Denis SERVENT²

¹ Lung Cancer Unit, National Cancer Research Institute, Genoa, Italy ; ² CEA, iBiTecS, Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO), 91191 Gif sur Yvette, France.

* Corresponding author ; Tel : +390105737255 ; Fax : +390105737271 ; E-mail : patrizia.russo@istge.it

Abstract

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) are expressed on bronchial epithelial and Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC) cells and are involved in cell growth regulation. Nicotine (a classical nAChR agonist) induced cell proliferation, whereas nAChR antagonists, i.e. d-tubocurarine or α -cobratoxin (α -CbT), induced cell death. In the present study, we further explored the anti-tumour potential mechanisms and activities of α -CbT. NOD/SCID mice were grafted orthotopically and treated with α -CbT. α -CbT treatment (0.12 mg/kg) induced a strong reduction in tumour size (~90%) in comparison with mice treated with the vehicle alone. Tumour inhibition was related to severe induction of apoptosis. Moreover, neo-angiogenesis was strongly inhibited [reduction of cells positive to VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and CD31]. Also, these cells were unable to grow in soft-agar and develop tumour, when re-injected into mice. The small interfering RNA-mediated silencing of the $\alpha 7$ -nAChR gene confirmed that α -CbT specifically inhibited the $\alpha 7$ -nAChR-mediated survival pathway in A549 cells. Furthermore the specificity of α -CbT is reinforced by the lack of effect of short chain toxin (erabutoxin-a). Once more, the no effect of the low affinity R33E modified α -CbT strengthened the specificity of this inhibition. Although $\alpha 7$ -nAChR antagonists such as α -CbT are unlikely to be a primary therapy, it may provide lead compounds for the design of clinically useful drugs.

Les toxines cholinergiques comme médicament potentiel du cancer du poumon

Les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR) sont exprimés dans les cellules épithéliales bronchiques ainsi que dans les cellules pulmonaires cancéreuses non à petites cellules (NSCLC) où ils régulent la croissance cellulaire. La nicotine (agoniste des nAChR) induit la prolifération cellulaire alors que des antagonistes comme la d-tubocurarine ou l' α -cobratoxine (α -CbT) provoquent la mort cellulaire. Dans cette étude, nous explorons les propriétés anti-tumorales potentielles de l' α -CbT et son mécanisme d'action. L'effet de l' α -CbT est examiné sur des souris NOD/SCID ayant subi une greffe orthotopique. L' α -CbT à 0,12 mg/kg induit une forte réduction de la taille de la tumeur (~90%) due à l'induction de mécanismes apoptotiques. De plus, la néo-angiogenèse est fortement réduite. Ces cellules traitées sont incapables de se multiplier et de provoquer l'apparition de nouvelles tumeurs chez des souris transplantées. L'action de l' α -CbT est médiée par son interaction avec le récepteur nicotinique $\alpha 7$, comme le montrent des expériences d'interférence par l'ARN ou la spécificité de l'action de cette toxine par rapport à une toxine courte de type érabutoxine ne reconnaissant pas ce sous-type de récepteur. Bien que des antagonistes du récepteur $\alpha 7$ comme l' α -CbT ne soient vraisemblablement pas appelés à être utilisés en thérapeutique, ils peuvent servir de modèle pour la conception de nouvelles molécules utiles dans le traitement de ces pathologies.

Keywords : Lung cancer, nicotinic receptor, α -cobratoxin.

Introduction

It has been established that acetylcholine (ACh) is widely synthesized by a variety of non-neuronal cell types ; including airway epithelial cells (Reinheimer et al., 1996 ; Zia et al., 1997 ; Maus et al., 1998 ; Sekhon et al., 1999 ; Wang et al., 2001 ; Wessler and Kirkpatrick, 2001 ; Song et al., 2003 ; West et al., 2003 ; Proskocil et al., 2004 ; Racke and Matthiesen, 2004 ; Martinez-Moreno et al., 2006). The primary functions of non-neuronal ACh might involve it in cell-to-cell communication mediated by intracellular ion dynamics, linked to the regulation of a number of events

such as cell motility, responses to the cellular environment, and apoptosis (Racke and Matthiesen, 2004 ; Trombino et al., 2004 ; Russo et al., 2006 ; Egleton et al., 2008 ; Paleari et al., 2008 ; Song and Spindel, 2008). Moreover, the discovery of functional acetylcholine receptors (AChR) on lung epithelial cells and lung tumours raises the question of whether exposure to nicotine could also participate in lung cancer pathogenesis by activating signal transduction pathways such as the Akt pathway and/or overcome apoptotic responses engendered by carcinogen exposure (Trombino et al., 2004 ; Russo et al., 2006 ; Egleton et al., 2008 ; Paleari et al., 2008 ; Song and

Spindel, 2008). Our laboratory observations that mesothelioma and NSCLC cells express functionally nicotinic ACh receptors (nAChR) led to our previous reports that NSCLC (*Non Small Cell Lung Cancer*) and mesothelioma cells' growth is under the control of cholinergic system. Its agonist (ACh or nicotine) has a proliferative effect whereas antagonists [d-tubocurarine (d-TB) or snake's long neurotoxin] have an inhibitory effect (Cesario *et al.*, 2004 ; Trombino *et al.*, 2004 ; Grozio *et al.*, 2007 ; Catassi *et al.*, 2008 ; Paleari *et al.*, 2008).

The α -neurotoxins (NT) are potent antagonists that block nAChR and hence affect synaptic transmission (Russo *et al.*, 2006). The animal venom toxins antagonists of AChR [*i.e.* bungarotoxin (BTX) from the *Bungarus multicinctus* snake and conotoxins purified from the venom of *Conus* marine snails] have previously been used as molecular tools for the characterization of neuronal nAChR in SCLC, NSCLC and mesothelioma cells or for inhibiting nicotine-action. Recently, we have shown that the α -NT α -cobratoxin, from *Naja kaouthia* snake, at LD₁₀ concentration (0.12 mg/kg) displayed impressive anti-tumour effects against well-established A549 NSCLC orthotopic xenografts (Grozio *et al.*, 2007). Toxicology studies, including histopathology, clinical chemistry, effects on clinical chemistry parameters and on behavioural functionality, indicated the relative safety of this agent at doses that are therapeutically effective in mice (Grozio *et al.*, 2007 ; Catassi *et al.*, 2008). Remarkably, in our previous studies, we have shown that normal human proliferating T lymphocytes and unaffected bronchial or mesothelial cells are spared by α -CbT treatment (Grozio *et al.*, 2007 ; Catassi *et al.*, 2008).

In the present study we further explored the potential anti-tumour mechanisms and activities of α -cobratoxin. Although we obtained significative reduction of A549 tumours size when it was still well implanted (Grozio *et al.*, 2007), we can anticipate that treatment of an established, large, and disseminated tumour would unlikely be effective and that rational therapy with agents inhibiting receptors-activities would be most effective when applied early.

Materials and Methods

Cell culture and drugs

Human NSCLC cell line A549 (lung adenocarcinoma) was obtained by our Institutional Cell Repository (Genoa, Italy). Before to be utilized in the experiments A549 cells were analyzed by fingerprinting using 8 different and highly polymorphic STR loci (Powerplex 1.2) by DSMZ (the German National Resource Centre for Biological Material Braunschweig GERMANY). The analysis of the DNA pattern revealed that this cell line is genetically identical to the cell line A549 deposited in the DSMZ (ACC 107). Cells were grown in RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented with 10% non-heat inactivated foetal bovine serum (Gibco BRL, Grand Island, NY). Cell counts were determined using a Coulter Counter with Channelyzer attachment to monitor cell size (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Cell membranes integrity was determined by Trypan blue dye exclusion assay. α -CbT was obtained from *Naja kaouthia* venom and 95% purified by HPLC. The lyophilized powder is resuspended in PBS buffer + 0.1% BSA in order to reach the appropriate concentrations. The powder is stable several months when stored at -20°C and the dilution solutions several weeks at 4°C.

In vivo orthotopic grafting

In vivo orthotopic grafting of human NSCLC cell line A549 was performed as described (Grozio *et al.*, 2007).

In situ TUNEL assay

In situ TUNEL assay was performed as recommended by manufactures.

Transfection of human A549 cells and evaluation of cytotoxicity

siRNA- $\alpha 7$ was designed and custom synthesized by OriGene Technologies (Rockville, MD, USA). The target sequences for the human $\alpha 7$ -nAChR mRNA (NM_000746) gene was 5'-GGACAGAUCAUUAUUACA-3'. For transfection with siRNA, we followed the standard protocol described in detail elsewhere by Arredondo *et al.* (2005). Briefly, A549 cells were seeded at a density of 5×10^4 cells per well of a 24-well plate and incubated for 16–24 h to achieve ~70% confluence. To each well, increasing concentrations of siRNA duplex in the transfection solution with the TransIT-TKO transfection reagent (Mirus, Madison, WI, USA) were added, and the transfection was continued for 16h at 37°C in a humid, 5% CO₂ incubator. On the next day, the transfection medium was replaced by RPMI 1640 and the cells were incubated for 72h to achieve maximum inhibition of the receptor protein expression, as experimentally determined by Western blot at different time points after transfection. The clone that did not express $\alpha 7$ -nAChR protein was used in MTS experiments (cytotoxicity). The MTS assay was performed as described (Trombino *et al.*, 2004). Cells were exposed to different concentrations of α -CbT for 72 h (continuous treatment).

Cell Proliferation Assays

NSCLC cells in primary culture were obtained by enzymatic digestion of freshly human surgical biopsies, as described (Trombino *et al.*, 2004). Cell proliferation in semisolid medium was performed as described (Trombino *et al.*, 2004). Apoptosis was detected using Hoechst 33342 and DAPI staining.

Results

Anti-tumour activity in orthotopically grafted mouse model

To determine whether α -CbT inhibits tumour growth, A549 cells were grafted orthotopically in *NOD/SCID* mice. Mice received three treatment a week (every 48h) for two months of 0.12 mg/kg α -CbT administered i.v., starting 48 h after orthotopically cell implantation ; one day was allowed to recover mice from surgery. We already shown that these schedules of treatment are not toxic and well tolerated (Catassi *et al.*, 2008).

The tumour masses remain confined to the chest, no metastases were observed outside the chest cavity, as detected by macroscopic and microscopic findings (Figure 1). The median weight of tumour masses was 2216.0 mg [25% percentile = 1375.0 mg ; 75% percentile = 3033.0]. Tumour growth inhibition was evident in mice treated with α -CbT 0.12 mg/kg, thus the median weight of tumour masses was 18.0 mg [25% percentile = 11.6 mg ; 75% percentile = 56]. As a result α -CbT, at 0.12 mg/kg, induced a ~99% reduction in tumour size in comparison with mice treated with the vehicle alone (Figure 1).

Hematoxylin and eosin (H&E) staining revealed large necrotic area inside the tumours (Figure 2, panel A) and TUNEL assay induction of *in situ* apoptosis (Figure 2, panel A) in tumours obtained by treated animals. In this model the number of cells positive to VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor ; Figure 2, panels A and B) or CD31 (Figure 2, panels A and C) decreased in α -CbT 0.12 mg/kg treated mice.

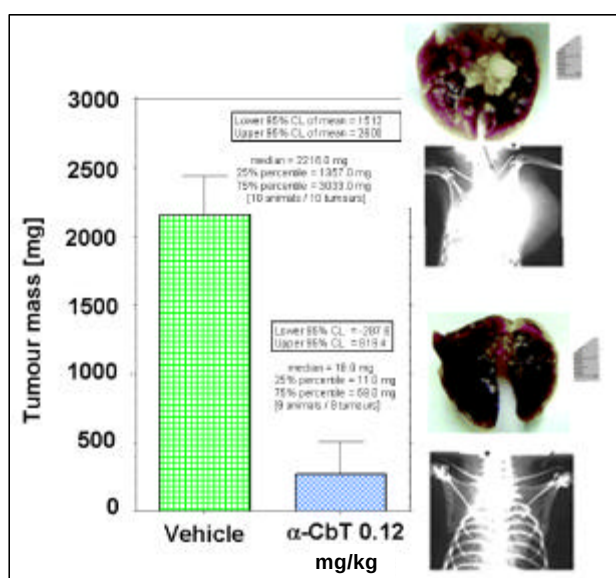


Fig. 1. Inhibition of tumour growth. Representative *NOD/SCID* mice grafted orthotopically with A549 cells. Chest X-rays view of the mice. Arrows, tumour and macroscopic view of single tumour. The effects of α -CbT on tumour growth was reported on graph Columns, mean ; bars, SE, $p < 0.002$ relative to control according to the Student's *t* test (two-tailed), and the non-parametric Mann-Whitney *U* test.

Fig. 1. Inhibition de la croissance tumorale chez des souris greffées après traitement à l' α -CbT visualisée par radiographie pulmonaire et mesure de la masse de la tumeur.

The growth efficiency of cells, recovered after enzymatic digestion of tumours obtained by treated mice, was reduced by 92%. Consequently, when 6 mice were grafted orthotopically with these cells no tumours developed.

Specificity of α -CbT in inhibiting tumour development

In order to check the specificity of this inhibition, we measured the effect on survival in mice orthotopically grafted with A549 cells treated with (1) recombinant- α -CbT (α -CbT) produced in *E. coli*, (2) a mutated α -CbT (CbT-R33E), that has been previously identified for its huge lost of interaction on $\alpha 7$ -receptor as compared to wild-type α -CbT (Antil-Delbeke *et al.*, 2000 ; Michalet *et al.*, 2000 ; Fruchart-Gaillard *et al.*, 2002, 2006). The α -CbT is chemically, functionally and structurally indistinguishable from the venom toxin and is produced with a yield of approximately 1.2 mg/L of culture (Antil-Delbeke *et al.*, 2000 ; Fruchart-Gaillard *et al.*, 2002). The use of α -CbT avoids any problems of conflicting results due to contamination of "purified" drug with residual that can have very similar molecular mass, as in the case of κ -bungarotoxin in "purified" α -bungarotoxin (Sher *et al.*, 2000). Animals treated with α -CbT at 0.12 mg/kg survived longer (median survival

time 120.50 days) than mice treated with the vehicle alone (median survival time 65.50 days ; Figure 3).

This experiment supported the hypothesis that the anti-tumour activity is related specifically to α -CbT and not to some unknown substances present on the purified natural toxin. Notably the median survival time of mice treated with mutated α -CbT was 61.50 days, lesser than in the group received the vehicle alone (Figure 3).

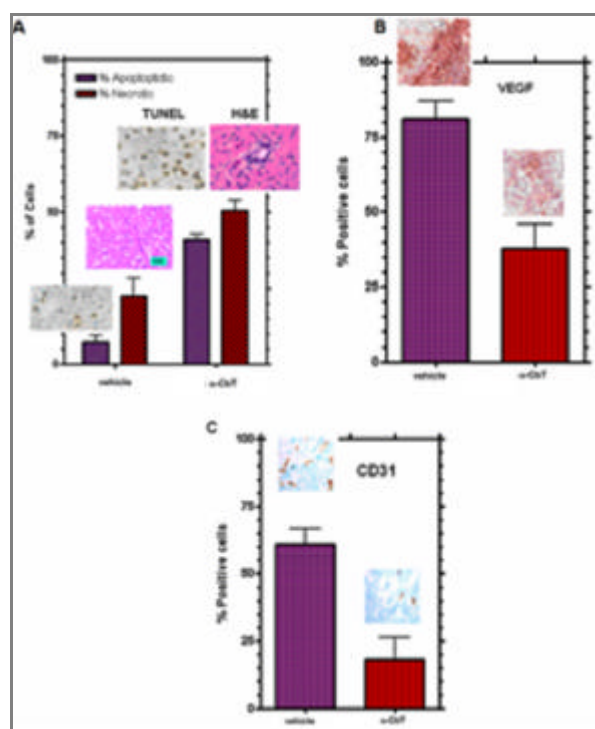


Fig.2. (Panel A) Orthotopic tumours (on the lung) harvested at autopsy were processed for *in situ* induction of apoptosis evaluated by TUNEL assay. Columns, mean ; bars, SE, $p < 0.002$ relative to control according to the Student's *t* test (two-tailed). (Panel B) *In situ* evaluation of VEGF positive cells. Orthotopic tumours (on the lung) harvested at autopsy were processed for immunostaining using anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology) antibodies and appropriate peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG second antibody. The slides were examined in a bright-field microscope. Columns, mean ; bars, SE, $p < 0.002$ relative to control according to the Student's *t* test (two-tailed). (Panel C) *In situ* evaluation of CD31 positive cells. The slides were examined in a bright-field microscope. Columns, mean ; bars, SE, $p < 0.002$ relative to control according to the Student's *t* test (two-tailed). Magnification : x 20 objectives.

Fig. 2. Evaluation in situ des propriétés pro-apoptotiques (A) et d'inhibition du taux de VEGF (B) et de CD31 (C) du traitement à l' α -CbT.

These data strongly support the hypothesis that inhibition of $\alpha 7$ -nAChR by α -CbT induced tumour regression.

Effect of α -CbT on small interfering RNA-mediated silencing of $\alpha 7$ -nAChR in A549 cells

We next determined whether α -CbT-induced cell death occurs exclusively through the $\alpha 7$ -nAChR pathway by taking advantage of siRNA technique. A549 cells were transfected with $\alpha 7$ -nAChR-siRNA. When A549-si-mRNA ($\alpha 7$ -nAChR) were exposed to α -CbT FITC-conjugated no binding was observed under fluorescence microscopy (Figure 4, panel A) in comparison with

parental A549 cells. No expression of $\alpha 7$ -nAChR protein was detected in A549-si-mRNA ($\alpha 7$ -nAChR ; *Figure 4, panel B*). Next, we determined the effect of treatment of different concentrations of α -CbT for 72 h on the growth of A549-silenced cells. As shown in *Figure 4 (panel C)*, treatment of cells with α -CbT did not cause any cell death in A549-silenced cells compared with parental-positive cells where cell death was evident.

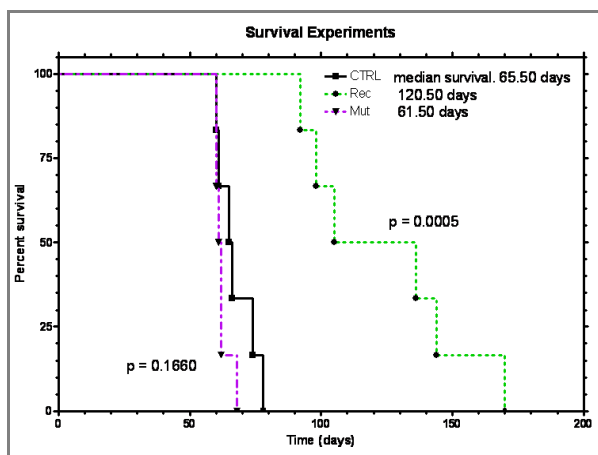


Fig. 3. Median survival time. A549 cells grafted orthotopically *NOD/SCID* in mice were treated with vehicle alone (12 animals), Recombinant- α -CbT (9 animals) or Mutated- α -CbT (6 animals) 0.12 mg/kg. Kaplan-Meier curves showing survival comparison between control and drug-treated mice. The curves indicate a significant difference in survival time for Recombinant- α -CbT treated mice versus vehicle alone treated mice ($p < 0.002$). $p > 0.05$ for Mutated- α -CbT treated mice versus vehicle alone treated mice ($p < 0.002$).

Fig. 3. Durée de vie moyenne des souris greffées en l'absence de traitement ou après traitement avec α -CbT sauvage ou mutée.

To strengthen our argument that α -CbT-induced cell death apoptosis of A549 cells is mediated through $\alpha 7$ -nAChR we next determined the effect of α -CbT on the viability of mongoose cells. Thus, as already reported (Keller *et al.*, 1995), sequences of the α -subunits of the nAChR from mongoose contain several differences in the region between amino acids 183 and 200 ; consequently this species reveals resistance to the snake α -toxins. The MTS assay, performed after 72h of continuous incubation with different concentrations of α -CbT, did not reveal any induction of cytotoxicity on A.P. cells.

In conclusion, all data tend to support the notion that α -CbT affects the growth of A549 cells by interacting specifically with $\alpha 7$ -nAChR.

Discussion

Intense research efforts in translational oncology over the last decade have provided significant insights into the molecular basis of carcinogenesis and biologic behaviour of human cancers. In their synthesis of cancer biology, Hanahan and Weinberg (2000) listed six hallmarks of cancer, namely : (1) self-sufficiency in growth signals ; (2) insensitivity to antigrowth signals ; (2) evading apoptosis ; (3) limitless replicative potential ; (4) sustained angiogenesis and (5) tissue invasion and metastasis. More than 500 molecular targeted therapy products are currently being developed, covering the entire range of those six hallmarks. NSCLC cells demonstrate great molecular heterogeneity in which several pathways are

simultaneously active leading to tumorigenesis. Thus, novel agents targeting specific pathways associated with apoptosis, cell proliferation, angiogenesis and other mechanisms have to be emerged as a separate and unique therapeutic class delivering promising results in NSCLC (Dy and Adjei, 2002 ; Besse *et al.*, 2007). The recent discovery of the correlation between EGFR mutations and response to EGFR TKI therapy in NSCLC has demonstrated that molecular typing of tumours to guide therapy selection for lung cancer is possible (Sun *et al.*, 2007).

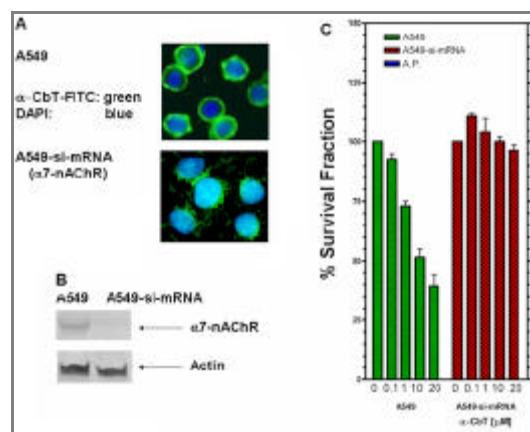


Fig. 4. Specific role of $\alpha 7$ -nAChR. (**Panel A**) Fluorescence microscope image of parental A549 or A549-si-mRNA ($\alpha 7$ -nAChR) transfected cells incubated with α -CbT-FITC. (**Panel B**) Expression of $\alpha 7$ -nAChR protein levels. (**Panel C**) MTS assay. Cells were incubated with different concentrations of α -CbT over 72 h. Data are expressed as a mean $\pm$ SE. The statistical significance was : A549 versus (vs.) A549-si-mRNA ($\alpha 7$ -nAChR) cells $p = 0.0313$ (Student's t test, two tailed) and $p = 0.0317$ (Mann-Whitney non parametric U test, two tailed) ; A549 vs. A.P. cells, $p = 0.0187$ and $p = 0.0159$, respectively ; A549-si-mRNA ($\alpha 7$ -nAChR) vs. A.P. cells $p = 0.3056$ and $p = 0.4206$.

Fig. 4. Implication du sous-type $\alpha 7$ de nAChR dans l'effet du traitement à l' α -CbT. Microscopie de fluorescence (**A**), western-blot (**B**) et taux de prolifération (**C**) des cellules A549 sauvages et traitées avec un RNA interférant anti- $\alpha 7$.

The results of this study showed that α -CbT, a potent high affinity $\alpha 7$ -nAChR inhibitor, induces tumor growth inhibition in a *NOD/SCID* mouse orthotopically transplanted. The prolonged survival of α -CbT-treated animals in our mouse model of NSCLC is most likely the result of multiple mechanisms, including anti-proliferative and anti-angiogenic effects. Thus, reductions in primary tumor size are associated not only with the inhibition $\alpha 7$ -nAChR pathway and induction of apoptosis but also with the lowering of various angiogenic factors such as VEGF and CD31. The small interfering RNA-mediated silencing of the ($\alpha 7$ -nAChR) gene confirmed that α -CbT specifically inhibited the $\alpha 7$ -nAChR-mediated survival pathway in A549 cells. Furthermore, the specificity of α -CbT is reinforced by the lack of effect of short chain toxin (*i.e.* erabutoxin-a). Once more, the no effect of the mutated toxin strengthened the specificity of this inhibition. In earlier study we have shown that : (1) α -CbT impaired the growth of different NSCLC cell lines (SK-MES, NCI-H1650) and of 10 primary cell cultures obtained by biopsies of human NSCLC (2 adenocarcinoma and 8 squamous carcinoma), as well as of mesothelioma cells (Catassi *et al.*, 2008 ; Paleari *et al.*, 2008) ; (2) α -CbT

reduced the *in vivo* growth of A549 cells already well implanted in lung mice (Grozio *et al.*, 2007) ; (3) a short treatment with α -CbT substantially blocked the effects of nicotine induced A549 tumour growth in mice (Paleari *et al.*, 2008) ; (4) α -CbT did not affect the growth of two primary cell cultures of unaffected human bronchoalveolar cells (immuno-histologically assessed) as well as (5) of human proliferating human normal proliferating T lymphocytes (Grozio *et al.*, 2007 ; Catassi *et al.*, 2008) ; (6) α -CbT administration, at therapeutical concentrations, is well tolerated by mice (Grozio *et al.*, 2007 ; Catassi *et al.*, 2008).

All data support the hypothesis that $\alpha 7$ -nAChR play an important role in lung cancer promotion/proliferation and that their inhibition *via* specific high affinity inhibitor, such as in the case of α -CbT, can induce tumor regression.

References

- Antil-Delbeke S., Gaillard C., Tamiya T., Corringier P.J., Changeux J.P., Servent D., Ménez A. (2000) Molecular determinants by which a long chain toxin from snake venom interacts with the neuronal alpha 7-nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 275:29594-601.
- Arredondo J., Chernyavsky A.I., Marubio L. M., Beaudet A.L., Jolkovsky D.L., Pinkerton K.E., Grando S.A. (2005) Receptor-mediated tobacco toxicity: Regulation of gene expression through $\alpha 3 \beta 2$ nicotinic receptor in oral epithelial cells. *Am. J. Pathol.* 166:597-613.
- Besse, B., Ropert, S., Soria J.C. (2007) Targeted therapies in lung cancer. *Ann. Oncol.* 18 Suppl 9:135-142.
- Catassi A., Paleari L., Servent D., *et al.* (2008) Targeting alpha7-nicotinic Receptor for the Treatment of Pleural Mesothelioma. *Eur. J. Cancer* in press.
- Cesario A., Russo, P., Viaggi, S., *et al.* (2004) Malignant pleural mesothelioma: time for translational research. *Lancet Oncol.* 5:591-2.
- Dy G.K., Adjei A.A. (2002) Novel targets for lung cancer therapy. *J Clin Oncol* 20: 2881-94.
- Egleton R.D., Brown K.C., Dasgupta P. (2008) Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. *Trends Pharmacol. Sci.* [Epub ahead of print].
- Fruchart-Gaillard C., Gilquin B., Antil-Delbeke S., Le Novère N., Tamiya T., Corringier P.J., Changeux J.P., Ménez A., Servent D. (2002) Experimentally based model of a complex between a snake toxin and the alpha 7 nicotinic receptor. *Proc. Natl Acad. Sci U.S.A.* 99:3216-21.
- Fruchart-Gaillard C., Mourier G., Marquer C., Ménez A., Servent D (2006). How three-finger-fold toxins interact with various cholinergic receptors. *J. Mol. Neurosci.* 30:7-8.
- Grozio A., Catassi A., Cavalieri Z., Paleari L., Cesario A., Russo P. (2007) Nicotine, lung and cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.* 7:461-66.
- Grozio A., Paleari L., Catassi A., *et al.* (2008) Natural agents targeting the alpha7-nicotinic-receptor in NSCLC: A promising prospective in anti-cancer drug development. *Int. J. Cancer.* 122:1911-5.
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Keller S.H., Kreienkamp H.J., Kawanishi C., Taylor P. (1995) Molecular determinants conferring alpha-toxin resistance in recombinant DNA-derived acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* 270:4165-71.
- Martinez-Moreno P., Nieto-Ceron S., Torres-Lanzas J., *et al.* (2006) Cholinesterase activity of human lung tumours varies according to their histological classification. *Carcinogenesis* 27:429-36.
- Maus A.D., Pereira E.F., Karachunski P.I., *et al.* (1998) Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* 54:779-88.
- Michalet S., Teixeira F., Gilquin B., Mourier G., Servent D., Drevet P., Binder P., Tzartos S., Ménez A., Kessler P. (2000) Relative spatial position of a snake neurotoxin and the reduced disulfide bond alpha (Cys192-Cys193) at the alpha gamma interface of the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 275:25608-15.
- Paleari L., Catassi A., Ciarlo M., *et al.* (2008) Role of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor in human non small cell lung cancer proliferation. *Cell Prol.* in press.
- Paleari L., Grozio A., Cesario A., Russo P. (2008) The Cholinergic System & Cancer. *Sem. Cancer Biol.*, in press.
- Proskocil B.J., Sekhon H.S., Jia Y., *et al.* (2004) Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells. *Endocrinology* 145:2498-506.
- Racke K., Matthiesen S. (2004) The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 17:181-98.
- Reinheimer T., Bernedo P., Klapproth H., *et al.* (1996) Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig, and human: species differences in role of airway mucosa. *Am. J. Physiol.* 270:L722-8.
- Russo P., Catassi A., Cesario A., Servent D. (2006) Development of novel therapeutic strategies for lung cancer: targeting the cholinergic system. *Curr. Med. Chem.* 13:3493-512.
- Sekhon H.S., Jia Y.J., Raab R., *et al.* (1999) Prenatal nicotine increases pulmonary alpha7 nicotinic receptor expression and alters fetal lung development in monkeys. *J. Clin. Invest.* 103:637-47.
- Sher E., Giovannini F., Boot J., Lang B. (2000) Peptide neurotoxins, small-cell lung carcinoma and neurological paraneoplastic syndromes. *Biochimie* 82:927-36.
- Song P., Sekhon H.S., Jia Y., *et al.* (2003) Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 63:214-21.
- Song P., Spindel E.R. (2008) Basic and Clinical Aspects of Non-neuronal Acetylcholine: Expression of Non-neuronal Acetylcholine in Lung Cancer Provides a New Target for Cancer Therapy. *J. Pharmacol. Sci.* [Epub ahead of print].
- Sun S., Schiller J.H., Spinola M., Minna J.D. (2007) New molecularly targeted therapies for lung cancer. *J. Clin. Invest.* 117:2740-50.
- Trombino S., Bisio A., Catassi A., Cesario A., Falugi C., Russo P. (2004) Role of the non-neuronal human cholinergic system in lung cancer and mesothelioma : possibility of new therapeutic strategies. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 4:535-42.
- Trombino S., Cesario A., Margaritora S., Granone P., Motta G., Falugi C., Russo P. (2004) Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors affect growth regulation of human mesothelioma cells: role of mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res.* 64:135-45. Erratum in : *Cancer Res.* 64:1559.
- Wang Y., Pereira E.F., Maus A.D., *et al.* (2001) Human bronchial epithelial and endothelial cells express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* 60: 1201-9.
- Wessler I.K., Kirkpatrick C.J. (2001) The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 14:423-34.
- West K.A., Brognard J., Clark A.S., *et al.* (2003) Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 111:81-90.
- Zia S., Ndoye A., Nguyen V.T., Grando S.A. (1997) Nicotine enhances expression of the alpha 3, alpha 4, alpha 5, and alpha 7 nicotinic receptors modulating calcium metabolism and regulating adhesion and motility of respiratory epithelial cells. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 97:243-62.

Activité agoniste cholinergique induite par la fraction non toxique du venin de *Buthus occitanus tunetanus*

Amani CHEIKH^{1,2}, Rym BENKHALIFA^{1*}, Daniel POTREAU², Jocelyn BESCOND², Mohamed EL AYEB¹, Guy RAYMOND², Christian COGNARD²

¹ Laboratoire des Venins et Toxines, Institut Pasteur de Tunis, BP 74, 1002 Tunis, Tunisie ; ² UMR 6187 IPBC, 40 avenue du Recteur Pineau, 86022 Poitiers Cedex, France.

* Auteur correspondant ; Tél : +216 71 84 37 55 ; Fax : +216 71 79 18 33 ; Courriel : rym.benkhalifa@pasteur.rns.tn

Résumé

Dans ce travail, nous avons identifié la présence d'au moins un agoniste spécifique des récepteurs cholinergiques dans la fraction BotM1 du venin du scorpion *Buthus occitanus tunetanus*. L'application de BotM1 au niveau de la jonction neuromusculaire induit la contraction du muscle gastrocnémien chez la grenouille *Rana esculenta*. Sur des myotubes en culture de rats nouveau-nés, nous avons visualisé par microscopie confocale des vagues calciques en présence de BotM1. Le blocage des récepteurs de la ryanodine (RyR) ou de ceux de l'inositol 1,4,5 triphosphate (RIP3) inhibe l'effet de BotM1. Afin d'identifier les protéines impliquées dans cet effet, plusieurs inhibiteurs (utilisés séparément) bloquent l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} induite par BotM1. En patch-clamp, BotM1 dépolarise la membrane de la cellule musculaire d'une manière comparable à l'acétylcholine et cette dépolarisation est bloquée en grande partie en présence d' α -bungarotoxine. La perfusion du cœur isolé de rat adulte par BotM1 diminue d'une manière significative l'amplitude et la fréquence de la tension cardiaque. Sur les cardiomyocytes, BotM1 diminue l'amplitude de la dépolarisation induite par une augmentation de la concentration externe de KCl. Dans les conditions de patch-clamp, BotM1 réduit d'une manière significative le courant Ca^{2+} de type L et cette inhibition n'est pas observée en présence d'atropine. Après phosphorylation des canaux Ca^{2+} , nous avons observé que le blocage de la protéine membranaire Gai empêche l'inhibition enregistrée préalablement en présence de BotM1.

Agonizing cholinergic activity induced by a non toxic fraction of *Buthus occitanus tunetanus* venom

In the present work, we highlighted the presence of at least a specific agonist of cholinergic receptors in the BotM1 fraction of the scorpion *Buthus occitanus tunetanus* venom. The application of BotM1 at the neuromuscular junction induces the contraction of the frog (*Rana esculenta*) gastrocnemius muscle. In rat newborn cultured myotubes, we visualized by confocal microscopy Ca^{2+} waves after BotM1 application. The blocking of ryanodine (RyR) or inositol 1,4,5 triphosphate (RIP3) receptors inhibits BotM1 effect. To identify the proteins involved in this effect, several inhibitors (used separately) prevent the BotM1-induced increase in intracellular Ca^{2+} concentration. Patch-clamp experiments show that BotM1 depolarizes muscle cell membrane in a way similar to acetylcholine, and this depolarization is greatly inhibited in the presence of α -bungarotoxin. Perfusing the adult rat heart with BotM1 significantly decreases tension amplitude and rate. On cardiomyocytes, BotM1 decreases the amplitude of the depolarization induced by increasing the external KCl concentration. Under patch-clamp conditions, BotM1 significantly reduces L-type Ca^{2+} current, and this inhibition is not observed in the presence of atropine. After Ca^{2+} channel phosphorylation, blocking the membrane Gai-protein prevents the inhibition recorded previously in the presence of BotM1.

Keywords : Scorpion venom, calcium transient, nicotinic acetylcholine receptors, L-type calcium current, rat heart, muscarinic acetylcholine receptors.

Introduction

La voie cholinergique joue un rôle essentiel dans la propagation de l'influx nerveux au niveau des systèmes nerveux central et périphérique, incluant la jonction neuromusculaire et le système parasympathique. Les récepteurs cholinergiques (nAChR, pour les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine et mAChR, pour les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine) ont la propriété d'être reconnus par des alcaloïdes d'origine animale ou végétale, mais surtout par des toxines animales (issues des venins de serpents ou de scorpions par exemple). Nous présenterons les résultats d'une

étude physiologique qui a permis de mettre en évidence la présence d'au moins un agoniste cholinergique dans une fraction non toxique du venin du scorpion *Buthus occitanus tunetanus*. La fonction contractile du muscle squelettique et/ou cardiaque est tributaire du maintien de l'homéostasie calcique dans la cellule. De nombreuses toxines de scorpions sont capables de modifier cette fonction. Ainsi, Silveira *et al.* (1991) ont montré que le venin de *Tityus serrulatus*, appliqué sur le cœur de cobaye, modifie la force et la fréquence de la contraction en stimulant la libération de l'acétylcholine et des catécholamines. La toxine α -like, BmK1, extraite du venin de *Buthus martensi* Karsch modifie l'activité électrique et

mécanique du cœur isolé de rat adulte, en agissant par une autre voie impliquant les canaux Na^+ dépendants du potentiel (Sun *et al.*, 2003). D'autres toxines, comme les impérotines IpTx_a et IpTx_i du venin du scorpion *Pandinus imperator* présentent respectivement un effet activateur et inhibiteur de la fixation de la ryanodine sur son récepteur au niveau du cardiomyocyte et sur les récepteurs squelettiques et cardiaques exprimés dans des vésicules lipidiques (Valdivia *et al.*, 1992 ; El-Hayek *et al.*, 1995). D'autres peptides, proches des impérotines et identifiés dans les venins de *Scorpio maurus* (maurocalcine ; Fajloun *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2003) et de *Buthus judaicus* (BjTx-1 et 2 ; Zhu *et al.*, 2004), sont responsables de la stimulation de la libération de Ca^{2+} à partir du réticulum sarcoplasmique en favorisant, grâce à leur fixation, l'état ouvert des récepteurs de la ryanodine (RyR). Si les récepteurs de la ryanodine sont considérés comme étant une composante principale dans le mécanisme du couplage « excitation-contraction », alors l'activation des récepteurs nicotiniques déclencherait la cascade des événements impliqués dans ce mécanisme. Rares sont les molécules naturelles capables d'activer les récepteurs cholinergiques. Dans le venin de *Buthus occitanus tunetanus*, la fraction toxique la plus étudiée, BotG50, renferme des toxines actives sur les canaux Na^+ et K^+ . La fraction BotM1 est la première fraction élue par filtration du venin de *Buthus occitanus tunetanus* sur une colonne sephadex G-50. Elle renferme majoritairement des protéines de haut poids moléculaire et ne présente pas de toxicité après son injection intracérébroventriculaire chez la souris. Elle possède la particularité d'activer la lipolyse hormono-sensible grâce à son interaction avec les récepteurs β -adrénergiques des adipocytes de rats (Drira-Chaabane *et al.*, 1996) via deux protéines, LVP1 et LVP2 (*Lipolysis activating Venom Protein* ; Soudani *et al.*, 2005).

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si BotM1 était capable d'agir sur la contraction musculaire, en étudiant son action sur le muscle squelettique de grenouille (*Rana esculenta*) et sur le cœur de rat adulte. Puis, nous avons étudié son effet sur l'homéostasie calcique dans les myotubes en culture de rats nouveau-nés et dans les cardiomyocytes fraîchement dissociés de rat adulte.

Effet de BotM1 sur la contraction des muscles squelettique et cardiaque

Nous avons recouru à l'utilisation de deux modèles différents d'organes isolés, le muscle squelettique (muscle gastrocnémien isolé de grenouille) et le muscle cardiaque (cœur isolé de rat adulte) afin d'avoir une idée générale sur l'effet global de BotM1 sur la contraction musculaire squelettique et cardiaque.

Une étude préliminaire a été menée sur la préparation nerf sciatique-muscle gastrocnémien de grenouille (*Rana esculenta*). Les variations de tension du muscle ont été enregistrées au cours du temps dans les conditions isotoniques, les substances pharmacologiques étant déposées au niveau de la jonction entre le nerf et le muscle. L'acétylcholine (ACh ; 10 μM) entraîne, après généralement 1 à 3 min, des contractions musculaires plus ou moins isolées et assez brèves. Ces premiers résultats ont été considérés comme un témoin positif de la fonctionnalité de la jonction (Figure 1A). Après lavage de la préparation, l'application de BotM1 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) provoque des réponses mécaniques similaires, bien que plus longues (de type tétanique), à celles observées en présence d'ACh (Figure 1B). Ces observations préliminaires suggèrent fortement que BotM1, comme

l'acétylcholine, est capable de provoquer des contractions musculaires en agissant sur l'une des protéines impliquées dans la cascade d'événements du couplage « excitation-contraction ».

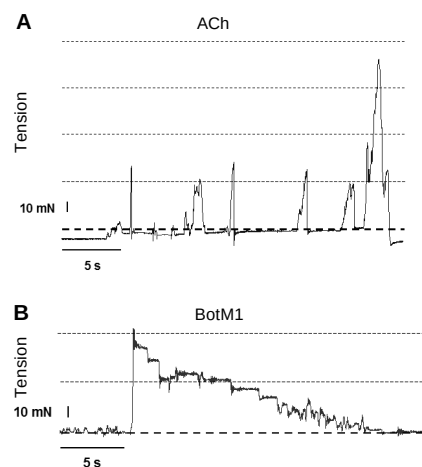


Fig. 1. Effet de la fraction non toxique du venin de *Buthus occitanus tunetanus*, BotM1, sur la tension du muscle gastrocnémien de grenouille (*Rana esculenta*). (A) L'ACh (10 μM) provoque des contractions musculaires isolées de 50 à 200 mN. (B) Un effet similaire (de l'ordre de 100 mN), mais plus durable, est observé après l'application de BotM1 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Fig. 1. Effect of the non-toxic venom fraction of *Buthus occitanus tunetanus*, BotM1, on the muscle tension of frog (*Rana esculenta*) gastrocnemius muscle. (A) ACh (10 μM) induces isolated muscle contractile responses of 50 to 200 mN amplitude. (B) A similar, but long-lasting, response was observed after application of BotM1 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Parallèlement, une étude préliminaire sur le cœur isolé de rat adulte, perfusé selon la technique de Langendorff, a montré que BotM1 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diminue d'une manière assez rapide l'amplitude de la tension, l'état stationnaire étant atteint après environ 1 min. De plus, une diminution progressive de la fréquence a été observée, l'état stationnaire étant atteint après environ 5 min (Cheikh *et al.*, 2006).

Etude de l'effet de BotM1 sur la concentration intracellulaire de Ca^{2+}

La microscopie confocale a été utilisée pour étudier le mode d'action de BotM1 sur le muscle squelettique, en utilisant comme modèle cellulaire les myotubes en culture de rats nouveau-nés, et sur le muscle cardiaque, en choisissant comme modèle les cardiomyocytes de rat adulte. Différentes doses de BotM1 (2 à 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ont été appliquées sur des myotubes en culture de rats nouveau-nés. Les résultats obtenus montrent que l'application de BotM1 provoque une augmentation de l'intensité de fluorescence dans les myotubes au repos (Figure 2), effet réversible et indépendant de la dose de fraction utilisée. Il est à souligner qu'une variation de fluorescence reflète les changements de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} .

Au niveau des cardiomyocytes, la réponse contractile a été provoquée par une dépolarisation produite par une augmentation de la concentration externe de KCl (100 mM). Dans ces conditions, BotM1 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) n'a aucun effet sur le niveau de Ca^{2+} de base mais réduit de $19,03 \pm 3,9\%$ ($p < 0,01$, $n = 3$ cellules) la dépolarisation produite par 100 mM de KCl (Cheikh *et al.*, 2006). Sachant que, lors du mécanisme de couplage « excitation-contraction », les canaux Ca^{2+} dépendants du potentiel sont responsables du déclenchement de la

libération du Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires, les résultats obtenus indiquent que BotM1 pourrait affecter l'influx de Ca^{2+} à travers ces canaux.

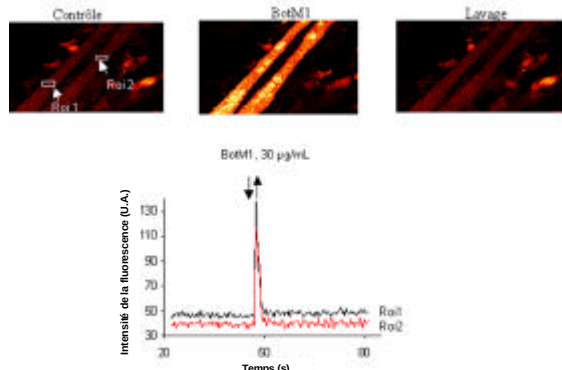


Fig. 2. Effet de BotM1 sur la concentration de Ca^{2+} dans les myotubes. (**En haut**) Visualisation de l'effet de BotM1 (30 µg/mL) par microscopie confocale sur le Ca^{2+} dans les myotubes chargés préalablement par la sonde fluorescente Fluo-4/AM (6 µM). La fréquence d'acquisition des images était de 1 image toutes les 300 ms. (**En bas**) Représentation des tracés correspondants à l'intensité moyenne de la fluorescence, en unité arbitraire (U.A.), mesurée au niveau des régions Roi1 et Roi2.

Fig. 2. BotM1 effect on Ca^{2+} concentration in myotubes. (**Upper**) Visualization of BotM1 effect (30 mg/mL), using confocal microscopy, in myotubes previously loaded with the fluorescent dye Fluo-4/AM (6 mM). The acquisition frequency of images was one image every 300 ms. (**Lower**) Representation of the mean fluorescence intensity, in arbitrary unit (U.A.), measured in the cell areas Roi1 and Roi2.

Origine de l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} induite par BotM1 dans les myotubes

Dans la cellule musculaire squelettique, l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) peut s'expliquer soit par une entrée d'ions dans la cellule à travers les canaux Ca^{2+} de type L, soit par sa libération à partir des réserves intracellulaires, essentiellement le réticulum sarcoplasmique, à travers les récepteurs de la ryanodine (RyR) ou ceux de l'inositol 1,4,5 triphosphate (RIP3). D'après la Figure 3A, l'application de BotM1 seule (10 µg/mL, T = 50 s) provoque une augmentation transitoire de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. L'incubation des cellules en présence de ryanodine (5 µM), un bloqueur des RyR dans l'état ouvert, est responsable de l'augmentation du niveau de Ca^{2+} de base. Une deuxième application de BotM1 à la même dose en présence de ce bloqueur (T = 2000 s) n'induit pas l'augmentation transitoire de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ enregistrée au départ (T = 50 s).

D'autres expériences ont été réalisées en présence de 2-APB (2-aminoéthyl diphénylborate), introduit par Maruyama *et al.* (1997) comme étant un antagoniste des RIP3. Une fois appliqué sur les myotubes, le 2-APB est capable de générer des vagues calciques durant approximativement 2 min (Figure 3B). Ensuite, les cellules récupèrent leur état de repos. Une application simultanée de BotM1 et de 2-APB reproduit le même effet que l'application de 2-APB seul. Cependant, la seule application de BotM1, après la perfusion de 2-APB, n'a aucun effet sur le Ca^{2+} .

Dans la cellule musculaire squelettique, l'activation des nAChR affecte le potentiel membranaire en produisant une variation locale de ce dernier. Cette variation, lorsqu'elle atteint un certain seuil, se transforme en potentiel d'action, ce qui *in fine* produit la contraction musculaire. Afin de confirmer les résultats précédents et de savoir si les nAChR sont impliqués dans

l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, nous avons étudié l'effet de BotM1 sur le potentiel membranaire des myotubes. Dans les conditions physiologiques, le potentiel de repos est maintenu principalement par la répartition inégale des ions K^+ de part et d'autre de la membrane selon deux mécanismes majeurs, les canaux sélectifs au K^+ et la pompe ATPasique Na^+/K^+ .

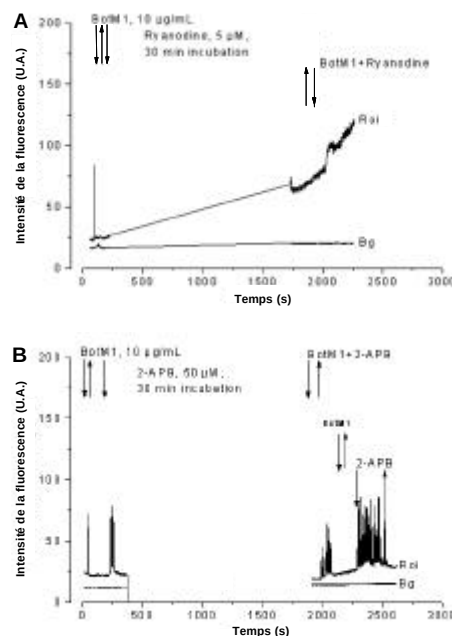


Fig. 3. Implication des réserves intracellulaires dans l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ produite par BotM1 dans les myotubes. (**A**) et (**B**) BotM1 a été brièvement appliquée sur les myotubes. (**A**) Les cellules ont été ensuite incubées en présence de ryanodine (5 µM, 30 min) ou (**B**) de 2-APB (50 µM, 30 min). Dans les deux conditions, l'effet de BotM1 sur la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est inhibé. Roi: région d'intérêt dans la cellule. Bg: Région témoin hors de la cellule.

Fig. 3. Involvement of intracellular stores in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase induced by BotM1 in myotubes. (**A**) and (**B**) BotM1 was briefly applied on myotubes. (**A**) Cells were then incubated with ryanodine (5 mM, 30 min) or (**B**) with 2-APB (50 mM, 30 min). Under both conditions, the effect of BotM1 on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is inhibited. Roi: specific area in the cell. Bg: control area outside the cell.

Nous avons eu recours à la technique de *patch-clamp* en configuration « cellule entière » et en mode « courant imposé » pour mesurer la variation du potentiel membranaire après l'application de BotM1. Les résultats obtenus montrent que BotM1 produit un déplacement positif du potentiel membranaire (de -60 mV à environ -10 mV). Après lavage de la fraction, le potentiel revient en général à sa valeur initiale (*i.e.* -60 mV) et les cellules sont de nouveau capables, bien que plus faiblement, de répondre à une deuxième stimulation par BotM1 (Figure 4 ; n = 4). Ces résultats confirment le rôle dépolarisant de BotM1. L'incubation des cellules en présence d' α -bungarotoxine bloque 90% de la dépolarisation provoquée par BotM1, le lavage de la toxine permettant une récupération d'environ 70% de l'effet dépolarisant enregistré au départ (Figure 4).

Effet de BotM1 sur les cardiomyocytes ventriculaires

Le flux de Ca^{2+} à travers les canaux Ca^{2+} de type L est connu pour être responsable de la contraction du cardiomyocyte. Nous avons donc étudié l'effet de BotM1 sur le courant Ca^{2+} de type L (I_{CaL}). La comparaison des tracés correspondant à I_{CaL} , obtenus dans les conditions contrôle et en présence de BotM1 (1 µg/mL), montre que la fraction produit une diminution de I_{CaL} quelle que soit

la valeur de potentiel appliquée. Cette diminution est d'environ 50%, l'état stationnaire étant atteint après environ 5 min de perfusion avec BotM1 (Figure 5).

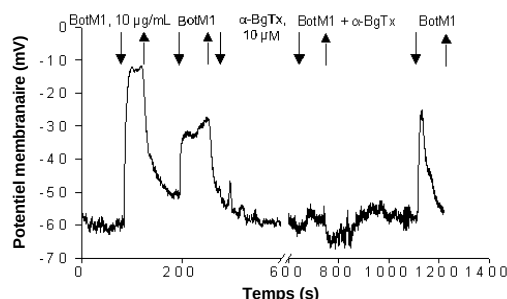


Fig. 4. Effet de BotM1 sur le potentiel membranaire des myotubes. Tracé traduisant la variation du potentiel membranaire d'un myotube en fonction du temps, enregistré par la technique de patch-clamp en configuration « cellule entière ». Une première application de BotM1 (10 mg/mL) dépolarise, de façon réversible, la membrane d'environ 45 mV et une seconde d'environ 20 mV. L' α -bungarotoxine (α -BgTx, 10 μ M pendant 1 à 2 min) bloque, en grande partie et de façon réversible, l'effet dépolarisant de BotM1.

Fig. 4. BotM1 effect on the membrane potential of myotubes. The variation of membrane potential of one myotube was recorded as a function of time, using the patch-clamp technique in the « whole cell » configuration. A first BotM1 application (10 mg/mL) reversibly depolarizes the membrane of about 45 mV, and a second one of about 20 mV. α -bungarotoxin (α -BgTx, 10 μ M during 1 to 2 min) greatly and reversibly inhibits the BotM1 depolarizing effect.

La modulation de I_{CaL} est complexe. En effet, il peut être modulé indirectement via les mAChR. Les travaux effectués précédemment sur les myotubes de rats nouveau-nés montrent que BotM1 interagit avec les nAChR dans les cellules musculaires squelettiques. Nous avons alors émis l'hypothèse que BotM1 pouvait aussi interagir avec les mAChR et nous avons montré que I_{CaL} , augmenté par 10 μ M d'atropine (un inhibiteur spécifique des mAChR), retourne à sa valeur initiale après l'application subséquente de BotM1 (1 μ g/mL). Ces résultats suggèrent fortement que les mAChR sont impliqués dans l'effet inhibiteur de BotM1 sur I_{CaL} .

Dans le cardiomyocyte, l'activité du canal Ca^{2+} peut être modulée par la stimulation des mAChR via différentes voies de signalisation intracellulaire. Ces voies sont essentiellement celles de la régulation par l'oxyde nitrique (NO) et de la guanylyl cyclase ou encore celle des réponses dépendantes de l'AMPc faisant intervenir une protéine G sensible à la toxine pertussique (PTX ; Harvey *et al.*, 1983). Afin de déterminer la voie de signalisation impliquée dans l'effet de BotM1 via la stimulation des mAChR, I_{CaL} a été enregistré avant et après que les cellules aient été perfusées avec de la forskoline (2 μ M), connue pour activer l'adénylate cyclase et phosphoryler les canaux Ca^{2+} via l'AMPc. Dans ces conditions, une augmentation de l'amplitude de I_{CaL} est observée, l'application ultérieure de BotM1 (1 μ g/mL) provoquant une diminution significative de I_{CaL} (Figure 6A). Sur des cellules prétraitées avec de la PTX, I_{CaL} est également augmenté d'une manière significative par la forskoline et, dans ces conditions, l'effet inhibiteur de BotM1 ne se produit plus (Figure 6B). Sur la base de ces résultats, l'inhibition du I_{CaL} de base, enregistré dans les conditions expérimentales standards en présence de BotM1, pourrait être attribuée à la stimulation des mAChR induisant une diminution de la production d'AMPc en empruntant la voie de l'adénylate cyclase suite à l'activation de la protéine $G_{\alpha i}$ sensible à la PTX.

Discussion

Cette étude montre que la fraction non toxique du venin de *Buthus occitanus tunetanus*, BotM1, produit,

d'une part, la contraction du muscle gastrocnémien chez la grenouille et, d'autre part, diminue l'amplitude et la fréquence des battements cardiaques chez le rat adulte.

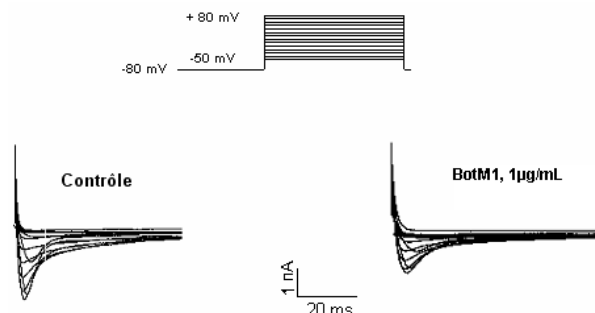


Fig. 5. Caractérisation de l'effet inhibiteur de BotM1 sur I_{CaL} . Tracés de I_{CaL} enregistrés à différentes valeurs de potentiel (schéma) par la technique de patch-clamp en configuration « cellule entière », dans les conditions contrôle (tracés de gauche) et en présence de 1 μ g/mL de BotM1 (tracés de droite).

Fig. 5. Characterization of BotM1 inhibitory effect on I_{CaL} . Traces of I_{CaL} recorded during various potentials (scheme) using the patch-clamp technique in the « whole cell » configuration, under control conditions (left traces) and in the presence of 1 mg/mL BotM1 (right traces).

Ces effets résultent de l'interaction entre les molécules contenues dans BotM1 et les récepteurs cholinergiques des muscles squelettique et cardiaque.

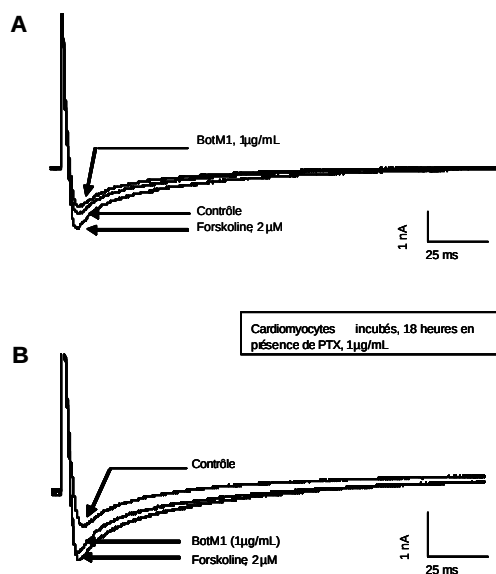


Fig. 6. Effet de BotM1 sur I_{CaL} après prétraitement des cardiomyocytes par la PTX. (A) I_{CaL} mesuré dans les conditions contrôle, en présence de forskoline (2 μ M) et en présence de BotM1 (1 μ g/mL). (B) Mêmes conditions qu'en (A) mais sur des cellules prétraitées pendant 18 heures avec de la PTX (1 μ g/mL).

Fig. 6. BotM1 effect on I_{CaL} following cardiomyocytes incubation in the presence of PTX. (A) I_{CaL} measured under control conditions, in the presence of forskoline (2 μ M), and in the presence of BotM1 (1 μ g/mL). (B) Same conditions as in (A) except that cells were pretreated during 18 hours with PTX (1 μ g/mL).

A l'échelle cellulaire, BotM1 module l'homéostasie calcique. Ainsi, appliquée sur des myotubes en culture à 10 μ g/mL, elle induit l'émission de vagues calciques. Sachant que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ pourrait être aussi bien d'origine extracellulaire qu'intracellulaire, nous avons recouru à l'utilisation d'inhibiteurs agissant d'une manière sélective sur les protéines impliquées dans la chaîne de couplage « excitation-contraction ». Le blocage des RyR par la ryanodine (5 μ M) inhibe l'effet de BotM1.

Ceci est expliqué par le fait qu'à cette concentration, la ryanodine bloque les RyR dans une conformation ouverte (Fleisher *et al.*, 1985), d'où l'augmentation progressive du niveau de Ca^{2+} de base et la désensibilisation des récepteurs nicotiniques. De plus, le blocage de l'effet de BotM1 par le 2-APB suggère une origine sarcoplasmique de l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Dans les cellules musculaires squelettiques, le Ca^{2+} agit comme un messager intracellulaire essentiellement impliqué dans le mécanisme du couplage « excitation-contraction ». C'est la stimulation des nAChR qui est à l'origine de l'excitation de la cellule. Le nAChR est considéré comme étant la protéine clef, transductrice de signal au niveau de la jonction neuromusculaire, et responsable de la génération de dépolarisations membranaires localisées. Nos résultats montrent que l'incubation des cellules en présence d' α -bungarotoxine bloque l'effet dépolarisant de BotM1; ils suggèrent la présence d'au moins un composé dans cette fraction capable d'interagir avec les nAChR et d'induire une dépolarisation membranaire.

Ces résultats sont prometteurs, d'autant plus que dans le domaine thérapeutique, des efforts non négligeables ont été réalisés afin d'identifier et de caractériser de nouveaux ligands spécifiques des nAChR. En effet, la caractérisation d'agonistes agissant d'une manière sélective sur les nAChR neuronaux pourrait être d'une grande utilité thérapeutique dans le traitement de certaines maladies neurologiques comme l'épilepsie (Holladay *et al.*, 1990 ; Dulhunty, 1992). Jusqu'à présent, il a été montré que certaines toxines animales ont un effet positif sur le niveau de Ca^{2+} myoplasmique. La trachynilysine, une protéine toxique extraite du venin du poisson *Synanceja trachynis*, agit *via* la libération massive d'acétylcholine (ACh) par les terminaisons nerveuses au niveau des préparations neuromusculaires isolées (Colasante *et al.*, 1996 ; Lin *et al.*, 1998 ; Meunier *et al.*, 2000). L'épipibatidine, un alcaloïde obtenu à partir de la peau de la grenouille *Epipedobates tricolor* (Sauviat *et al.*, 2000), est capable de produire la libération d'ACh, son effet s'expliquant en partie par son action sur les nAChR (Bonhauss *et al.*, 1995 ; Prince et Sine, 1998). Jusqu'à présent, aucune molécule issue de venins de scorpions ne s'est révélée active sur les nAChR dans le muscle squelettique. Les travaux effectués par Nirthanan *et al.* (2002) ont montré la présence d'un agoniste cholinergique dans le venin du scorpion *Heterometrus spinifer* qui s'est avéré n'être autre que l'ACh.

Notre étude sur les cardiomyocytes a permis d'attribuer les effets chronotropes et inotropes négatifs de BotM1, du moins en partie, à l'inhibition de I_{CaL} dans la cellule ventriculaire de rat adulte. Cette inhibition est dépendante de la dose utilisée et est partiellement réversible. Ceci pourrait également expliquer la diminution de l'effet de BotM1 sur le potentiel membranaire induite par la solution riche en KCl (100 mM). Par ailleurs, au niveau cellulaire, d'autres travaux ont montré que le carbachol, appliqué sur les myocytes ventriculaires de furet, inhibe le I_{CaL} de base en fonction de la concentration utilisée (Bett *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'ACh a un effet inotrope négatif sur les myocytes ventriculaires de rat (McMorn *et al.*, 1993).

Lors de nos expériences, le blocage de l'effet inhibiteur de BotM1 en présence d'atropine suggère, d'une part, que l'inhibition du I_{CaL} de base serait indirecte et, d'autre part, qu'elle serait la conséquence d'une interaction avec les mAChR cardiaques. Ces effets ne peuvent pas être expliqués par la présence d'ACh dans BotM1 puisque cette fraction ne renferme que des

composés ayant un poids moléculaire supérieur à 8 kDa.

Dans le muscle cardiaque, les mAChR les plus représentés sont de type M2 (Dhein *et al.*, 2001 ; Hulme *et al.*, 1990). Leur activation est couplée à la plupart des changements du mode de fonctionnement des canaux ioniques grâce à l'un des deux mécanismes suivants. Le premier implique directement la protéine G responsable de la régulation de l'activité des canaux K^+ (canaux GIRK). Cependant, il a été rapporté que la voie de signalisation directe existe essentiellement dans les nœuds sinusal, sinoatrial et atrioventriculaire ainsi que les cellules atriales mais pas dans les cellules ventriculaires (Harvey et Belevych, 2003 ; Abrams *et al.*, 2006). La seconde voie implique une régulation indirecte de l'activité du canal *via* des réponses dépendantes de l'AMPc (Hatzell, 1988). En effet, chez les Mammifères, les réponses muscariniques dans les cellules ventriculaires d'adulte sont généralement observées quand le taux d'AMPc dépasse celui mesuré dans les conditions de base, suite à l'activation des récepteurs α -adrénergiques (Lin *et al.*, 1998 ; Sauviat *et al.*, 2000) ou à l'activation directe de l'adénylate cyclase, stimulant ainsi la production d'AMPc (Seamon *et al.*, 1983). De ce fait, dans les myocytes ventriculaires, les réponses muscariniques sont uniquement observées dans les conditions où le taux d'AMPc est élevé par rapport aux conditions normales.

L'application de forskoline augmente d'une manière remarquable le courant I_{CaL} . De plus, le blocage des protéines G α_i par la PTX, qui inhibe complètement l'effet de BotM1, nous permet de proposer l'hypothèse suivante pour expliquer l'inhibition de I_{CaL} : BotM1 interagit avec les mAChR, active la protéine G α_i sensible à la PTX, elle-même responsable de l'activation de l'adénylate cyclase et donc de la production d'AMPc. L'ensemble de ces résultats permet de suggérer un effet de BotM1 sur le courant I_{CaL} de base dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat, avant et après phosphorylation des canaux Ca^{2+} . Ceci pourrait être expliqué par un taux élevé d'AMPc dans les conditions standards de nos expériences. Des travaux précédents ont montré que, dans les cellules atriales et sinoatriales, l'activation des récepteurs M2 peut provoquer un changement de la fonction des canaux ioniques régulés par le taux d'AMPc même en l'absence d'un agoniste responsable de l'augmentation de la production de cette dernière (Mery *et al.*, 1997).

Actuellement, il est bien démontré que la régulation de l'activité électrique des canaux ioniques *via* l'activation des mAChR, en empruntant la voie directe des protéines G ou indirecte après modulation (inhibition ou facilitation) des réponses dépendantes de l'AMPc, dépend aussi bien du type de myocyte que des conditions expérimentales (Tonder *et al.*, 2001 ; Abrams *et al.*, 2006). En effet, concernant une implication possible du NO et du GMPc dans l'inhibition muscarinique du I_{CaL} , d'autres expériences sont envisagées afin de déterminer si cette voie est empruntée par BotM1. Cependant, bien que ce mécanisme de signalisation soit suggéré dans les myocytes ventriculaires et ait été bien élucidé dans les cellules nodales et atrioventriculaires (Harvey *et al.*, 1983), cette hypothèse est écartée par le fait que l'effet des mAChR sur I_{CaL} ait été observé chez la souris NOS-KO (Vandecasteele *et al.*, 1999 ; Belevych et Harvey, 2000).

En conclusion, nos résultats montrent pour la première fois la présence d'une activité dépolarisante dans la fraction non toxique du venin du scorpion jaune *Buthus occitanus tunetanus*, due à l'interaction entre au moins une composante de cette fraction et les nAChR. L'identification et la caractérisation de cette composante sont d'un grand intérêt, étant donnée que les agonistes des nAChR sont considérés comme des analgésiques

potentiels et des outils thérapeutiques dans le traitement de certaines maladies neurologiques ainsi que dans des désordres mentaux relatifs à une diminution de l'activité cholinergique (Tonder *et al.*, 2001). Par ailleurs, les résultats sur le muscle cardiaque sont en faveur de la présence d'une composante qui interagit avec les mAChR via la protéine G α i sensible à la PTX.

Des expériences sont en cours pour isoler et caractériser la(es) protéine(s) responsable(s) de la modulation de I_{CaL} dans le cardiomyocyte et de la [Ca²⁺]_i dans les myotubes, afin de mieux étudier ses ou leurs affinités vis-à-vis de ses ou leurs récepteurs et d'envisager une exploitation dans le domaine thérapeutique.

Références bibliographiques

- Abrams P., Andersson K.E., Buccafusco J.J., Chapple C., de Groat W.C., Fryer A.D., Kay G., Laties A., Nathanson N.M., Pasricha P.J., Wein A.J. (2006) Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br. J. Pharmacol.* 148:565-78.
- Belevych A.E., Harvey R.D. (2000) Muscarinic inhibitory and stimulatory regulation of the L-type Ca²⁺ current is not altered in cardiac ventricular myocytes from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *J. Physiol.* 528:279-89.
- Bett G.C., Dai S., Campbell D.L. (2002) Cholinergic modulation of the basal L-type calcium current in ferret right ventricular myocytes. *J. Physiol.* 542:107-17.
- Bonhaus D.W., Bley K.R., Broka C.A., Fontana D.J., Leung E., Lewis R., Shieh A., Wong E.H. (1995) Characterization of the electrophysiological, biochemical and behavioral actions of epibatidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272:1199-1203.
- Cheikh A., Benkhalifa R., Bescond J., El Ayeb M., Raymond G., Cognard C., Potreau D. (2006) Depression of cardiac L-type calcium current by a scorpion venom fraction M1 following muscarinic receptors interaction involving adenylate cyclase pathway. *Toxicon* 48:373-87.
- Cheikh A., Benkhalifa R., El Ayeb M., Raymond G., Potreau D., Cognard C. (2007) A novel depolarizing activity of scorpion venom agonizing nicotinic receptors in skeletal muscle cells. *Toxicon* 49:117-22.
- Chen L., Estève E., Sabatier J.-M., Ronjat M., De Waard M., Allen P.D., Pessah I.N. (2003) Maurocalcine and peptide A stabilize distinct subconductance states of ryanodine receptor type 1, revealing a proportional gating mechanism. *J. Biol. Chem.* 278:16095-106.
- Colasante C., Meunier F.A., Kreger A.S., Molgo J. (1996) Selective depletion of clear synaptic vesicles and enhanced quantal transmitter release at frog motor nerve endings produced by trachynilysin, a protein toxin isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom. *Eur. J. Neurosci.* 8:2149-56.
- Dhein S., van Koppen C.J., Brodde O.E. (2001) Muscarinic receptors in the mammalian heart. *Pharmacol. Res.* 44:161-82.
- Drira-Chaabane S., El Ayeb M., Torresani J., Gharbi-Chihi J. (1996) Lipolytic action of *Buthus occitanus tunetanus* venom: involvement of the beta adrenergic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226:280-6.
- Dulhunty A.F. (1992) The voltage-activation of contraction in skeletal muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 57:181-223.
- El-Hayek R., Lokuta A.J., Arevalo C., Valdivia H.H. (1995) Peptide probe of ryanodine receptor function. Imperatoxin A, a peptide from the venom of the scorpion *Pandinus imperator*, selectively activates skeletal-type ryanodine receptor isoforms. *J. Biol. Chem.* 270:28696-704.
- Fajloun Z., Kharrat R., Chen L., Lecomte C., Di Luccio E., Bichet D., El Ayeb M., Rochat H., Allen P.D., Pessah I.N., De Waard M., Sabatier J.M. (2000) Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca²⁺ release channel/ryanodine receptors. *FEBS Lett.* 469:179-85.
- Fleischer S., Ogunbunmi E.M., Dixon M.C., Fleer E.A.M. (1985) Localization of Ca²⁺ release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:7256-59.
- Hartzell H.C. (1988) Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 52:165-247.
- Harvey R.D., Belevych A.E. (2003) Muscarinic regulation of cardiac ion channels. *Br. J. Pharmacol.* 139:1074-84.
- Harvey A.L., Hider R.C., Khader F. (1983) Effect of phospholipase A on actions of cobra venom cardiotoxins on erythrocytes and skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 728:215-21.
- Holladay M.W., Dart M.J., Lynch J.K. (1997) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as targets for drug discovery. *J. Med. Chem.* 40:4169-94.
- Hulme E.C., Spalding T.A., Curtis C.A., Birdsall N.J., Corrie J.E. (1990) Blockade of muscarinic receptors by alkylating agonist analogues. *Biochem. Soc. Trans.* 18:440-1.
- Lin N.H., Gunn D.E., Li Y., He Y., Bai H., Ryther K.B., Kuntzweiler T., Donnelly-Roberts D.L., Anderson D.J., Campbell J.E., Sullivan J.P., Arneric S.P., Holladay M.W. (1998) Synthesis and structure-activity relationships of pyridine-modified analogs of 3-[2-((S)-pyrrolidinyl)methoxy]pyridine, A-84543, a potent nicotinic acetylcholine receptor agonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:249-54.
- Maruyama T., Kanaji T., Nakade S., Kanno T., Mikoshiba K. (1997) 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J. Biochem.* 122:498-505.
- McDonald R.L., Vaughan P.F., Peers C. (1994) Muscarinic (M1) receptor-mediated inhibition of K⁽⁺⁾-evoked [3H]-noradrenaline release from human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells via inhibition of L- and N-type Ca²⁺ channels. *Br. J. Pharmacol.* 113:621-7.
- McMorn S.O., Harrison S.M., Zang W.J., Yu X.J., Boyett M.R. (1993) A direct negative inotropic effect of acetylcholine on rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 265:393-400.
- Mery P.F., Abi-Gerges N., Vandecasteele G., Jurevicius G., Eschenhagen T. (1997) Muscarinic regulation of the L-type Ca²⁺ current in isolated cardiac myocytes. *Life Sci.* 60:1113-20.
- Meunier S., Pol S., Houeto J.L., Vidailhet M. (2000) Abnormal reciprocal inhibition between antagonist muscles in Parkinson's disease. *Brain* 123:1017-26.
- Nirathanan S., Joseph J.S., Gopalakrishnakone P., Khoo H.E., Cheah L.S., Gwee M.C. (2002) Biochemical and pharmacological characterization of the venom of the black scorpion *Heterometrus spinifer*. *Biochem. Pharmacol.* 63:49-55.
- Prince R.J., Sine S.M. (1998) Epibatidine activates muscle acetylcholine receptors with unique site selectivity. *Biophys. J.* 75:1817-27.
- Sauviat M.P., Meunier F.A., Kreger A., Molgo J. (2000) Effects of trachynilysin, a protein isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom, on frog atrial heart muscle. *Toxicon* 38:945-59.
- Seamon K.B., Daly J.W., Metzger H., De Souza N.J., Reden J. (1983) Structure-activity relationships for activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin and its derivatives. *J. Med. Chem.* 26:436-9.
- Silveira N.P., Moraes-Santos T., Azevedo A.D., Freire-Maia L. (1991) Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom and one of its purified toxins (toxin gamma) on the isolated guinea-pig heart. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 98:329-36.
- Soudani, N., Gharbi-Chihi, J., Srairi-Abid, N., Yazidi, C.M., Planells, R., Margotat, A., Torresani, J., El Ayeb, M. (2005) Isolation and molecular characterization of LVP1 lipolysis activating peptide from scorpion *Buthus occitanus tunetanus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1747:47-56.
- Sun C.P., Li, Y., Liu X.F. (2003) Quasi-Spin-Wave Quantum Memories with a Dynamical Symmetry. *Phys. Rev. Lett.* 91:147903.
- Tonder J.E., Olesen P.H. (2001) Agonists at the alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors: structure-activity relationships and molecular modeling. *Curr. Med. Chem.* 8:651-74.
- Vandecasteele G., Eschenhagen T., Scholz H., Stein B., Verde, Fischmeister R. (1999) Muscarinic and beta-adrenergic regulation of heart rate, force of contraction and calcium current is preserved in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.* 5:331-4.
- Valdivia H.H., Kirby M.S., Lederer W.J., Coronado R. (1992) Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:12185-9.
- Zhu X., Zamudio F.Z., Olbinski B.A., Possani L.D., Valdivia H.H. (2004) Activation of skeletal ryanodine receptors by two novel scorpion toxins from *Buthus judaicus*. *J. Biol. Chem.* 279:26588-96.

Les toxines à trois doigts : même structure, même mécanisme de repliement ?

Grégori GROSS, Pascal DREVET*

Institut de Biologie et de Technologies de Saclay, SBIGEM/DSV/CEA, Gif-sur-Yvette, France.

* Auteur correspondant ; Tél : +33 (0)1.69.08.31.31 ; Fax : +33 (0)1.69 08.47.12 ; Courriel : pascal.drevet@cea.fr

Résumé

Les toxines « à trois doigts » forment un groupe de protéines partageant un repliement commun et exprimant leur activité toxique à travers une multitude de modes d'action. Ces toxines font partie de la famille structurale des protéines à trois doigts qui malgré une grande variabilité dans leurs séquences présentent des éléments structuraux très bien conservés. L'étude des mécanismes de repliement oxydant in vitro de deux toxines à trois doigts montre que ces deux protéines, bien qu'adoptant le même type de structure, se replient selon des mécanismes dissemblables. Ce résultat conforte ceux obtenus lors de l'étude des protéines de type BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor), qui montraient la disparité de leurs mécanismes de repliement. La présence de quelques éléments conservés semble donc être suffisante pour engendrer une topologie, en revanche les chemins pour parvenir à cette topologie dépendent de facteurs encore inconnus.

Three-fingered toxins : same fold, same folding pathway ?

Three-fingered toxins form a group of proteins sharing a common fold and exhibiting distinct toxic activities. These toxins belong to a larger family of three-fingered proteins which display significant sequence variability but share conserved structural elements. The comparison of the oxidative folding pathway of two three-fingered toxins shows that these two proteins that share the same fold follow different folding pathways. These results agree with former studies conducted on proteins of the BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) family, showing divergent folding pathways. Conserved structural elements seem to dictate a particular topology whereas the folding pathway may depend on other, still unidentified features.

Keywords : Three fingered toxin, oxidative folding, folding mechanism, toxic function.

Introduction

Les toxines « à trois doigts » forment un ensemble de protéines répondant à deux critères : on les trouve dans les venins de serpent et elles adoptent une structure en trois boucles riches en feuillettes bêta émergeant d'un cœur compact comportant quatre ponts disulfure (Tsetlin, 1999). Cette communication a pour objet de montrer qu'à l'instar d'une autre famille de protéines, celle du BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor), les protéines à trois doigts font preuve d'une grande homogénéité de structure, tout en employant des voies de repliement radicalement différentes (Chang *et al.*, 2005).

Diversité des modes d'action des toxines à trois doigts

Malgré une très grande homogénéité structurale, les toxines à trois doigts présentent une diversité séquentielle suffisante pour leur conférer un large éventail d'activités.

Inhibiteurs de récepteurs impliqués dans le fonctionnement du système nerveux

Certaines neurotoxines à trois doigts bloquent la communication nerveuse en se liant aux récepteurs à l'acétylcholine (Servent et Ménez, 2001 ; Nirthanan et

Gwee, 2004). Ces toxines sont exclusivement des antagonistes compétitifs de l'acétylcholine. D'autres neurotoxines ciblent des récepteurs couplés à la protéine G, tels que les récepteurs muscariniques ou adrénergiques. Elles peuvent agir soit comme antagonistes compétitifs, soit comme modulateurs allostériques (Ellis, 1997 ; Christopoulos et Kenakin, 2002).

Inhibiteurs de protéines membranaires non neuronales

La calciseptine et son homologue, la FS2, inhibent les canaux calciques de type L, provoquant le relâchement des muscles lisses et inhibant la contraction cardiaque (de Weille *et al.*, 1991 ; Yasuda *et al.*, 1994).

La cardiotoxine A5 et la dendroaspine se lient aux intégrines selon des modes de liaison qui diffèrent mais qui, dans les deux cas, conduisent à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Rahman *et al.*, 2000 ; Wu *et al.*, 2006).

Inhibiteurs d'enzymes

Les fasciculines se lient à l'acétylcholinestérase et l'inhibent de façon non-compétitive en bloquant la voie d'accès du substrat au site catalytique (Karlsson *et al.*, 1984).

Les hemextines A et B, lorsqu'elles s'associent en un complexe AB, inhibent l'activité protéasique du facteur

VIIa, ce qui empêche la coagulation (Banerjee *et al.*, 2005).

Cytotoxines

Il a été montré que leur toxicité s'exerce par la dépolarisation des cardiomyocytes, ce qui conduit à un arrêt cardiaque de la victime (Kumar *et al.*, 1997). Le mécanisme proposé pour expliquer ces effets implique la liaison de ces toxines à la membrane des cardiomyocytes, puis une oligomérisation conduisant à la formation de pores aboutissant à la fuite des solutés contenus dans le cytoplasme.

Eléments communs de structure

La famille des toxines à trois doigts regroupe donc des protéines exerçant leur toxicité selon une grande diversité de modes d'action. Ces toxines appartiennent à la famille structurale plus large des protéines à trois doigts qui regroupe les domaines extracellulaires de divers récepteurs, comme le récepteur à l'activine de type II (en anglais, *Activin receptor type II*), le récepteur de la protéine de la morphogenèse osseuse (*BMP receptor*), le récepteur du facteur de croissance transformant bêta de type II (*TGF beta type II*

receptor), le récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase (UPAR), le récepteur ly-6 et le récepteur CD59 (Tsetlin, 1999). La protéine LYNX qui est associée à la membrane (Miwa *et al.*, 2006) ainsi que la protéine soluble SLURP (Adermann *et al.*, 1999) sont également classées dans la famille des protéines trois doigts.

Les structures cristallographiques de trois exemples de protéines à trois doigts, deux toxines de venin de serpent et le domaine extracellulaire du récepteur du facteur de croissance transformant bêta, sont présentées dans la *Figure 1*. Ce type de structure est composé de trois longues boucles, ou « doigts », maintenues par quatre ponts disulfure rassemblés dans la partie apicale de la molécule. Il apparaît également que la topologie est conservée même si des adaptations dans les boucles sont manifestes. Les trois doigts de la structure forment deux feuillets bêta antiparallèles reliés par deux ponts disulfure croisés dans la séquence. Cette configuration, appelée en anglais *disulfide beta cross* (Harrison et Sternberg, 1996), est observée dans des protéines adoptant un autre type de repliement et ne suffit donc pas à décrire le repliement à trois doigts.



Fig. 1. Comparaison des structures cristallographiques de la toxine alpha de *Naja nigricollis* (à gauche), de la cardiotoxine III de *Naja naja atra* (au centre) et du domaine extracellulaire du récepteur du facteur de croissance transformant bêta de type II humain (à droite) (codes PDB : 1IQ9, 1H0J et 1M9Z, respectivement).

Fig. 1. Comparison of the crystallographic structures of toxin alpha from *Naja nigricollis* (left), cardiotoxin III from *Naja naja atra* (center) and the extracellular domain of human TGF beta type II receptor (right) (PDB codes : 1IQ9, 1H0J and 1M9Z, respectively).

Dans le but d'obtenir une définition plus claire du repliement à trois doigts, les séquences des protéines dont l'analyse de la structure tridimensionnelle a confirmé l'existence d'un repliement à trois doigts, ont été alignées. Cet alignement comprenant 25 séquences de toxines et 11 séquences de récepteurs a montré que les positions des huit cystéines impliquées dans la formation des quatre ponts disulfure et celle d'une asparagine C-terminale, sont strictement conservées (Galat *et al.*, 2008). Il est remarquable que ces résidus soient strictement conservés dans des protéines dont la similarité de séquence est très faible (chacune des séquences de récepteurs a une similarité de séquence avec la toxine alpha inférieure à 25%). Cela indique que ces neuf acides aminés jouent un rôle prépondérant dans la structuration des protéines à trois doigts.

Par ailleurs, l'analyse des structures connues de protéines à trois doigts a montré que trois des ponts conservés, ainsi que l'asparagine C-terminale, ont une position spatiale fixe et forment un motif retrouvé dans l'ensemble de ces molécules (Galat *et al.*, 2008). En

revanche, le quatrième pont, dont le rôle structural est de fermer la troisième boucle, présente une localisation spatiale variable par rapport au motif conservé. Le motif structural représenté par les trois ponts et l'asparagine C-terminale organisés dans une configuration spatiale définie semble constituer les éléments de structuration suffisant pour définir la structure à trois doigts. La question est donc de savoir si la conservation de ces éléments structuraux implique une conservation du mécanisme par lequel ces protéines se replient.

Mécanismes de repliement des toxines à trois doigts

D'une manière générale, il est intéressant d'étudier le repliement des protéines réticulées par des ponts disulfure, car l'oxydation de leurs cystéines en cystines génère des intermédiaires métastables dont le réseau de ponts disulfure est incomplet ; il est possible de bloquer et de purifier ces intermédiaires. La caractérisation physicochimique de ces derniers fournit des

informations quant aux étapes franchies par la protéine lors de son repliement. Dans la famille des protéines à trois doigts, les mécanismes de repliement de deux toxines ont été étudiées : celui de la toxine α de *Naja nigricollis* et celui de la cardiotoxine III de *Naja naja atra* (Ruoppolo *et al.*, 2001 ; Chang *et al.*, 1998, 2006).

Repliement des neurotoxines

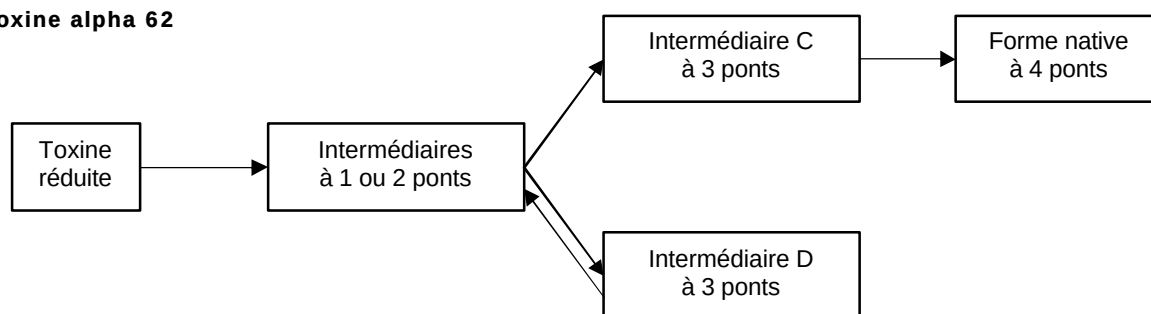
L'étude du repliement oxydant de différentes neurotoxines (Ruoppolo *et al.*, 1998) a montré que la vitesse de repliement dépend de la longueur de la boucle reliant les deux premiers doigts de la molécule (voir Figure 1, boucle située au sommet des structures présentées). D'après cette étude, plus cette boucle est petite et plus la vitesse de repliement du variant correspondant est grande. Le mécanisme de repliement d'un mutant de la toxine alpha de *Naja nigricollis* possédant un résidu supplémentaire (Tx alpha 62) a aussi été détaillé (Ruoppolo *et al.*, 2001) : deux intermédiaires à trois ponts natifs mais dont le pont manquant diffère, se forment majoritairement. Ces intermédiaires ont été purifiés, et l'étude de leur repliement a montré qu'un de ces intermédiaires (appelé C) est productif, c'est-à-dire qu'il peut générer directement de la protéine native (Figure 2). A l'inverse, l'autre intermédiaire (appelé D) est une

impasse dans le chemin de repliement, car pour générer de la toxine native, il doit d'abord se transformer en intermédiaire C. Enfin, l'étape limitante de la cinétique de repliement de la toxine alpha 62 est la conversion de la forme C vers la forme native. De manière remarquable, le pont manquant de l'intermédiaire C est celui dont la position spatiale est variable au sein de la famille des protéines à trois doigts. Cela suggère que ce pont n'est pas indispensable à l'acquisition de cette structure mais qu'il assume plutôt un rôle stabilisateur.

Repliement de la cardiotoxine III

L'étude du repliement de la cardiotoxine III de *Naja naja atra* a montré que cette toxine se replie selon un mécanisme différent de celui de la toxine alpha (Chang *et al.*, 1998 et 2006). En effet, un massif d'intermédiaires possédant un nombre variable de ponts disulfure apparaît, aucun de ces intermédiaires n'étant majoritaire. De plus, lors de son repliement oxydant, cette protéine produit une quantité importante de formes à quatre ponts, donc complètement oxydées, mais dont l'activité est nulle. D'après le mécanisme proposé par Chang *et al.* (2006), la conversion de ces intermédiaires à quatre ponts non natifs en la forme native constitue l'étape finale du repliement (Figure 2).

Toxine alpha 62



Cardiotoxine III



Fig. 2. Comparaison des mécanismes de repliement oxydant de la toxine alpha 62 (en haut) et de la cardiotoxine III (en bas), adapté de Ruoppolo *et al.* (2001) et Chang *et al.* (2006).

Fig. 2. Comparison of the flow charts of the oxidative folding pathways of toxin alpha 62 (top) and cardiotoxin III (bottom), adapted from Ruoppolo *et al.* (2001) and Chang *et al.* (2006).

Comparaison des deux mécanismes

Deux modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme de repliement des protéines (Daggett et Fersht, 2003). Le modèle « framework » propose que dans les premières étapes, des structures secondaires locales apparaissent, puis que dans un deuxième temps, ces structures s'associent de manière hiérarchique pour générer la protéine native. A l'inverse, dans le modèle « hydrophobic collapse », la première étape est un effondrement désordonné de la molécule sur elle-même provoqué par des interactions hydrophobes, suivi d'un réarrangement dans un espace confiné.

Dans leur revue sur le repliement des petites protéines à ponts disulfure, Arolas *et al.* (2006) proposent une classification de ces protéines en fonction du type de mécanisme de repliement. Deux classes principales sont proposées : les protéines se repliant selon un mécanisme de type BPTI d'une part,

et les protéines dont le repliement est similaire à celui de l'hirudine d'autre part. D'après ces auteurs, la première classe s'apparenterait au modèle « framework » alors que la seconde serait plus proche du modèle « hydrophobic collapse ». Les résultats obtenus lors de l'étude du repliement oxydant de la toxine alpha 62 et de la cardiotoxine III montrent que la première appartient à la classe de type BPTI (Arolas *et al.*, 2006) et la seconde à la classe de type hirudine (Chang *et al.*, 2006), alors que ces deux protéines partagent des similitudes structurales. Dans le cas de la cardiotoxine III, il est possible que la présence de nombreux résidus hydrophobes nécessaires à la réalisation de la fonction, conduite à un repliement de type « hydrophobic collapse ».

Conclusion

Alors même que les toxines à trois doigts partagent de

nombreux éléments de structure, les études du repliement oxydant de deux d'entre elles montrent qu'elles acquièrent leur structure *in vitro* selon des mécanismes différents. Le même type d'analyse a été effectué pour l'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine (BPTI) et le peptide anticoagulant de tique (TAP), qui font partie d'une même famille structurale. Comme pour les toxines à trois doigts, leurs mécanismes de repliement oxydant se sont avérés différents (Chang et Li, 2005). Une disparité dans les mécanismes de repliement au sein d'une même famille structurale ne semble donc pas exceptionnelle.

Cependant, notre connaissance du repliement des protéines reste fragmentaire et repose uniquement sur des expériences menées *in vitro*. Il est possible qu'*in vivo* la situation soit différente. L'influence des protéines chaperons qui agissent sur le repliement, par exemple, reste encore mal définie. En outre, plusieurs études ont suggéré que les protéines commencent à se replier, alors que leur synthèse n'est pas terminée (Fedorov et Baldwin, 1997 ; Basharov, 2003). Dans ce cas, le repliement de la protéine commence dans la partie N-terminale pendant que la partie C-terminale est encore liée au ribosome, on parle alors de vectorisation du repliement. Des études *in vivo* sont donc indispensables pour apprécier la réalité de la diversité des mécanismes de repliement pour des protéines structuralement proches mais séquentiellement divergentes.

Références bibliographiques

- Adermann K., Wattler F., Heine G., Meyer M., Forssmann W.G., Nehls M. (1999) Structural and phylogenetic characterization of human SLURP-1, the first secreted mammalian member of the Ly-6/uPAR protein superfamily. *Protein Sci.* 8:810-9.
- Arolas J.L., Aviles F.X., Chang J.-Y., Ventura S. (2006) Folding of small disulfide-rich proteins : clarifying the puzzle. *Trends Biochem. Sci.* 31:292-301.
- Basharov M.A. (2003) Protein folding. *J. Cell. Moll. Med.* 7:223-37.
- Banerjee Y., Mizuguchi J., Iwanaga S., Kini R.M. (2005) Hemextin AB complex, a unique anticoagulant protein complex from *Hemachatus haemachatus* (African Ringhals cobra) venom that inhibits clot initiation and factor VIIa activity. *J. Biol. Chem.* 280:42601-11.
- Chang J.-Y., Kumar T.K.S., Yu C. (1998) Unfolding and refolding of cardiotoxin III elucidated by reversible conversion of the native and scrambled species *Biochemistry* 37:6745-51.
- Chang J.-Y., Li L. (2005) Divergent folding pathways of two homologous proteins, BPTI and tick anticoagulant peptide: compartmentalization of folding intermediates and identification of kinetic traps. *Arch. Biochem. Biophys.* 437:85-95.
- Chang J.-Y., Lu B.-Y., Lin C.C.-J., Yu C. (2006) Fully oxidized scrambled isomers are essential and predominant folding intermediates of cardiotoxin-III. *FEBS Lett.* 580:656-60.
- Christopoulos A., Kenakin T. (2002) G protein-coupled receptor allostery and complexing. *Pharmacol. Rev.* 54:323-74.
- Daggett V., Fersht A.R. (2003) G Is there a unifying mechanism for protein folding ? *Trends Biochem. Sci.* 28:18-25.
- De Weille J.R., Schweitz H., Maes P., Tartar A., Lazdunski M. (1991) Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:2437-40.
- Ellis J. (1997) Allosteric binding sites on muscarinic receptors. *Drug Dev. Res.* 40:193-204.
- Fedorov A.N., Baldwin T.O. (1997) Cotranslational protein folding *J. Biol. Chem.* 272:32715-8.
- Galat A., Gross G., Drevet P., Sato A., Ménez A. (2008) Conserved structural determinants in three-fingered protein domain. *FEBS J.* 275:3207-25.
- Harrison P.M., Sternberg M.J. (1996) The disulphide beta-cross: from cystine geometry and clustering to classification of small disulphide-rich protein folds. *J. Mol. Biol.* 264:603-23.
- Karlsson E., Mbugua P.M., Rodriguez-Ithurralde D. (1984) Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps*. *J. Physiol. (Paris)* 79:232-40.
- Kumar T.K., Jayaraman G., Lee C.S., Arunkumar A.I., Sivaraman T., Samuel D., Yu C., (1997) Snake venom cardiotoxins – structure, dynamics, function and folding *J. Biomol. Struct. Dyn.* 15:431-63.
- Miwa J.M., Stevens T.R., King S.L., Caldarone B.J., Ibanez-Tallon I., Xiao C., Fitzsmonds R.M., Pavlides C., Lester H.A., Picciotto M.R., Heintz N. (2006) The prototoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival *in vivo*. *Neuron* 51:587-600.
- Narayan M., Xu G., Ripoll D.R., Zhai H., Breuker K., Wanjalla C., Leung H.J., Navon A., Welker E., McLafferty F.W., Scheraga H.A. (2004) Dissimilarity in the reductive unfolding pathways of two ribonuclease homologues. *J. Mol. Biol.* 338:795-809.
- Nirathanan S., Gwee M.C.E (2004) Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *J. Pharmacol. Sci.* 94:1-17.
- Rahman S., Flynn G., Aitken A., Patel Y., Hussain F., Lu X., Loftus J.C., French D., Wijelath E., Strand K., Savidge G.F. (2000) Differential recognition of snake venom proteins expressing specific arg-gly-aspartate (RGD) sequence motifs by wild-type and variant integrin alpha1b-beta3 : further evidence for distinct sites of RGD ligand recognition exhibiting negative allostery. *Biochem. J.* 345:701-9.
- Ruoppolo M., Moutiez M., Mazzeo M.F., Pucci P., Ménez A., Marino G., Quéméneur E. (1998) The length of a single turn controls the overall folding rate of "three-fingered" snake toxins. *Biochemistry* 37:16060-8.
- Ruoppolo M., Talamo F., Pucci P., Moutiez M., Quéméneur E., Ménez A., Marino G. (2001) Slow folding of three-fingered toxins is associated with the accumulation of native disulfide bonded intermediates. *Biochemistry* 40:15257-66.
- Servent D., Ménez A. (2001) Snake neurotoxins that interact with nicotinic acetylcholine receptors. In: Massaro E.J. (Ed.), *Handbook of neurotoxicology*, Humana press inc., Totowa, pp. 385-425.
- Tsetlin V. (1999) Snake venom alpha-neurotoxins and other "three-finger" proteins. *Eur. J. Biochem.* 264:281-6.
- Yasuda O., Morimoto S., Jiang B., Kuroda H., Kiruma T., Sakakibara S., Fukuo K., Chen S., Tamatani M., Ogihara T. (1994) FS2 a mamba venom toxin, is a specific blocker of the L-type calcium channels. *Artery* 21:287-302.

La toxine MT7 : un outil de choix dans l'étude pharmacologique du récepteur muscarinique M1

Carole FRUCHART-GAILLARD, Gilles MOURIER, Denis SERVENT*

CEA, iBiTecS, Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO), Gif-sur-Yvette, 91191, France.

* Auteur correspondant ; Tél : 01 69 08 52 02 ; Fax : 01 69 08 90 71 ; Courriel : denis.servent@cea.fr

Cet article est dédié à la mémoire d'André Ménez

Résumé

Les toxines muscariniques, petits peptides de 64-65 résidus issus du venin de mambas africains, sont connues pour leur capacité à interagir avec les différents sous-types de récepteurs muscariniques. Actuellement, une dizaine de toxines muscariniques ont été isolées. Elles présentent des profils pharmacologiques et des fonctions différentes vis-à-vis des cinq sous-types de récepteurs muscariniques et ce, en dépit d'une très forte homologie de séquence. La toxine MT7, purifiée à partir du venin de mamba vert *Dendroaspis angusticeps*, lie le récepteur muscarinique hM1 avec une affinité de l'ordre du picomolaire, une affinité qui est au moins 10.000 fois plus élevée que pour les autres sous-types de récepteurs muscariniques. Une étude pharmacologique et fonctionnelle de l'interaction MT7-hM1 a permis de comprendre les fonctions attribuées à la MT7. Elle inhibe la liaison du [³⁵S]GTPγS stimulé par l'ACh au récepteur hM1 exprimé dans des cellules CHO ; elle bloque l'interaction entre la [³H]NMS et le récepteur durant plusieurs heures et a un fort effet modulateur sur la dissociation de la [³H]NMS et [³H]ACh induit par un excès d'atropine. En résumé, la toxine MT7 agit comme un antagoniste hautement sélectif du récepteur muscarinique M1 en établissant une interaction forte et stable au niveau de son site allostérique. Ainsi, la MT7 semble être un outil indispensable pour étudier pharmacologiquement le récepteur hM1, sa distribution, sa physiologie et ses relations structure-fonction.

MT7 toxin : a useful tool in the pharmacological characterization of the muscarinic M1 receptor

Muscarinic neurotoxins, small peptides of 64-66 residues derived from the venom of African mambas, are known for their ability to interact with various muscarinic receptor subtypes. Currently about ten different muscarinic toxins with clear differences in their pharmacological and functional activities have been isolated. They show divergent interaction profiles for the five muscarinic receptor subtypes despite high sequence homology. For instance, MT7 toxin purified from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps*, binds to the hM₁ receptor subtype with potency in the picomolar range, an affinity at least 10,000-fold greater than for other receptor subtypes. Pharmacological and functional studies on the MT7-hM₁ interaction have extended the range of activities attributed to MT7. It inhibits the ACh-stimulated [³⁵S]GTPγS binding to M₁ receptor expressed in CHO cells, blocks the subsequent interaction of [³H]NMS with this receptor for several hours, and has a strong modulatory effect on the atropine-induced dissociation rate of [³H]NMS and [³H]ACh. In summary, MT7 acts as a highly selective antagonist of the M₁ receptor subtype by establishing a strong and stable interaction at its allosteric binding site. Thus, MT7 toxin appears to be invaluable tools to study receptor pharmacology, distribution, physiology and structure-function relationship.

Key-words : Muscarinic receptors, muscarinic toxins, allosteric interaction.

Les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine

Les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (mAChR) appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui comprend plusieurs milliers de membres et représente à elle seule de l'ordre de 2 à 3% de l'ensemble des gènes du génome des Mammifères. Ces récepteurs jouent un rôle prépondérant dans la pharmacopée actuelle puisque près de 50% des médicaments aujourd'hui disponibles sur le marché exercent leur action *via* cette superfamille.

Malgré la diversité des molécules pouvant se lier aux

RCPG (photon, ions, amines, peptides et protéines), le mode de fonctionnement de ces récepteurs est identique et est à l'origine de leur appellation. La fixation du ligand sur le RCPG induit des changements conformationnels de ce récepteur qui peut alors s'associer à une classe particulière de protéines trimériques intracellulaires, les protéines G (Gα, Gβ, Gγ). Celles-ci vont activer ou inhiber des effecteurs intracellulaires multiples (enzymes, canaux ioniques) engendrant alors une variation de concentration de messagers secondaires (AMPc, GMPc, IP₃, Ca²⁺) à l'origine des effets biologiques (Bockaert *et al.*, 1999).

La résolution de la structure cristallographique de la rhodopsine bovine (Palczewski *et al.*, 2000 ; Teller *et al.*,

2001), et très récemment de celle du récepteur β_2 adrénergique (Cherezov *et al.*, 2007 ; Rasmussen *et al.*, 2007 ; Rosenbaum *et al.*, 2007), a montré que les RCPG se caractérisent par sept hélices transmembranaires (TM), trois boucles (e1, e2 et e3) et l'extrémité N-terminale du côté extracellulaire et trois boucles (i1, i2 et i3) et l'extrémité C-terminale du côté cytoplasmique (Figure 1). Suivant les homologies de séquences, la taille du domaine N-terminal et la présence de séquence consensus, les RCPG sont classés en trois familles : 1, 2 et 3. Pendant longtemps, les RCPG ont été considérés comme des protéines monomériques répondant à une stœchiométrie d'un ligand par récepteur, lui-même couplé à une protéine G. Cependant, de nombreux travaux publiés au cours de ces dernières années semblent remettre en question ce dogme et proposent que ces récepteurs existent sous une forme oligomérique, principalement dimérique. Cette dimérisation jouerait alors un rôle dans les processus d'exportation, de liaison, de signalisation et d'internalisation de ces récepteurs (Bulenger *et al.*, 2005).

Les RCPG présentent deux types de sites de liaison des ligands : le site de liaison de l'agoniste endogène ou des antagonistes compétitifs, appelé site orthostérique et des sites capables de lier des ligands modulateurs de l'activité biologique des récepteurs, appelés sites allostériques (Tucek *et al.*, 1995 ; Christopoulos *et al.*, 2002). On parlera d'interaction allostérique lorsque la liaison d'un ligand à un site du récepteur entraîne la modulation de la liaison d'un autre ligand à un site topographiquement distinct sur ce même récepteur.

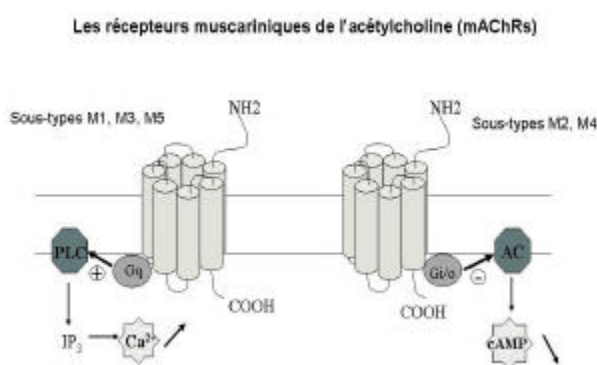


Fig. 1. Classification des différents sous-types de mAChR en fonction du mode de couplage aux protéines G, de l'effecteur intracellulaire mis en jeu et du second messager impliqué.

Fig. 1. Classification of mAChR subtypes according to the pathway associated to coupled G-proteins, to intracellular effectors, and to the second messenger involved.

Les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (mAChR) sont des récepteurs métabotropes dont cinq sous-types sont connus : M1, M2, M3, M4 et M5. Les récepteurs M1, M3 et M5 sont couplés à la protéine Gq et leur activation provoquera celle de la phospholipase C conduisant au final à la libération de calcium intracellulaire. L'activation des sous-types M2 et M4 conduira à l'inhibition de l'adénylate cyclase, provoquant une baisse du taux d'AMPc circulant (Caulfield, 1993 ; Caulfield *et al.*, 1998) (Figure 1). Les mAChR sont largement distribués dans l'organisme, au niveau du système nerveux central ainsi qu'au niveau du système parasympathique contrôlant le tonus musculaire de nombreux organes (cœur, poumon, vessie, intestin). Ils sont impliqués dans une grande variété de processus physiologiques et leur dysfonctionnement est à l'origine de nombreuses pathologies (Eglen *et al.*, 1999, 2001 ;

Tableau 1). Le récepteur muscarinique M1, par exemple, présente majoritairement au niveau post-synaptique dans le système nerveux central, est impliqué dans des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (Felder *et al.*, 2000 ; Fisher, 2000 ; Vamvakides, 2003).

Tableau 1. Principales localisations et pathologies associées aux différents sous-types de mAChR.

Table 1. Localisations and pathologies associated to mAChR subtypes.

mAChR	Localisation majoritaire	Pathologies associées
M1	Cortex cérébral, hippocampe, striatum	Alzheimer, Parkinson, schizophrénie
M2	Cortex cérébral, cœur	Alzheimer, troubles du rythme cardiaque
M3	Poumons, intestins, organes génitaux et glandes salivaires	Troubles pulmonaires et gastriques, incontinence urinaire
M4	Cortex cérébral, striatum	Alzheimer, Parkinson, schizophrénie
M5	Substance noire	Phénomène de dépendance

Au niveau structural, le récepteur muscarinique M1 appartient à la famille 1a des RCPG, caractérisée par un domaine extracellulaire court, un pont disulfure entre le TM3 et la boucle e2, un site orthostérique situé au cœur des domaines transmembranaires et impliquant des acides aminés chargés et aromatiques conservés et enfin une séquence signature DRY dans la boucle i2.

Les différents sous-types de récepteurs muscariniques sont impliqués dans la régulation de processus physiologiques variés. Cependant, l'identification d'un sous-type de récepteur muscarinique spécifiquement mis en jeu dans une réponse cholinergique donnée n'est pas toujours possible et aisée. En effet, la présence fréquente de différents sous-types au niveau d'un même organe et surtout l'absence de ligands de petite taille spécifique d'un seul sous-type rend cette identification parfois complexe. En réalité, les seuls ligands naturels ayant montré de fortes affinités et parfois une très forte spécificité vis-à-vis des récepteurs muscariniques sont les toxines peptidiques découvertes dans le venin de serpents africains du genre *Dendroaspis*.

Les toxines muscariniques

Découvertes il y a vingt ans par le groupe d'E. Karlsson, les toxines muscariniques doivent leur nom à leur capacité à inhiber la liaison d'un antagoniste spécifique de cette famille de récepteurs, le [3H]-QNB, sur des membranes synaptosomales de cortex de rat (Adem *et al.*, 1988). Les deux premières toxines identifiées (MT1 et MT2), comme la douzaine qui a suivi, ont toutes été isolées à partir du venin d'un serpent du genre *Dendroaspis* et plus particulièrement des espèces *D. angusticeps*, *D. polylepis* ou *D. viridis*. Néanmoins une faible activité anti-muscarinique a été décrite dans le venin d'Elapidae du type *Naja naja sputatrix* (Miyoshi *et al.*, 1996) ou *Naja kaouthia* (Kukhtina *et al.*, 2000). La dénomination de ces toxines varie suivant qu'elles aient été identifiées par le groupe d'E. Karlsson qui les nomme en fonction de leur ordre de découverte et l'origine du venin MT1, MT2 jusqu'à MT7 pour les toxines du mamba vert et MT α , MT β ... pour les toxines du mamba noir ou par le groupe de L. Potter qui relie le nom des toxines à leurs sélectivités d'interaction (m1-toxine pour la toxine MT7 spécifique du récepteur M1 ou m4-toxine pour la toxine MT3 spécifique du récepteur M4) (Bradley, 2000 ; Karlsson *et al.*, 2000). On peut noter que plusieurs isoformes de m1-toxines ont été isolées à partir du venin de *D. angusticeps* (m1-toxin1 à m1-toxin4) possédant des séquences extrêmement proches et des profils

pharmacologiques identiques (Carsi *et al.*, 2000).

Dendroaspis angusticeps

```

1      10      20      30      40      50      60
MT1  LTCVTSKSI FGITTENC PDGQNL CFKWKYYIVPRYS DITWGAATCPKPTNVRETIHCCETDKCNE
MT2  LTCVTTKSIGVTTEDCPAGQNVCFKRWHYVTPKNYDIIGCAATCPKVDN-NDPIRCCGTDKDCND
MT3  LTCVTNTIFGITTENC PDGQNL CFKWKYYIVPRYS DITWGAATCPKIPEN-YDSIHCCETDKCNE
MT4  LTCVTSKSI FGITTENC PDGQNL CFKWKYYIVPRYS DITWGAATCPKPTNVRETIHCCETDKCNE
MT5  LTCVTSKSI FGITTENC PDGQNL CFKWKYYIVPRYS DITWGAATCPKIPEN-YDSIHCCETDKCNE
MT7  LTCVKSNSIWFPTSEDCPDGQNL CFKRWQYISPRYDFTRGCAATCPKAEY-RDVINCCGTDKCNK

```

Dendroaspis polylepsis

```

MTa  LTCVTSKSI FGITTENC PDGQNL CFKWKYYLNHRYSDITWGAATCPKPTNVRETIHCCETDKCNE
MTb  LTCVTSKSI FGITTENC PDGQNL CFKRRHYVVPKIYDITRGVATCPKIPEN-YDSIHCCETDKCNE

```

Séquence consensus

LTCV---I---T-E-CP-GQN-CFK---Y-----GC-ATCP-----I-CC-TDKCN-

Fig. 2. Alignement de séquences des principales toxines muscariniques et séquence consensus conservée.

Fig. 2. Sequence alignment of muscarinic toxins and consensus toxin sequence.

Les toxines muscariniques sont des peptides de 65 ou 66 résidus, d'environ 7.000 Da de poids moléculaire et possédant une séquence consensus hautement conservée représentant près de 45% de la séquence totale (Figure 2). Ces toxines possèdent huit cystéines appariées en quatre ponts disulfure (Cys3-Cys24, Cys17-Cys42, Cys46-Cys57 et Cys58-Cys63) participant à la formation d'une structure dite à trois doigts, caractéristique de nombreuses neurotoxines. Ce type de structure est largement répandu dans les toxines de 60-70 résidus et est caractérisé par trois boucles riches en feuillettes β qui émergent d'un cœur hydrophobe où sont localisés les ponts disulfure (Figure 3).

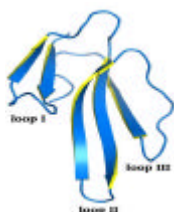


Fig. 3. Structure à trois doigts des toxines muscariniques.

Fig. 3. Three finger structure of muscarinic toxins.

Ces toxines, de structure 3D très proches, interagissent cependant sur une grande diversité de cibles moléculaires : récepteurs nicotiniques et muscariniques de l'acétylcholine, acétylcholinestérase, récepteurs adrénergiques, canal calcique, récepteur intégrine Gp11b11a, membranes cellulaires (Nirathanan *et al.*, 2004 ; Servent, 2007). Il est intéressant de noter que cette structure à trois doigts n'est pas restreinte aux toxines mais est aussi largement présente chez les Mammifères (famille Ly6-uPaR). Des « toxines endogènes » interviennent par exemple comme modulateur de la fonction cholinergique au niveau du système nerveux central et périphérique. Deux structures 3D de toxines muscariniques ont été résolues, celle de la MT2 (Segalas *et al.*, 1995) et plus récemment celle d'un dérivé de la MT7 (E. Stura ; pdb:2vlw) permettant de mettre en évidence la conservation de la structure globale de ces toxines et les variations locales à l'extrémité des boucles pouvant être à l'origine de leurs différents profils pharmacologiques.

Etude pharmacologique

Sources de récepteurs muscariniques

Les études de liaison de ligands radioactifs sont probablement les études les plus simples pour déterminer

l'affinité d'un composé inconnu pour un récepteur particulier. A la fin des années 80, la capacité de liaison des toxines muscariniques sur les récepteurs muscariniques a débuté avec des préparations membranaires de synaptosomes de cerveau de rat, de bœuf et de porc (Bradley, 2000). Cependant, l'utilisation de préparation membranaire de cerveau ne permet pas d'évaluer l'affinité d'un ligand pour un sous-type particulier de récepteur muscarinique, car ils sont tous présents dans ces préparations. Néanmoins, ces premières études ont permis de mettre en évidence que les toxines muscariniques sont capables de déplacer la liaison spécifique d'agoniste (oxotrémorine : Jerusalinsky *et al.*, 1992) ou d'antagonistes radio marqués spécifiques des récepteurs muscariniques (QNB : Adem *et al.*, 1988 ; Waelbroeck *et al.*, 1990 ; Jerusalinsky *et al.*, 1992); pirenzépine et NMS: Jolkkonen *et al.*, 1995b). L'étude de la sélectivité de ces toxines pour les différents sous-types de récepteurs n'a réellement débuté qu'avec l'utilisation de préparations membranaires de différentes parties du cerveau et de tissus périphériques. Il a été montré que les toxines MT1 et MT2 présentent une forte affinité pour les récepteurs muscariniques présents dans l'hippocampe (M1), le cortex (M1 et M4) et le striatum (M4) alors qu'elles n'interagissent pas avec les récepteurs muscariniques M3 présents dans le pancréas (Jerusalinsky *et al.*, 1997).

Ce n'est qu'avec l'utilisation de récepteurs muscariniques clonés et exprimés dans des cellules Chinese Hamster Ovary (CHO) (Bonner *et al.*, 1987) que les constantes d'affinités des toxines muscariniques pour les cinq sous-types de récepteurs muscariniques ont pu être précisées (Bradley, 2000 ; Tableau 2).

Tableau 2. Constantes d'inhibitions issues des expériences de liaison sur récepteurs muscariniques clonés.

Table 2. Inhibition constants obtained from binding experiments on cloned muscarinic receptors.

mAChR	Toxines muscariniques				
	MT1	MT2	MT3	MT4	MT7
M1	25 nM ^a	364 nM ^b	78-250 nM ^c	62 nM ^c	14 pM ^a
M2	* ^b	* ^b	>1 μ M ^c	>1 μ M ^c	>10 μ M ^a
M3	* ^b	* ^b	>1 μ M ^c	>1 μ M ^c	>10 μ M ^a
M4	72 nM ^b	1.2 μ M ^b	2 nM ^c	87 nM ^c	>10 μ M ^a
M5	>260 nM ^b	30 μ M ^b	>1 μ M ^c	>1 μ M ^c	>10 μ M ^a

a : Mourier, 2003 et Fruchart-Gaillard, 2006.

b : Harvey, 2002.

c : Bradley, 2000.

* : pas de liaison

Cette source de récepteurs a également permis d'identifier de nouvelles toxines, telle que la MT7, présente en très faible quantité dans le venin de mamba (Max *et al.*, 1993a). La toxine MT7 est un antagoniste de haute affinité et très sélectif du sous type de récepteur muscarinique M1 (Jolkkonen *et al.*, 1995a). Cette toxine semble se lier de façon quasi-irréversible et de façon non compétitive au récepteur M1 (Max *et al.*, 1993b) sur un site allostérique (Olianas *et al.*, 2000) distinct du site orthostérique. D'autres études ont ensuite confirmé ces observations. En effet, la toxine MT7 est capable de ralentir la cinétique de dissociation d'antagonistes compétitifs (NMS) alors qu'elle accélère la cinétique de dissociation des agonistes (ACh) du récepteur muscarinique M1 (Olianas *et al.*, 2000 ; Krajewski *et al.*, 2001 ; Mourier *et al.*, 2003 ; Olianas *et al.*, 2004). Une telle toxine a donc un mode d'action différent sur le récepteur muscarinique M1, qu'il soit libre, occupé par un agoniste ou un antagoniste compétitif.

Un tel ligand est qualifié de modulateur allostérique, c'est-à-dire qu'il est capable de se lier à son récepteur en reconnaissant un site topographiquement distinct du site

orthostérique et ainsi moduler la liaison du ligand orthostérique à son site, et réciproquement. On parle alors de complexe ternaire (Tucek *et al.*, 1995 ; Birdsall *et al.*, 2001 ; Christopoulos *et al.*, 2002).

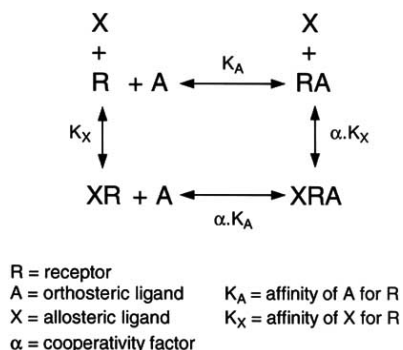


Fig. 4. Modèle du complexe ternaire (Birdsall *et al.*, 2005).

Fig. 4. Ternary complex model (Birdsall *et al.*, 2005).

Dans ce modèle ternaire, le ligand orthostérique A et le modulateur allostérique X se fixent chacun à leur site respectif sur le récepteur libre avec des constantes d'affinité respectives K_A et K_X . La modulation allostérique survient entre les deux ligands lorsque leur liaison au récepteur se fait de façon concomitante. A l'équilibre, le facteur de coopérativité α caractérise la puissance avec laquelle les deux ligands sont capables d'affecter chacun la liaison de l'autre au récepteur. D'après ce modèle, un $\alpha > 1$ décrit une coopérativité positive, un $\alpha < 1$ décrit une coopérativité négative et un $\alpha = 1$ décrit une coopérativité neutre.

Obtention des toxines muscariniques

La source originale des toxines muscariniques demeure le venin de différentes espèces de mamba africain essentiellement le mamba vert *Dendroaspis angusticeps* et le mamba noir *Dendroaspis polylepis*. Ces différentes toxines représentent 0,5 à 1% du venin, et on a pu estimer à 100 - 180 μ g la quantité totale de toxine MT7 obtenue après purification d'un gramme de venin (Carsi *et al.*, 2000 ; Max *et al.*, 1993a). De toute évidence, ces quantités sont bien souvent insuffisantes pour permettre une caractérisation fonctionnelle complète de chacune d'entre elles. C'est pourquoi de nombreux laboratoires ont essayé de les produire par voie recombinante ou encore par synthèse chimique. Ainsi la toxine MT7 a été produite dans des cellules d'insectes Sf9 infectées par un vecteur de type baculovirus (Nasman *et al.*, 2000) ou encore chez la levure *Pischia pastoris* (Krajewski *et al.*, 2001) avec respectivement un rendement maximal de production de 0,9 mg et 0,15 mg de toxine par litre de culture. Simultanément, différents laboratoires de synthèse chimique ont réussi à produire différentes toxines muscariniques, MT7, MT1 et MT3, soit par une approche dite convergente par assemblage de fragments peptidiques (Nishiuchi *et al.*, 2000), soit en une seule étape sur support solide et repliement *in vitro* (Mourier *et al.*, 2003) selon un protocole appliqué avec succès pour des toxines nicotiques de même taille et présentant le même motif structural à trois doigts (Mourier *et al.*, 2000). A ce jour, l'approche chimique demeure la plus pertinente pour l'obtention de plusieurs milligrammes de toxine nécessaires à la caractérisation pharmacologique des toxines mais également pour la production de toxines modifiées (Fruchart-Gaillard *et al.*, sous presse),

radioactives (Fruchart-Gaillard *et al.*, 2006) ou encore fluorescentes (Minic *et al.*, 2002).

Marquage des toxines muscariniques

Les toxines MT1, MT2 et MT3 ont été radio-marquées avec ^{125} I avec succès par plusieurs groupes (Jerusalinsky *et al.*, 1992 ; Jolkkonen *et al.*, 1995a ; Waelbroeck *et al.*, 1996 ; Adem *et al.*, 1997). L'obtention de tels traceurs a permis de caractériser pharmacologiquement les affinités de ces toxines pour leurs cibles respectives. En ce qui concerne la toxine MT7, les premiers essais de radio-marquage ne furent pas concluants, l'introduction d'un atome radioactif au sein de cette toxine altérant sa capacité de liaison à son récepteur. En 2006, l'utilisation d'une méthode d'iodation à la lactoperoxydase a permis d'obtenir le premier traceur peptidique allostérique hautement sélectif d'un sous-type de récepteur muscarinique (hM1) (Fruchart-Gaillard *et al.*, 2006). Le dérivé mono-iodé oxydé au niveau de la méthionine 35 rend cette toxine réversible comparée à la toxine native et peut ainsi être utilisé comme traceur pour les études pharmacologiques. L'affinité de la ^{125} I-MT7ox a été caractérisée par des expériences de liaison en cinétique (Kon et Koff) et à l'équilibre (Kd) sur le récepteur hM1 libre (Figure 5a) et sur le récepteur hM1 occupé par 1 μ M de NMS (Figure 5b). Ces expériences ont été réalisées sur des membranes CHO exprimant à leur surface le récepteur M1 humain cloné. Ainsi, l'affinité de la MT7 pour le récepteur libre est de $14,3 \pm 3,1$ pM avec un $B_{\max}$ de $15,1 \pm 2,8$ pmol/mg de protéine et de $0,92 \pm 0,02$ nM avec un $B_{\max}$ de $10,6 \pm 1,4$ pmol/mg de protéine pour le récepteur occupé par la NMS. Le facteur de coopérativité déduit de la mesure expérimentale de l'affinité de la toxine mono-iodée sur les deux états du récepteur hM1 est de 0,015, indiquant une coopérativité négative entre la toxine MT7 et la NMS vis-à-vis du récepteur hM1. Un facteur de coopérativité similaire ($\alpha = 0,014$) entre la NMS et la MT7 a été obtenu lorsque ^{3} H-NMS est utilisé comme traceur et que les courbes d'inhibition de liaison du traceur sont traitées avec l'équation du complexe ternaire. Dans ce modèle, l'affinité de la MT7 pour le récepteur libre est de 29 ± 3 pM. Cette valeur est similaire à celle obtenue avec l'utilisation de ^{125} I-MT7ox comme traceur dans les expériences de compétition à l'équilibre.

Ainsi, la similarité des constantes d'affinité et des facteurs de coopérativité concernant la liaison de la MT7 au récepteur hM1 en présence ou non d'un excès de NMS mesurées directement en utilisant ^{125} I-MT7ox ou indirectement avec ^{3} H-NMS, valide le modèle du complexe ternaire et confirme la nature réciproque de cette coopérativité. En outre, la similarité des valeurs de $B_{\max}$ obtenues par des expériences de saturation chaude en utilisant soit ^{125} I-MT7ox ($15,1 \pm 2,8$ pmol/mg), soit ^{3} H-NMS ($16,4 \pm 3,3$ pmol/mg) suggère que le nombre de sites de liaison sur le récepteur hM1 pour la toxine allostérique ou pour le ligand orthostostérique est identique. Cette toxine radio-marquée a également permis de déterminer ou de confirmer l'affinité de ligands orthostériques ou allostériques vis-à-vis du récepteurs hM1.

D'autre part, cette étude a montré que la toxine MT7 se lie à un site allostérique spécifique du récepteur hM1, site qui chevaucherait partiellement celui des ligands allostériques dit « classiques » (gallamine) ou « atypiques » (indolocarbazole).

Site de liaison de la toxine MT7

Une étude exhaustive permettant de délimiter le site de liaison de la toxine MT7 vis-à-vis du récepteur

muscarinique hM1 n'a pas encore été réalisée. Néanmoins, trois mutations de la toxine MT7 ont été effectuées au niveau des résidus P38I, K65E (Krajewski *et al.*, 2001) et R34A (Mourier *et al.*, 2003).

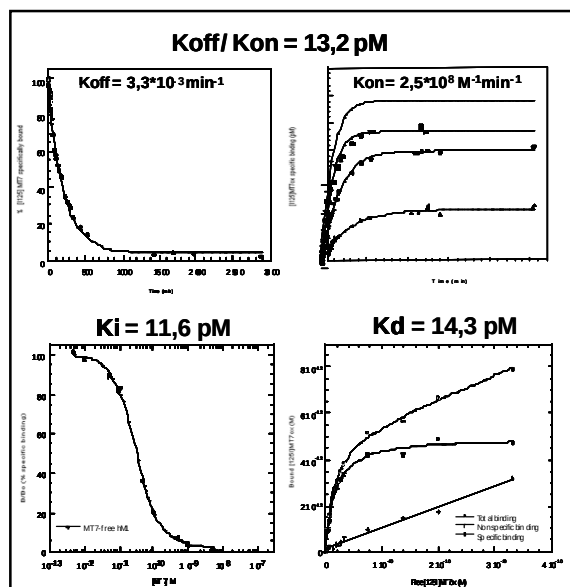


Fig. 5a. Liaison de la toxine ^{125}I MT7ox au récepteur hM1 libre (Fruchart-Gaillard *et al.*, 2006).

Fig. 5a. Kinetics and equilibrium binding experiments of ^{125}I MT7ox on free hM1 receptor (Fruchart-Gaillard *et al.*, 2006).

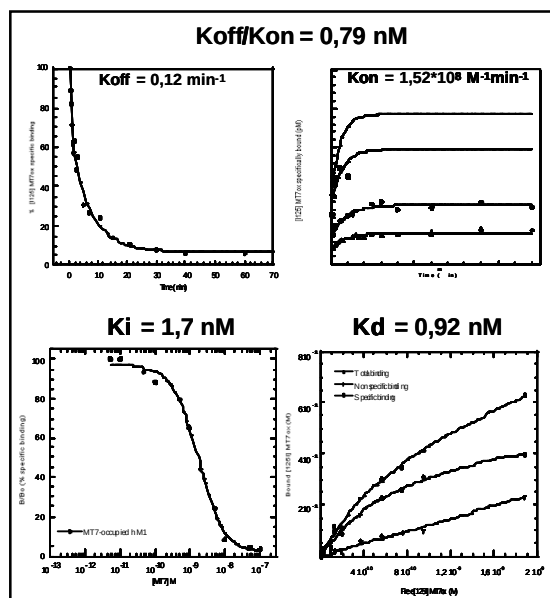


Fig. 5b. Liaison de la toxine ^{125}I MT7ox au récepteur hM1 occupé par $1\mu\text{M}$ de NMS (Fruchart-Gaillard *et al.*, 2006).

Fig. 5b. Kinetic and equilibrium binding experiments of ^{125}I MT7ox on occupied hM1 receptor (Fruchart-Gaillard *et al.*, 2006).

La toxine F38I se lie toujours de façon spécifique au récepteur hM1, mais cette mutation affecte l'irréversibilité de cette liaison. Ainsi, la Phe38 contribuerait à la stabilité du complexe toxine-récepteur mais ne participerait pas à la sélectivité d'interaction de MT7. La mutation K65E n'affecte quant à elle ni la sélectivité ni l'irréversibilité de la liaison de la toxine MT7 au récepteur hM1. Cependant, cette mutation ne permet plus à la toxine de ralentir la

dissociation de la NMS, suggérant que l'extrémité C-terminale jouerait un rôle critique dans la formation du complexe ternaire entre la toxine, la ^3H -NMS et le récepteur hM1. Après modification de l'Arg34 (R34A), la liaison de la toxine au récepteur hM1 devient réversible et une diminution de l'affinité d'un facteur 100 est observée dans les expériences de liaison à l'équilibre. Ce résultat indique l'importance de ce résidu Arg34 situé en bas de la boucle II de la toxine dans la liaison de celle-ci à un récepteur libre. Par ailleurs, la modification de ce résidu provoque une diminution d'un facteur 10 de l'effet de cette toxine sur la dissociation de la ^3H -NMS. Ce résultat est en faveur du rôle de ce résidu chargé dans l'interaction allostérique de la MT7 vis-à-vis d'un récepteur occupé par la NMS.

Etudes fonctionnelles

L'interaction de la toxine MT7 avec le récepteur M1 a été étudiée non seulement par des techniques pharmacologiques permettant d'évaluer directement ses propriétés de liaison, mais aussi à l'aide d'approches fonctionnelles visant à évaluer l'effet agoniste ou antagoniste de la toxine sur les processus d'activation du récepteur. Ces effets peuvent être mesurés à trois niveaux distincts de la cascade d'activation suite à la fixation d'un agoniste (ACh, CCh) : la fixation du GTP sur la protéine G à l'aide de $[\text{S}]$ GTP γS , l'accumulation d'inositol triphosphate avec de l' $[\text{H}]$ -IP3 ou la mesure du relargage de Ca^{2+} intracellulaire en utilisant des sondes fluorescentes appropriées. Ces trois approches ont été utilisées pour étudier l'effet de la toxine MT7, mettant en évidence ses propriétés antagonistes (Max *et al.*, 1993c ; Ollanas *et al.*, 2000) ainsi que pour identifier des zones d'interaction de la toxine sur le récepteur M1 (Kukkonen *et al.*, 2004). Cette dernière étude a permis de démontrer le rôle majeur de la boucle extracellulaire e2 du récepteur dans l'interaction de la MT7. Par ailleurs, des études ont aussi été effectuées sur des préparations musculaires enrichies en certains sous-types de mAChR (vas deferens : M1 ; oreillettes cardiaques ou utérus : M2 ; iléon : M3) afin d'étudier l'effet de certaines toxines, MT1 et MT2 principalement, sur ces préparations. Des propriétés agonistes de ces toxines ont ainsi été suggérées à l'aide de ces expériences (Jerusalinsky *et al.*, 1994, 1995). Concernant la toxine MT7, son effet antagoniste à forte concentration a été décrit sur le muscle anococcygeus de lapin, sensé contenir une forte densité de récepteurs M4 présynaptiques (Gross *et al.*, 1997).

Effet *in vivo*

Dans le but d'exploiter *in vivo* les propriétés uniques de la toxine MT7 en termes de sélectivité et d'affinité, et d'étudier le rôle des récepteurs M1 au niveau du système nerveux central, différentes études ont été conduites pour évaluer l'effet de la MT7 après injection chez l'animal. Par exemple, une approche autoradiographique a montré que l'injection de MT7 dans le striatum du rat provoquait un blocage prolongé des récepteurs muscariniques M1 présents en grande quantité dans cette région, mettant ainsi en évidence la faible implication de ce sous-type de récepteur dans l'activité motrice spontanée (Liang *et al.*, 2001). Par ailleurs, le rôle du striatum dans certaines fonctions cholinergiques a été étudié en suivant l'expression de Fos induite par la pilocarpine. L'implication spécifique du sous-type M1 a été mise en évidence après l'injection stéréotaxique de MT7, confirmant que cette toxine est un outil particulièrement bien adapté à l'étude fonctionnelle de ce récepteur (Wirtshafter, 2006).

Bien qu'appelées toxines, les toxines muscariniques sont des composés de très faible toxicité puisque leur dose létale n'a pas pu être mesurée avec précision (Jerusalinsky *et al.*, 1997), mais semble supérieure à 50 µg/g chez la souris (Joubert, 1985). Du fait de l'implication des récepteurs muscariniques dans un grand nombre de processus physiologiques, l'effet de certaines toxines a été évalué *in vivo* et plus particulièrement dans les processus cognitifs. Le groupe de D. Jerusalinsky a, entre autres, montré un effet cholinomimétique facilitateur des toxines MT1 et MT2, après injection dans la zone dorsale de l'hippocampe, dans des tâches d'apprentissage et de consolidation de la mémoire chez le rat (Jerusalinsky *et al.*, 1993, 1995 ; Harvey *et al.*, 2002). A l'inverse, la toxine MT3 semblerait provoquer une amnésie rétrograde dans ces mêmes tests (Jerusalinsky *et al.*, 1998). La toxine MT7 n'a pas été étudiée par ce type d'approche.

Conclusion

Du fait de ses propriétés pharmacologiques et fonctionnelles uniques en termes de haute affinité et de très grande sélectivité, la toxine MT7 est un outil particulièrement bien adapté à l'étude du récepteur muscarinique M1. Cette toxine a d'ores et déjà permis d'apporter des informations importantes sur la localisation et l'implication fonctionnelle du récepteur M1, entre particulier au niveau de certains processus cognitifs ou pathologiques impliquant la neurotransmission cholinergique centrale, mais aussi au niveau neuro-musculaire où ce récepteur est présent en très faible quantité. D'autre part, la toxine MT7 est à l'heure actuelle le seul ligand allostérique spécifique du récepteur M1, accessible sous forme radiomarquée ou fluorescente, permettant ainsi une étude pharmacologique directe sur ce site d'interaction. Enfin, des études récentes laissent entrevoir que cette toxine pourrait aussi être exploitée pour aborder la question importante du rôle et de la nature de la dimérisation des RCPG et plus particulièrement de celui du récepteur M1.

Références bibliographiques

- Adem A., Asblom A., Johansson G., Mbugua P.M., Karlsson E. (1988) Toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* that inhibit the binding of quinuclidinyl benzilate to muscarinic acetylcholine receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 968:340-5.
- Adem A., Jolkkonen M., Bogdanovic N., Islam A., Karlsson E. (1997) Localization of M1 muscarinic receptors in rat brain using selective muscarinic toxin-1. *Brain Res. Bull.* 44:597-601.
- Birdsall N.J., Lazareno S. (2005) Allosterism at muscarinic receptors: ligands and mechanisms. *Mini Rev. Med. Chem.* 5:523-43.
- Birdsall N.J., Lazareno S., Popham A., Saldanha J. (2001) Multiple allosteric sites on muscarinic receptors. *Life Sci.* 68:2517-24.
- Bockaert J., Pin J-P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18:1723-9.
- Bonner T.I., Buckley N.J., Young A.C., Brann M.R. (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237:527-32.
- Bradley K.N. (2000) Muscarinic toxins from the green mamba. *Pharmacol. Ther.* 85: 87-109.
- Bulenger S., Marullo S., Bouvier M. (2005) Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol. Sci.* 26:131-7.
- Carsi J.M., Potter L.T. (2000) m1-toxin isotoxins from the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*) that selectively block m1 muscarinic receptors. *Toxicon* 38:187-98.
- Caulfield M.P. (1993) Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacol. Ther.* 58(3):319-79.
- Caulfield M.P., Birdsall N.J. (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.* 50:279-90.
- Cherezov V., Rosenbaum D.M., Hanson M.A., Rasmussen S.G., Thian F.S., Kobilka T.S., Choi H.J., Kuhn P., Weis W.I., Kobilka B.K., Stevens R.C. (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318:1258-65.
- Christopoulos A., Kenakin T. (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol. Rev.* 54:323-74.
- Eglen R.M., Choppin A., Dillon M.P., Hegde S. (1999) Muscarinic receptor ligands and their therapeutic potential. *Current Opinion in Chemical Biology* 3:426-32.
- Eglen R.M., Choppin A., Watson N. (2001) Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *TRENDS Pharmacol. Sci.* 22:409-13.
- Felder C.C., Bymaster F.P., Ward J., DeLapp N. (2000) Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J. Med. Chem.* 43(23):4333-53.
- Fisher A. (2000) Therapeutic strategies in Alzheimer's disease : M1 muscarinic agonists. *Jpn J. Pharmacol.* 84:101-12.
- Fruchart-Gaillard C., Mourier G., Marquer C., Ménez A., Servent D. (2006) Identification of various allosteric interaction sites on M1 muscarinic receptor using 125I-Met35-oxidized muscarinic toxin 7. *Mol. Pharmacol.* 69:1641-51.
- Gross J., Mutschler E., Lambrecht G. (1997) Evidence for muscarinic M4 receptors mediating nonadrenergic noncholinergic relaxations in rabbit anococcygeus muscle. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 356:505-16.
- Harvey A.L., Kornisiuk E., Bradley K.N., Cervenansky C., Duran R., Adrover M., Sanchez G., Jerusalinsky D. (2002) Effects of muscarinic toxins MT1 and MT2 from green mamba on different muscarinic cholinergic receptors. *Neurochem. Res.* 27:1543-54.
- Jerusalinsky D., Cervenansky C., Walz R., Bianchin M., Izquierdo I. (1993) A peptide muscarinic toxin from the Green Mamba venom shows agonist-like action in an inhibitory avoidance learning task. *Eur. J. Pharmacol.* 240:103-5.
- Jerusalinsky D., Cervenansky C., Pena C., Raskovsky S., Dajas F. (1992) Two polypeptides from *Dendroaspis angusticeps* venom selectively inhibit the binding of central muscarinic cholinergic receptor ligands. *Neurochem. Int.* 20:237-46.
- Jerusalinsky D., Harvey A., Karlsson E., Potter L. (1997) Workshop: the use of muscarinic toxins in the study of muscarinic receptors. *Life Sci.* 60:1161-62.
- Jerusalinsky D., Harvey A.L. (1994) Toxins from mamba venoms: small proteins with selectivities for different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 15:424-30.
- Jerusalinsky D., Kornisiuk E., Alfaro P., Quillfeldt J., Alonso M., Verde E.R., Cervenansky C., Harvey A. (1998) Muscarinic toxin selective for m4 receptors impairs memory in the rat. *Neuroreport* 9:1407-11.
- Jerusalinsky D., Kornisiuk E., Bernabeu R., Izquierdo I., Cervenansky C. (1995) Muscarinic toxins from the venom of *Dendroaspis* snakes with agonist-like actions. *Toxicon* 33:389-97.
- Jolkkonen M., Adem A., Hellman U., Wernstedt C., Karlsson E. (1995a) A snake toxin against muscarinic acetylcholine receptors: amino acid sequence, subtype specificity and effect on guinea-pig ileum. *Toxicon* 33:399-410.
- Jolkkonen M., Van Giersbergen P.L., Hellman U., Wernstedt C., Oras A., Satyapan N., Adem A., Karlsson E. (1995b) Muscarinic toxins from the black mamba *Dendroaspis polylepis*. *Eur. J. Biochem.* 234:579-85.
- Joubert F.J. (1985) The amino acid sequence of protein CM-3 from *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba) venom. *Int. J. Biochem.* 17:695-99.
- Karlsson E., Jolkkonen M., Mulugeta E., Onali P., Adem A. (2000) Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimie* 82:793-06.
- Krajewski J.L., Dickerson I.M., Potter L.T. (2001) Site-directed mutagenesis of m1-toxin1: two amino acids responsible for stable toxin binding to M(1) muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* 60:725-31.

- Kukhtina V.V., Weise C., Muranova T.A., Starkov V.G., Franke P., Hucho F., Wnendt S., Gillen C., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. (2000) Muscarinic toxin-like proteins from cobra venom. *Eur. J. Biochem.* 267:6784-9.
- Kukkonen A., Perakyla M., Akerman K.E., Nasman J. (2004) Muscarinic toxin 7 selectivity is dictated by extracellular receptor loops. *J. Biol. Chem.* 279:50923-9.
- Liang J., Gutierrez-Ford C., Potter L.T. (2001) Sustained unilateral blockade of rat striatal M(1) muscarinic receptors with m1-toxin1 in vivo. *Brain Res.* 921:211-8.
- Max S.I., Liang J.S., Potter L.T. (1993a) Purification and properties of m1-toxin, a specific antagonist of m1 muscarinic receptors. *J. Neurosci.* 13:4293-300.
- Max S.I., Liang J.S., Potter L.T. (1993b) Stable allosteric binding of m1-toxin to m1 muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* 44:1171-5.
- Max S.I., Liang J.S., Valentine H.H., Potter L.T. (1993c) Use of m1-toxin as a selective antagonist of m1 muscarinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267:480-5.
- Minic J., Molgo J., Karlsson E., Krejci E. (2002) Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase. *Eur. J. Neurosci.* 15:439-48.
- Miyoshi S., Tu A.T. (1996) Phospholipase A2 from *Naja naja sputatrix* venom is a muscarinic acetylcholine receptor inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys.* 328:17-25.
- Mourier G., Dutertre S., Fruchart-Gaillard C., Ménez A., Servent D. (2003) Chemical Synthesis of MT1 and MT7 Muscarinic Toxins: Critical Role of Arg-34 in Their Interaction with M1 Muscarinic Receptor. *Mol. Pharmacol.* 63:26-35.
- Mourier G., Servent D., Zinn-Justin S., Ménez A. (2000) Chemical engineering of a three-fingered toxin with anti-a7 neuronal acetylcholine receptor activity. *Protein Engineering* 13:217-25.
- Nasman J., Jolkonen M., Ammoun S., Karlsson E., Akerman K.E. (2000) Recombinant expression of a selective blocker of M(1) muscarinic receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271:435-9.
- Nirathanan S., Gwee M.C. (2004) Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *J. Pharmacol. Sci.* 94:1-17.
- Nishiuchi Y., Nishio H., Inui T., Bodi J., Kimura T. (2000) Combined solid-phase and solution approach for the synthesis of large peptides or proteins. *J. Pept. Sci.* 6:84-93.
- Olianas M.C., Adem A., Karlsson E., Onali P. (2004) Action of the muscarinic toxin MT7 on agonist-bound muscarinic M1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 487:65-72.
- Olianas M.C., Maullu C., Adem A., Mulugeta E., Karlsson E., Onali P. (2000) Inhibition of acetylcholine muscarinic M(1) receptor function by the M(1)-selective ligand muscarinic toxin 7 (MT-7). *Br. J. Pharmacol.* 131:447-52.
- Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C.A., Motoshima H., Fox B.A., Le Trong I., Teller D.C., Okada T., Stenkamp R.E., Yamamoto M., Miyano M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739-45.
- Rasmussen S.G., Choi H.J., Rosenbaum D.M., Kobilka T.S., Thian F.S., Edwards P.C., Burghammer M., Ratnala V.R., Sanishvili R., Fischetti R.F., Schertler G.F., Weis W.I., Kobilka B.K. (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450:383-7.
- Rosenbaum D.M., Cherezov V., Hanson M.A., Rasmussen S.G., Thian F.S., Kobilka T.S., Choi H.J., Yao X.J., Weis W.I., Stevens R.C., Kobilka B.K. (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* 318:1266-73.
- Segalas I., Roumestand C., Zinn-Justin S., Gilquin B., Ménez R., Ménez A., Toma F. (1995) Solution structure of a green mamba toxin that activates muscarinic acetylcholine receptors, as studied by nuclear magnetic resonance and molecular modeling. *Biochemistry* 34:1248-60.
- Servent D. (2007) Les toxines de Serpents. *Biofutur* 280:27-30.
- Teller D.C., Okada T., Behnke C.A., Palczewski K., Stenkamp R.E. (2001) Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). *Biochemistry* 40:7761-72.
- Tucek S., Proška J. (1995) Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 16:205-12.
- Vamvakides A. (2003) Agonistes muscariniques sélectifs M1 : échec d'une stratégie thérapeutique contre la maladie d'Alzheimer ou tactique inappropriée ? *Ann. Pharm. Fr.* 61(3):207-10.
- Waelbroeck M., De Neef P., Domenach V., Vandermeers-Piret M.C., Vandermeers A. (1996) Binding of the labelled muscarinic toxin 125I-MT1 to rat brain muscarinic M1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 305:187-92.
- Waelbroeck M., Tastenoy M., Camus J., Christophe J. (1990) Binding of selective antagonists to four muscarinic receptors (M1 to M4) in rat forebrain. *Mol. Pharmacol.* 38:267-73.
- Wirtshafter D. (2006) The selective m1 muscarinic antagonist MT-7 blocks pilocarpine-induced striatal Fos expression. *Brain Res.* 1085:127-31.

Case report of the use of *Datura stramonium* for recreational purpose

Ruta LEKSIENE, Jonas SURKUS*, Algirdas STONYS

Nephrological Clinic, Kaunas Medical University Hospital, Eiveniu 2, Kaunas 50009, Lithuania.

* Corresponding author ; Tel : +37069928287 ; Fax : +37037326189; E-mail : surkus@kmu.lt

Abstract

Datura stramonium is a well known plant containing anticholinergic substances. Some gardeners cultivate *Datura* species as decorative plants. Earlier, most poisonings were accidental, but now they are often intentional because some young people use various parts of the plant as a psychoactive substance. This is the case report about *Datura stramonium* poisoning in Kaunas Medical University Hospital, which is a typical example of anticholinergic syndrome induced by *Datura* species plants.

Utilisation récréative de *Datura stramonium* : à propos de trois cas

Datura stramonium est une plante très connue qui renferme des substances anticholinergiques. Certains jardiniers la cultivent comme plante décorative. Autrefois, les empoisonnements étaient essentiellement accidentels, mais de nos jours certains jeunes utilisent diverses parties de la plante pour leurs propriétés psychoactives. Nous rapportons le cas de trois jeunes qui ont été hospitalisés au Kaunas Medical University Hospital après avoir ingéré *Datura stramonium* et qui présentaient le tableau typique du syndrome anticholinergique provoqué par *Datura*.

Keywords : *Datura stramonium*, Jimson Weed, psychoactive substance, recreational use.

Introduction

Datura stramonium (Jimson Weed) is a well known plant (Figure 1) containing anticholinergic substances such as scopolamine, atropine, hyoscyamine also entering in the homeopathic stramonium composition. As other *Datura* species, it is found growing wildly in both urban and rural areas in many regions of the world. Some gardeners cultivate different *Datura* species as decorative plants (Kajokas, 2002). The taste and shape of *Datura stramonium* fruit would make it unattractive both to people and animal, so till 1980's, poisonings by this plant resulted predominantly from unintentional childhood poisonings (Al-Shaikh and Sablay, 2005).

Hallucinogenic properties of *Datura stramonium* were known for centuries and, in the past, people used it during religious rituals and for other magical or medicinal purposes. During the past 30 years the deliberate use of this plant by young adults for its hallucinogenic effects was widely described. Various parts of *Datura* species plants may be used to prepare tea or cigarettes from leafs, to eat seeds, etc.

Consumption of any part of the plant can cause severe anticholinergic toxicity but the highest concentration of toxins is in the seeds. Clinical symptoms are the same as in atropine poisoning (blurred vision and mydriasis, tachycardia, tachypnoea, dry mouth, dry and flushed skin, nausea, vomiting, hyperthermia, hypertension, urine retention, disorientation, agitation, hallucinations, sedation from drowsiness to coma) but can last significantly longer, even one or two weeks (Kajokas, 2002).

Treatment of poisoning usually consists of gastrointestinal decontamination and supportive care.

Physostigmine as antidote is considered only in severe cases, when seizures, severe agitation, coma and/or high fever are present (Forno and Terry, 1998 ; Thabet et al., 1999 ; Salen et al., 2003).



Fig. 1. *Datura stramonium* or Jimson Weed (photo of Nomeda Velaviciene, Lithuania).

Fig. 1. *Datura stramonium* ou herbe de Jimson.

Case report

Three young persons were delivered to Kaunas Medical University Hospital Emergency department at the same time. All of them were brought from the same place and all had the same clinical symptoms: dilated pupils, red face, dry mouth, hallucinations, delirium, tachycardia, tachypnoea and slight hyperthermia. Two young men (age 19 and 20 years) were hospitalized to the intensive care unit and the 14 years old girl was hospitalized to the pediatric intensive care unit.

The history of illness was reported by the girl's brother who visited his sister and found her and two other young men disorientated. Another brother informed that his sister roasted pancakes from the ground potatoes (national Lithuanian dish) and added to the paste the ground fruits of green colour, resembling to *Datura stramonium* fruit. The time from exposure to clinical symptoms occurrence wasn't known. The girl had probable seizures at home, because when she was found her clothes were wet with urine.

All of them had normal laboratory findings. The use of narcotics was not confirmed. The diagnosis of poisoning by *Datura stramonium* was estimated according to case history and similar clinical findings for all three patients. All of them were treated in intensive care units for only one day and all symptoms resolved after general gastrointestinal decontamination (gastric lavage and single dose of activated charcoal) and symptomatic treatment (sedation and intravenous crystalloid fluids).

Both young men were discharged from the hospital after one day treatment and the girl was discharged two days later without any residual symptoms of poisoning.

Discussion

In the past, reports about accidental poisonings after consumption of parts of *Datura* species plants were common (Chang *et al.*, 1999 ; Havelius and Asman, 2002 ; Firestone and Sloane, 2007 ; Spina and Taddei, 2007). Nowadays, the more actual problem is the increasing use of various psychoactive substances among young people in the most countries of the world (Forrester, 2006 ; Spina and Taddei, 2007). This part of population is constantly looking for new possibilities of recreation. Therefore, there are many case reports about intentional *Datura* species use for recreational purpose in the literature.

We reviewed medical references of the last ten years about the cases of poisonings induced by *Datura stramonium* or the other *Datura* species. In most cases there were adolescents and young people who used *Datura* species as psychoactive substances (Tiongson and Salen, 1998 ; Francis and Clarke, 1999 ; Boumba *et al.*, 2004 ; Al-Shaikh and Sablay, 2005 ; Spina and Taddei, 2007). So we can conclude that our case is a typical example of intentional *Datura stramonium* use for recreational purpose. Various types of consumption are mentioned in the references : smoking or chewing leaves, preparing tea from leaves, eating seeds (Francis and Clarke, 1999 ; Salen *et al.*, 2003 ; Boumba *et al.*, 2004 ; Dyer, 2004 ; Spina and Taddei, 2007). This case is a little bit different because entire fruits were used as a component of traditional Lithuanian dish. This way of use improved the taste of *Datura stramonium*.

The typical clinical symptoms of such poisonings referred in the literature are the same as in atropine overdose: mydriasis, tachycardia, agitation, hallucination and confusion (Forno and Terry, 1998 ; Tiongson and Salen, 1998 ; Thabet *et al.*, 1999 ; Salen *et al.*, 2003 ; Forrester, 2006). In our case all these symptoms appeared in all three patients. The main diagnostic problem in such kind of poisonings is that some other anticholinergic substances can induce similar clinical symptoms and the routine drug screenings do not detect these agents (Forno and Terry, 1998). For this reason it is very important to know objective and true case history. In our case, the only one possibility to estimate the cause of anticholinergic syndrome was anamnestic data.

From the reviewed references it is obvious that the gastrointestinal decontamination and supportive treatment of such poisonings is effective in most cases (Tiongson and Salen, 1998 ; Francis and Clarke, 1999 ; Thabet *et al.*, 1999 ; Salen *et al.*, 2003 ; Forrester, 2006). In our case, all three patients were successfully treated in that way.

In the literature review were reported some lethal cases of poisonings by *Datura* species (Forno and Terry, 1998 ; Boumba *et al.*, 2004) or cases with shocking consequences, such as self-amputation of penis and tongue after *Datura sanguinea* consumption (Marneros *et al.*, 2006). So we must enjoy that in our case all three young patients recovered without any complications.

Conclusions

We suppose that, in this case, the young people had some approximate information about recreational use of *Datura stramonium* fruits. Manifestation of poisoning was the typical example of anticholinergic syndrome induced by the plant.

In Lithuania, the use of such poisonous plants is not forbidden, so intentional poisonings can become a problem. We consider that it is necessary to discuss about the possibility to restrict both cultivation and use of *Datura* species.

References

- Al-Shaikh A.M., Sablay Z.M. (2005) Hallucinogenic plant poisoning in children. *Saudi Med. J.* 26:118-21.
- Boumba VA, Mitselou A, Vougiouklakis T. (2004) Fatal poisoning from ingestion of *Datura stramonium* seeds. *Vet. Hum. Toxicol.* 46:81-2.
- Chang S.S., Wu M.L., Deng J.F., Lee C.C., Chin T.F., Liao S.J. (1999) Poisoning by *Datura* leaves used as edible wild vegetables. *Vet. Hum. Toxicol.* 41:242-5.
- Dyer S. (2004) Plant exposures: wilderness medicine. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 22:299-313, vii.
- Firestone D., Sloane C. (2007) Not your everyday anisocoria: angel's trumpet ocular toxicity. *J. Emerg. Med.* 33:21-4.
- Forno F.J. Jr, Terry R.A. (1998) Accidental ingestion of jimsonweed by an adolescent. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 98:502-4.
- Forrester M.B. (2006) Jimson weed (*Datura stramonium*) exposures in Texas, 1998-2004. *J. Toxicol. Environ. Health A* 69:1757-62.
- Francis P.D., Clarke C.F. (1999) Angel trumpet lily poisoning in five adolescents: clinical findings and management. *J. Paediatr. Child. Health* 35:93-5.
- Havelius U., Asman P. (2002) Accidental mydriasis from exposure to Angel's trumpet (*Datura suaveolens*). *Acta Ophthalmol. Scand.* 80:332-5.
- Kajokas T.V. (2002) Cholinolytic poisons. Atropine, hyoscyamine, scopolamine. In: Kajokas T.V., Surkus J., Stonys A., *et al. Clinical Toxicology*, Kaunas, pp. 460-1.
- Marneros A., Gutmann P., Uhlmann F. (2006) Self-amputation of penis and tongue after use of Angel's Trumpet. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 256:458-9.
- Salen P., Shih R., Sierzenski P., Reed J. (2003) Effect of physostigmine and gastric lavage in a *Datura stramonium* - induced anticholinergic poisoning epidemic. *Am. J. Emerg. Med.* 21:316-7.
- Spina S.P., Taddei A., (2007) Teenagers with Jimson weed (*Datura stramonium*) poisoning. *CJEM* 9:467-8.
- Thabet H., Brahmi N., Amamou M., Ben Salah N., Hédhili A., Yacoub M. (1999) *Datura stramonium* poisonings in humans. *Vet. Hum. Toxicol.* 41:320-1.
- Tiongson J., Salen P. (1998) Mass ingestion of Jimson Weed by eleven teenagers. *Del. Med. J.* 70:471-6.

L'acétylcholinestérase et les venins de serpents

Jean MASSOULIE

Laboratoire de Neurobiologie, CNRS UMR 8544, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris.

Tél : (33) 1 44 32 38 91 ; Courriel : jean.massoulie@ens.fr

Résumé

Les venins de certains serpents Elapidae ont beaucoup contribué à l'étude de l'acétylcholinestérase (AChE). En effet, le venin des mambas (genre *Dendroaspis*) contient la fasciculine, une toxine peptidique inhibant spécifiquement l'AChE. La fasciculine permet d'analyser l'activité catalytique de l'AChE et surtout sa localisation fonctionnelle in vivo, de manière dynamique. Inversement, le venin d'autres Elapidae (genre *Bungarus*) contient un variant d'épissage spécifique d'AChE, un monomère soluble sécrété par la glande à venin. Cela est surprenant car cette enzyme ne semble pas contribuer à la toxicité du venin.

Acetylcholinesterase and snake venoms

The venoms of Elapidae snakes have provided useful tools for the study of acetylcholinesterase (AChE). In fact, the venom of mambas (genus *Dendroaspis*) contains a polypeptide toxin, fasciculin, which specifically inhibits AChE. Fasciculin has been used for detailed analysis of the catalytic mechanism of AChE and for investigating its localization and dynamics in vivo. The venoms of other Elapid snakes (genus *Bungarus*) are devoid of fasciculin but they contain a specific splice variant of AChE, a soluble monomer secreted by the venom gland. This is puzzling because AChE does not seem to contribute to the venom toxicity.

Keywords : Acetylcholinesterase, fasciculin, snake venom, splicing variant.

Certains venins de serpents contiennent de l'acétylcholinestérase, et d'autres des toxines inhibant l'acétylcholinestérase

Au cours de la transmission nerveuse cholinergique, l'acétylcholine est libérée par les terminaisons présynaptiques, active les récepteurs nicotiniques ou muscariniques, puis est rapidement hydrolysée par l'acétylcholinestérase (AChE). Cette enzyme joue donc un rôle essentiel dans l'excitabilité des systèmes nerveux central et périphériques des Vertébrés et invertébrés. En particulier, elle intervient dans le contrôle de la contraction musculaire chez les Vertébrés et certains invertébrés comme les Nématodes, les Annélides et les Mollusques, mais pas chez les Arthropodes ni surtout les Insectes (Gerschenfeld, 1973). Un blocage de l'AChE entraîne une paralysie, ce qui explique qu'elle soit la cible de toxiques puissants, naturels comme le sont certains alcaloïdes (ésérine) ou synthétiques, utilisés comme gaz de combat ou comme pesticides (Koelle, 1963). Il n'est donc pas surprenant que certains venins de serpents contiennent des toxines inhibant l'AChE, comme la fasciculine du venin de mamba (genre *Dendroaspis* ; Karlsson *et al.*, 1984). Il est plus inattendu de trouver l'AChE elle-même dans le venin d'autres serpents, comme le bungare (genre *Bungarus* ; Kumar et Elliott, 1973). Ces deux types de venins ont contribué de façon importante à la connaissance de l'AChE.

Variants d'épissage de l'AChE et existence d'un variant spécifique pour l'AChE de venin d'Elapidae

Il convient tout d'abord de présenter la structure

moléculaire de l'AChE, présente dans les tissus cholinergiques des Vertébrés ou des invertébrés (Massoulie *et al.*, 1993). L'AChE est codée par plusieurs gènes chez certains invertébrés, et par un gène unique chez les Vertébrés, mais qui peut engendrer plusieurs variants par épissage alternatif dans la région 3' des transcrits : à partir du dernier exon codant le domaine catalytique, l'épissage peut utiliser plusieurs sites accepteurs, ce qui place différents segments d'ARN en position codante, produisant divers types de peptides C-terminaux (Massoulie, 2002). Ces peptides n'ont pas d'influence sur l'activité catalytique d'hydrolyse de l'acétylcholine, mais déterminent la localisation fonctionnelle de l'AChE, soit en assurant son ancrage dans les membranes cellulaires soit en l'intégrant dans la matrice extracellulaire.

L'AChE des Insectes, certaines AChE de Nématodes, et un variant d'épissage d'AChE des poissons Elasmobranches (en particulier la torpille) et des Mammifères correspondent à un variant appelé H, pour "hydrophobe". En effet, le peptide C-terminal de ces enzymes (peptide h) possède une région hydrophobe et constitue un signal d'addition d'un motif glycophosphatidylinositol (GPI ; Silman et Futerman, 1987 ; Haas *et al.*, 1988 ; Coussen *et al.*, 2001). Cette modification post-traductionnelle intervient au cours de la synthèse de la chaîne protéique : le peptide C-terminal est clivé en amont de sa région hydrophobe et un glycolipide pré-assemblé est transféré par transamidation sur le nouveau résidu C-terminal, appelé résidu ω . La partie conservée du peptide C-terminal contient une ou parfois deux cystéines, qui permettent l'association de deux sous-unités en dimères covalents. La forme moléculaire finale consiste donc en un dimère dont les deux sous-unités sont

associées par un pont disulfure et sont ancrées à la surface des cellules par un glycolipide GPI lié à leur extrémité C-terminale.

Les peptides C-terminaux h des invertébrés, des Vertébrés primitifs (Elasmobranches) et des Mammifères possèdent quelques caractéristiques communes (présence d'une ou deux cystéines, site ω , région hydrophobe) mais pas d'homologie de séquence. De plus, le variant d'AChE de type H n'existe pas chez les poissons Téléostéens, les Batraciens, les Reptiles, ni les Oiseaux. Il semble donc que des peptides de type h aient été créés à diverses reprises au cours de l'évolution. Chez les Mammifères, le variant H d'AChE ne semble d'ailleurs pas jouer un rôle important dans le système cholinergique car il est essentiellement exprimé dans les cellules sanguines (érythrocytes, lymphocytes) et la suppression de la région codant le peptide h chez la souris n'entraîne pas de pathologie (Camp *et al.*, 2005 ; Girard *et al.*, 2006).

Le principal variant d'AChE qui existe chez tous les Vertébrés, et qui correspond à l'enzyme exprimée dans les tissus cholinergiques des Vertébrés supérieurs, se caractérise par un peptide C-terminal de 40 résidus, extrêmement bien conservé depuis les poissons cartilagineux (torpille) jusqu'aux Mammifères. Un peptide homologue existe aussi dans la butyrylcholinestérase qui ne présente pas d'autre variant. Ces peptides sont appelés "peptides t", pour "tailed", parce qu'ils permettent l'association des cholinestérases de type T avec des protéines structurales comme un collagène spécifique appelé ColQ ("queue"), ce qui produit les formes moléculaires pourvues d'une "queue" ("tail") collagénique (Feng *et al.*, 1999).

Le peptide t contient sept résidus aromatiques, dont trois tryptophanes séparés régulièrement par 6 résidus, qui sont absolument conservés dans les peptides t d'AChE et de butyrylcholinestérase de tous les Vertébrés. Le peptide t s'organise en hélice α , et tous les résidus aromatiques sont groupés dans un même secteur, formant une face hydrophobe qui peut interagir avec des micelles de détergents (Bon *et al.*, 2004). Cependant, le rôle de cette organisation est de permettre l'assemblage d'oligomères dans lesquelles les surfaces hydrophobes sont associées. C'est ainsi que les sous-unités d'AChE ou de butyrylcholinestérase de type T peuvent rester monomériques ou s'assembler en dimères ou tétramères (Bon et Massoulié, 1997).

L'association hétéro-oligomérique avec le collagène ColQ repose sur la formation d'un cylindre ("coiled coil") de quatre peptides t autour d'un motif peptidique riche en prolines, appelé PRAD ("Proline Rich Attachment Domain"), qui existe dans la région N-terminale non collagénique de ColQ (Bon *et al.*, 1997 ; Dvir *et al.*, 2004). Le PRAD est organisé en hélice de type polyproline II, beaucoup plus étirée qu'une hélice α , et il remplit l'espace central du cylindre formé par les quatre peptides t, les cycles des prolines étant apposés aux tryptophanes des peptides t. Les sous-unités cholinestérases de type T s'associent de manière analogue, mais pas identique, avec une protéine membranaire appelée PRiMA ("Proline Rich Membrane Anchor"), qui assure leur ancrage dans les membranes cellulaires (Perrier *et al.*, 2002, 2003 ; Nouredine *et al.*, 2007, 2008). Le complexe de l'AChE_T avec PRiMA constitue la forme enzymatique fonctionnelle dans le cerveau des Mammifères ; il existe aussi dans les muscles, mais ce sont les formes associées à ColQ qui sont prédominantes au niveau des jonctions neuromusculaires.

Lorsqu'il n'y a pas d'épissage après le dernier exon codant le domaine catalytique, on obtient un variant d'AChE appelé R, pour "Readthrough". Ce variant, produit par défaut d'épissage, se rencontre surtout aux stades embryonnaires et il est toujours mineur. Cependant, il augmente sous l'effet d'un stress, notamment dans le cerveau de souris soumises à un stress de contention ou exposées à un poison anticholinestérasique, ou dans des cellules en culture soumises à un choc thermique (Perrier *et al.*, 2005). Les études du groupe de H. Soreq indiquent que ce variant est impliqué dans la réponse au stress, mais aussi dans différents états pathologiques, en particulier dans des affections auto-immunes comme la *myasthenia gravis* (Kaufer *et al.*, 1998 ; Meshorer *et al.*, 2002 ; Brenner *et al.*, 2003).

Torpedo,
Mammifères

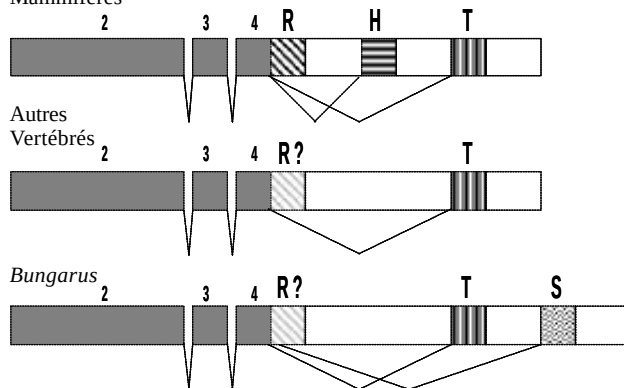


Fig. 1. Epissage alternatif dans la région 3' des transcrits d'AChE des Vertébrés. Les exons codant le domaine catalytique (2, 3 et 4) sont indiqués en gris foncé. Les épissages possibles en 3' sont indiqués par des lignes en pointillés. Les régions codantes alternatives sont désignées par des lettres, R, H, T, S (bien qu'elles soient parfois appelées "exons", cette nomenclature est impropre puisque leur extrémité 3' correspond à un codon stop et non à un site d'épissage). R ("Readthrough") résulte d'un défaut d'épissage, et produit des monomères solubles. H ("Hydrophobe") produit des dimères ancrés dans les membranes cellulaires par un glycolipide (GPI). Ces deux variants n'ont été montrés que chez les Elasmobranches et les Mammifères. T ("Tailed") produit le variant majoritairement exprimé dans les tissus cholinergiques ; il existe chez tous les Vertébrés. S ("Snake") produit l'AChE monomérique sécrétée dans le venin de *Bungarus*. Chez les Mammifères, l'épissage alternatif en 3' peut se combiner avec un polymorphisme complexe en 5' (Meshorer *et al.*, 2004). Ce schéma n'est pas à l'échelle.

Fig. 1. Alternative splicing at the 3' end of Vertebrate AChE transcripts. Exons encoding the common catalytic domain are in dark grey. Possible splicing patterns in 3' are indicated by dashed lines. Alternative coding regions are indicated by letters, R, H, T, S (their 3' extremity corresponds to stop codons, and not to splice sites, so that they cannot be properly called "exons"). R ("Readthrough") results from a lack of splicing, it produces soluble monomers. H ("Hydrophobic") produces GPI-anchored dimers. These two variants have only been observed in Elasmobranchs and Mammals. T ("Tailed") produces the major variant in cholinergic tissues, it exists in all Vertebrates. S ("Snake") produce secreted AChE monomers in *Bungarus* venom. In Mammals, alternative splicing in 3' may be combined with a complex polymorphism in 5' (Meshorer *et al.*, 2004). This scheme is not to scale.

Comme les autres Vertébrés, les serpents possèdent le variant T dans leurs tissus cholinergiques, en particulier leurs muscles. Cependant, les venins de certains serpents Elapidae, des genres *Bungarus* et *Naja*, contiennent un variant d'AChE spécifique, appelé S pour "serpent" ou "sécrété" (Cousin et Bon, 1999). Il

s'agit d'une forme monomérique, soluble, qui résulte d'un épissage vers un site accepteur situé en aval de celui qui produit le variant T (Cousin *et al.*, 1996a, 1996b, 1998). Le peptide C-terminal correspondant ne permet ni un ancrage membranaire, comme le peptide h, ni des assemblages oligomériques comme le peptide t, mais seulement la formation de monomères qui sont sécrétés dans le venin. Ce peptide possède la caractéristique d'être clivé lors de la sécrétion.

L'ACHe de bungare s'exprime mieux que celle de Mammifère dans des cellules COS transfectées

Nous avons observé que la production d'ACHe de venin de bungare recombinante, dans des cellules COS transfectées, était beaucoup plus élevée que celle d'ACHe de rat ou d'ACHe humaine, dont les séquences codantes (ADNc) étaient insérées dans les mêmes vecteurs (Morel et Massoulié, 2000). Nous avons cherché à savoir si cette différence provenait de la transcription des ARN messagers, de leur traduction en polypeptides, ou d'une étape post-traductionnelle. Nous avons observé que le rapport entre la production d'ACHe de venin de bungare et celle d'ACHe de rat dans des ovocytes de xénope après une injection d'ADNc était bien supérieur à ce rapport après injection d'ARN messenger, ce qui implique que la différence provient surtout de l'étape de transcription. Cela a été vérifié en quantifiant les niveaux d'ARN messenger dans les cellules COS transfectées. De plus, nous avons trouvé que cette différence subsistait lorsque l'ADNc était inversé dans le vecteur, de sorte qu'il n'y avait aucune production d'ACHe. Ces observations montrent que la séquence codante d'une protéine peut affecter son niveau d'expression par la présence d'éléments de type "enhancer" influençant en *cis* la transcription du gène. Cela n'est pas très surprenant, puisque l'on sait que les introns peuvent contenir des éléments régulateurs en *cis*, ce qui a été montré par exemple dans le cas de l'ACHe de rat. Pourtant, ce type de régulation est souvent négligé pour des raisons méthodologiques, lorsqu'on détermine le niveau d'expression d'un gène en remplaçant la séquence codante par celle d'une protéine rapporteur, comme la luciférase.

La fasciculine, un outil puissant pour l'étude de l'ACHe

La fasciculine possède une structure semblable à d'autres toxines "à trois doigts" de venins d'*Elapidae* (Le Du *et al.*, 1992), par exemple la bungarotoxine qui a permis la caractérisation moléculaire du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (Changeux *et al.*, 1970). Il est intéressant que la même structure générale ait permis l'apparition de toxines spécifiques de diverses macromolécules cholinergiques (Taylor *et al.*, 1994 ; Fruchard-Gaillard *et al.*, 2006). La fasciculine a une très forte affinité pour l'ACHe et de nombreuses études, dont cristallographiques, ont montré qu'elle se fixe à son site périphérique (Karlsson *et al.*, 1984 ; Bourne *et al.*, 1995 ; Harel *et al.*, 1995 ; Rosenberry *et al.*, 1996), situé à l'entrée de la gorge catalytique par laquelle les substrats doivent passer pour accéder au site actif (Mallender *et al.*, 2000). La fixation de fasciculine réduit considérablement l'hydrolyse en bloquant l'accès de l'acétylcholine au site catalytique, mais ce blocage n'est pas complet (Karlsson *et al.*, 1984 ; Marchot *et al.*, 1993 ; Bui *et al.*, 2004). Ainsi, le complexe AChE-fasciculine possède une activité résiduelle de 1-5% et il semble que l'effet de la fasciculine pourrait être en

partie allostérique (Karlsson *et al.*, 1984 ; Marchot *et al.*, 1993 ; Eastman *et al.*, 1995 ; Radic *et al.*, 1995 ; Mallender *et al.*, 1999). La fasciculine inhibe davantage l'ACHe des Mammifères que celle d'autres Vertébrés, en raison de l'absence de certains résidus aromatiques du site périphérique. La fasciculine est donc un outil très pertinent pour analyser en détail le mécanisme catalytique des AChE.

L'utilisation de fasciculine marquée, soit radioactivement, soit par des colorants fluorescents, a permis d'analyser la localisation précise et le renouvellement des molécules d'ACHe, notamment dans les jonctions neuromusculaires (Anglister *et al.*, 1998 ; Krejci *et al.*, 2006 ; Martinez-Pena y Valenzuela *et al.*, 2007).

Conclusion : quelles relations entre les venins de serpents et l'ACHe ?

Les relations entre les venins de serpents et l'ACHe sont complexes et pas toujours comprises. Par exemple, on ne sait pas si la présence d'ACHe dans certains venins joue un rôle dans leur toxicité : en effet, l'injection d'ACHe purifiée à partir de ces venins n'a montré aucune toxicité de l'ACHe elle-même, et inversement des venins dont l'ACHe avait été éliminée par adsorption spécifique gardaient la même toxicité, d'après les tests conventionnels de détermination de la DL₅₀ chez la souris (Cousin *et al.*, 1996b).

De même, il serait très intéressant d'analyser la synergie éventuelle entre la fasciculine et d'autres composants du même venin. Par ailleurs, l'apparition chez certaines espèces d'un épissage particulier permettant la sécrétion d'ACHe dans le venin et sa relation avec l'ACHe tissulaire mériteraient d'être analysées d'un point de vue phylogénétique.

Quoi qu'il en soit, l'ACHe et la fasciculine offrent un exemple parfait de l'utilité pour les chercheurs de ces outils extraordinaires que sont les molécules issues de venins de serpents.

Références bibliographiques

- Anglister L., Eichler J., Szabo M., Haesaert B., Salpeter M.M. (1998) ¹²⁵I-labeled fasciculin 2: a new tool for quantitation of acetylcholinesterase densities at synaptic sites by EM-autoradiography. *J. Neurosci. Methods* 81:63-71.
- Bon S., Coussen F., Massoulié J. (1997) Quaternary associations of acetylcholinesterase. II. The polyproline attachment domain of the collagen tail. *J. Biol. Chem.* 272:3016-21.
- Bon S., Dufourcq J., Leroy J., Cornut I., Massoulié J. (2004) The C-terminal t peptide of acetylcholinesterase forms an alpha helix that supports homomeric and heteromeric interactions. *Eur. J. Biochem.* 271:33-47.
- Bon S., Massoulié J. (1997) Quaternary associations of acetylcholinesterase. I Oligomeric associations of T subunits with and without the amino-terminal domain of the collagen tail. *J. Biol. Chem.* 272:3007-15.
- Bourne Y., Taylor P., Marchot P. (1995) Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: crystal structure of the complex. *Cell* 83:503-12.
- Brenner T., Hamra-Amitay Y., Evron T., Boneva N., Seidman S., Soreq H. (2003) The role of readthrough acetylcholinesterase in the pathophysiology of *myasthenia gravis*. *FASEB J.* 17:214-22.
- Bui J.M., Tai K., McCammon J.A. (2004) Acetylcholinesterase: enhanced fluctuations and alternative routes to the active site in the complex with fasciculin-2. *J. Am. Chem. Soc.* 126:7198-7205.
- Camp S., Zhang L., Marquez M., de la Torre B., Long J.M., Bucht G., Taylor P. (2005) Acetylcholinesterase (AChE) gene modification in transgenic animals: functional consequences of

- selected exon and regulatory region deletion. *Chem. Biol. Interact.* 157:158:79-86.
- Changeux J.-P., Kasai M., Lee C.Y. (1970) Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67:1241-7.
- Cousin X., Bon C. (1999) Acetylcholinesterase from snake venom as a model for its nerve and muscle counterpart. *J. Nat. Toxins* 8:285-94.
- Cousin X., Bon S., Duval N., Massoulié J., Bon C. (1996a) Cloning and expression of acetylcholinesterase from *Bungarus fasciatus* venom. A new type of COOH-terminal domain; involvement of a positively charged residue in the peripheral site. *J. Biol. Chem.* 271:15099-108.
- Cousin X., Bon S., Massoulié J., Bon C. (1998) Identification of a novel type of alternatively spliced exon from the acetylcholinesterase gene of *Bungarus fasciatus*. Molecular forms of acetylcholinesterase in the snake liver and muscle. *J. Biol. Chem.* 273:9812-20.
- Cousin X., Crémignon C., Grassi J., Méflah K., Cornu G., Saliou B., Bon S., Massoulié J., Bon C. (1996b) Acetylcholinesterase from *Bungarus* venom: a monomeric species. *FEBS Lett.* 387:196-200.
- Coussen F., Ayon A., Le Goff A., Leroy J., Massoulié J., Bon S. (2001) Addition of a glycoposphatidylinositol to acetylcholinesterase; processing, degradation, and secretion. *J. Biol. Chem.* 276:27881-92.
- Dvir H., Harel M., Bon S., Liu W.Q., Vidal M., Garbay C., Sussman J.L., Massoulié J., Silman I. (2004) Structural insight into tetramerization of the synaptic form of acetylcholinesterase: interaction of a polyproline II helix with four WWW motifs. *EMBO J.* 23:4394-405.
- Eastman J., Wilson E.J., Cervenansky C., Rosenberry T.L. (1995) Fasciculin 2 binds to the peripheral site on acetylcholinesterase and inhibits substrate hydrolysis by slowing a step involving proton transfer during enzyme acylation. *J. Biol. Chem.* 270:19694-701.
- Feng G., Krejci E., Molgo J., Cunningham J.M., Massoulié J., Sanes J.R. (1999) Genetic analysis of collagen Q: Roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J. Cell Biol.* 144:1349-60.
- Fruchart-Gaillard C., Mourier G., Marquer C., Ménez A., Servent D. (2006) How three-finger-fold toxins interact with various cholinergic receptors. *J Mol Neurosci.* 30:7-8.
- Gerschenfeld H.M. (1973) Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiol. Rev.* 53:1-119.
- Girard E., Bernard V., Camp S., Taylor P., Krejci E., Molgo J. (2006) Remodeling of the neuromuscular junction in mice with deleted exons 5 and 6 of acetylcholinesterase. *J. Mol. Neurosci.* 30:99-100.
- Haas R., Marshall T.L., Rosenberry T.L. (1988) *Drosophila* acetylcholinesterase: demonstration of a glycoinositol phospholipid anchor and an endogenous proteolytic cleavage. *Biochemistry* 27:6453-7.
- Harel M., Kleywegt G.J., Ravelli R.B., Silman I., Sussman J.L. (1995) Crystal structure of an acetylcholinesterase-fasciculin complex: interaction of a three-fingered toxin from snake venom with its target. *Structure* 3:1355-66.
- Karlsson E., Mbugua P.M., Rodriguez-Ithurralde D. (1984) Fasciculins, anti-cholinesterase toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps*. *J. Physiol. (Paris)* 79:232-40.
- Kaufer D., Friedman A., Seidman S., Soreq H. (1998) Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature* 393:373-7.
- Koelle G.B. (1963) Cholinesterases and anticholinesterase agents. *Handbuch der experimentellen Pharmakologie*. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- Krejci E., Martinez-Pena y Valenzuela I., Ameziame R., Akaaboune M. (2006) Acetylcholinesterase dynamics at the neuromuscular junction of live animals. *J. Biol. Chem.* 281:10347-54.
- Kumar V., Elliott W.B. (1973) The acetylcholinesterase of *Bungarus fasciatus* venom. *Eur. J. Biochem.* 34:586-92.
- Le Du M.H., Marchot P., Bougis P.E., Fontecilla-Camps J.C. (1992) 1.9-A resolution structure of fasciculin 1, an anti-acetylcholinesterase toxin from green mamba snake venom. *J. Biol. Chem.* 267:22122-30.
- Mallender W.D., Szegletes T., Rosenberry T.L. (1999) Organophosphorylation of acetylcholinesterase in the presence of peripheral site ligands. Distinct effects of propidium and fasciculin. *J. Biol. Chem.* 274:8491-9.
- Mallender W.D., Szegletes T., Rosenberry T.L. (2000) Acetylthiocholine binds to asp74 at the peripheral site of human acetylcholinesterase as the first step in the catalytic pathway. *Biochemistry* 39:7753-63.
- Marchot P., Khelif A., Ji Y.-H., Mansuelle P., Bougis P.E. (1993) Binding of ¹²⁵I-fasciculin to rat brain acetylcholinesterase: the complex still binds diisopropyl fluorophosphate. *J. Biol. Chem.* 268:12458-67.
- Martinez-Pena y Valenzuela I., Akaaboune M. (2007) Acetylcholinesterase mobility and stability at the neuromuscular junction of living mice. *Mol. Biol. Cell* 18:2904-11.
- Massoulié J. (2002) The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *NeuroSignals* 11:130-43.
- Massoulié J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E., Vallette F.M. (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* 41:31-91.
- Meshorer E., Erb C., Gazit R., Pavlovsky L., Kaufer D., Friedman A., Glick D., Ben-Arie N., Soreq H. (2002) Alternative splicing and neuritic mRNA translocation under long-term neuronal hypersensitivity. *Science* 295:508-12.
- Meshorer E., Toiber D., Zurel D., Sahly I., Dori A., Cagagno, E., Schreiber L., Grisaru D., Tronche F., Soreq H. (2004) Combinatorial complexity of 5' alternative acetylcholinesterase transcripts and protein products. *J. Biol. Chem.* 279:29740-51.
- Morel N., Massoulié J. (2000) Comparative expression of homologous proteins. A novel mode of transcriptional regulation by the coding sequence folding compatibility of chimeras. *J. Biol. Chem.* 275:7304-12.
- Noureddine H., Carvalho S., Schmitt C., Massoulié J., Bon S. (2008) Acetylcholinesterase associates differently with its anchoring proteins ColQ and PRiMA. *J. Biol. Chem.* 283:20722-32.
- Noureddine H., Schmitt C., Liu W.Q., Garbay C., Massoulié J., Bon S. (2007) Assembly of acetylcholinesterase tetramers by peptidic motifs from the proline-rich membrane anchor, PRiMA: competition between degradation and secretion pathways of heteromeric complexes. *J. Biol. Chem.* 282:3487-97.
- Perrier A.L., Massoulié J., Krejci E. (2002) PRiMA, the membrane anchor of acetylcholinesterase in brain. *Neuron* 33:275-85.
- Perrier N.A., Khérif S., Perrier A.L., Krejci E., Dumas S., Mallet J., Massoulié J. (2003) Expression of PRiMA, the membrane anchor of acetylcholinesterase, in the mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 18:1837-47.
- Perrier N.A., Salani M., Falasca C., Bon S., Augusti-Tocco G., Massoulié J. (2005) The readthrough variant of acetylcholinesterase remains very minor after heat shock, organophosphate inhibition and stress, in cell culture and *in vivo*. *J. Neurochem.* 94:629-38.
- Radic Z., Quinn D.M., Vellom D.C., Camp S., Taylor P. (1995) Allosteric control of acetylcholinesterase catalysis by fasciculin. *J. Biol. Chem.* 270:20391-9.
- Rosenberry T.L., Rabl C.R., Neumann E. (1996) Binding of the neurotoxin fasciculin 2 to the acetylcholinesterase peripheral site drastically reduces the association and dissociation rate constants for N-methylacridinium binding to the active site. *Biochemistry* 35:685-90.
- Silman I., Futerman A.H. (1987) Modes of attachment of acetylcholinesterase to the surface membrane. *Eur. J. Biochem.* 170:11-22.
- Taylor P., Radic Z., Kreienkamp H.J., Maeda R., Luo Z., Fuentes M.E., Vellom D.C., Pickering N. (1994) Expression and ligand specificity of acetylcholinesterase and the nicotinic receptor: a tale of two cholinergic sites. *Biochem Soc Trans.* 22:740-5.

Utilisation de la fasciculine 2, une toxine de venin de serpent, pour étudier l'acétylcholinestérase in vivo : avantages et inconvénients

Véronique BERNARD, Eric KREJCI

INSERM U686, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France.

Tél : 01 42 86 41 16 ; Fax : 01 42 86 33 99 ; Courriel : veronique.bernard@univ-paris5.fr, eric.krejci@univ-paris5.fr

Résumé

L'acétylcholinestérase (AChE) participe à l'homéostasie de l'acétylcholine (ACh) dans les systèmes nerveux central et périphérique en hydrolysant efficacement ce neuromédiateur. AChE est inhibée par les fasciculines, des miniprotéines de la famille des toxines à trois doigts, isolées de venins de serpents. L'inhibition résulte d'une interaction des deux premiers doigts de la toxine avec le site périphérique anionique de l'AChE, site de fixation transitoire du substrat avant que celui-ci transite vers le site catalytique. La structure 3D du complexe montre la remarquable étendue de l'interaction entre l'AChE et la fasciculine et suggère que la toxine empêche l'entrée de l'ACh dans le site catalytique. Cependant la cinétique enzymatique montre que la modification du trafic de l'ACh n'est pas la cause primaire de l'inhibition. La stabilité de cette interaction et la possibilité de marquer la toxine sans modification majeure de ses propriétés d'interaction ont permis l'utilisation de la fasciculine 2 pour visualiser l'AChE au niveau de la jonction neuromusculaire avec une résolution inégalée : les procédures de marquage sont simples, la pénétration dans l'espace synaptique est efficace et l'interaction est quantitative. Mais la sensibilité du marquage est faible, l'AChE n'est pas détectable efficacement dans le cerveau avec cette méthode. La stabilité de l'interaction AChE-fasciculine 2 permet aussi de suivre, au cours du temps, la stabilité et le renouvellement de l'AChE dans une jonction neuromusculaire in vivo.

Use of fasciculin 2, a snake venom toxin, to study acetylcholinesterase in vivo : advantages and disadvantages

Acetylcholinesterase (AChE) contributes to homeostasis of the neuromediator, acetylcholine (ACh), in the central and peripheral nervous systems, through efficient hydrolysis of this neuromediator. AChE is inhibited by the fasciculins, which are miniproteins of the three fingers toxin family, isolated from snake venoms. The inhibition results from the interaction of the first two fingers of the toxin with the peripheral anionic site of AChE, a surface site where the substrate binds before being directed to the catalytic site. The 3D structure of the complex shows a large interaction surface area between AChE and fasciculin and suggests that the toxin prevents the entry of ACh into the catalytic centre. However, the enzymatic kinetics shows that alteration of ACh trafficking is not the primary cause of the inhibition. The stability of the interaction and the possibility to label the toxin without modifying its interaction properties have permitted the use of labelled fasciculin 2 to visualize AChE at the neuromuscular junction with an unequalled resolution : the labelling procedure is easy, the penetration in the synaptic space is efficient and the interaction is quantitative. But the sensitivity of the labelling is low, AChE in the brain is not easily detectable by this method. The stability of the AChE-fasciculin 2 interaction also allows one to follow, during time, the stability and replacement of AChE in vivo at the neuromuscular junction.

Keywords : Acetylcholine, brain, confocal microscopy, electron microscopy, neuromuscular junction.

Introduction

L'acétylcholinestérase (AChE) est l'enzyme majeure de dégradation de l'acétylcholine (ACh) dans le système nerveux central et périphérique. Sa concentration est particulièrement élevée dans la synapse cholinergique la plus accessible, la jonction neuromusculaire (JNM). L'hydrolyse de l'ACh dépend des remarquables propriétés catalytiques de l'enzyme, une des plus rapides connues, mais aussi de la densité des sites catalytiques et de leur localisation cellulaire, subcellulaire et subsynaptique en rapport avec la localisation des récepteurs nicotiniques et muscariniques à l'ACh. La stimulation synchrone des récepteurs par l'ACh libérée massivement par la

terminaison nerveuse nécessite une élimination rapide. L'homéostasie de l'ACh est aussi essentielle au maintien des récepteurs en place pour traduire le signal activé par l'ACh. L'inhibition chronique ou l'absence d'AChE entraîne une diminution des récepteurs nicotiniques et muscariniques qui aboutit à un paradoxal déficit en récepteurs (Bernard *et al.*, 2006 ; Sun *et al.*, 2007).

Au début des années 1980, ont été isolées des venins de serpents Mamba plusieurs isotoxines qui inhibent l'AChE de certaines classes de Vertébrés, les fasciculines (Karlsson *et al.*, 1984). Les fasciculines sont des miniprotéines de 7 kDa qui appartiennent à la superfamille des toxines à trois doigts isolées des venins

d'Elapidae. L'interaction de la fasciculine 2 (Fas2) avec l'AChE a été étudiée de manière détaillée en combinant l'extraordinaire potentiel de la cinétique enzymatique, les méthodes biochimiques et l'analyse 3D du complexe AChE-Fas2.

L'objet de cet article est de montrer comment la Fas2 complète la palette des méthodes permettant de visualiser et quantifier l'AChE *in situ*. Aussi, après avoir revu les propriétés des fasciculines, nous montrerons comment ces toxines permettent la visualisation et la quantification de l'AChE, puis nous présenterons quelques limites à leur utilisation.

Les fasciculines se fixent sur le site anionique périphérique de l'AChE, à l'entrée de la gorge catalytique

Les fasciculines inhibent l'activité enzymatique de l'AChE des Mammifères et des poissons électriques, mais pas du poulet. Leur affinité est remarquable puisque ces toxines se fixent et bloquent l'activité enzymatique dans la gamme des pico- ou nanomolaires. Trois grandes approches méthodologiques permettent de comprendre les étonnantes propriétés de ces interactions et leurs conséquences fonctionnelles.

L'hydrolyse de l'ACh dépend d'une triade catalytique (Ser, Asp, His) organisée dans une poche catalytique dont la taille et la géométrie gouvernent le positionnement de l'ACh. Ce site catalytique se situe à environ 20 Å de la surface de l'enzyme et est accessible par une gorge étroite, qui joue un rôle majeur pour la circulation de l'ACh et de la molécule d'eau indispensable à l'hydrolyse. Ce site catalytique est la cible de nombreux inhibiteurs qui bloquent directement la catalyse. Par exemple, les organophosphorés réagissent avec la sérine du site actif et phosphorylent l'enzyme : l'inhibition est irréversible. D'autres inhibiteurs vont obstruer la gorge menant au site catalytique, limitant ainsi la progression du substrat. Un second site régule l'activité de l'enzyme, le site périphérique anionique situé à l'entrée de la gorge, à la surface de la molécule d'AChE. Les fasciculines interagissent avec cette région. En suivant les modifications des propriétés catalytiques de l'enzyme, il est possible de déduire que l'inhibition dépend de ce site : (1) le propidium, un ligand du site périphérique affecte l'inhibition par la Fas2 (Karlsson *et al.*, 1984) ; (2) la mutagenèse de résidus principalement aromatiques localisés dans un anneau à l'entrée de la gorge réduit dramatiquement l'inhibition par la Fas2 (Radic *et al.*, 1994) ; (3) la mutagenèse de résidus du site catalytique ne modifie pas la fixation de la Fas2 (Radic *et al.*, 1994) ; (4) l'inhibition par la Fas2 n'empêche pas la fixation d'organophosphoré, inhibiteur du site catalytique (Marchot *et al.*, 1993 ; Mallender *et al.*, 1999). Malgré sa position au niveau de l'entrée de la gorge, plusieurs analyses montrent que la toxine n'est pas simplement un « bouchon » stérique qui empêche la progression des substrats mais que sa fixation modifie la conformation de l'enzyme (Eastman *et al.*, 1995). Les études basées sur la catalyse enzymatique sont complexes car une activité résiduelle persiste qui masque les propriétés de l'inhibition. Pour résoudre ce problème, Radic *et al.* ont utilisé une autre propriété de l'enzyme, la carbamylation du substrat et la mesure de la fixation du carbamate fluorescent plutôt que l'hydrolyse de l'acétylthiocholine (Radic et Taylor, 2001).

Une étude plus directe de l'interaction AChE-fasciculine est possible en utilisant une fasciculine marquée par l'ode radioactif, ¹²⁵I. Les propriétés de la

fixation de la toxine sur l'AChE sont alors quantifiées directement et les expériences de compétition permettent de conclure que (1) le marquage de la fasciculine 3 n'affecte pas sa fixation sur l'AChE, (2) la fasciculine 3 est plus affine que la fasciculine 1 et la Fas2. Finalement la fixation des fasciculines ne dépend pas du site catalytique mais est affectée par les inhibiteurs du site périphérique (Marchot *et al.*, 1993).

Pour connaître les détails des interactions entre l'AChE et la Fas2, le complexe AChE-Fas2 a été cristallisé et étudié par diffraction des rayons-X (Bourne *et al.*, 1995 ; Harel *et al.*, 1995). La Fas2 apparaît comme un bouchon fermant l'entrée de la gorge catalytique. Un fait remarquable est l'étendue de la surface de contact entre l'AChE et la Fas2. Cette surface d'interaction implique les boucles I et II et plus modestement la boucle III de la toxine et un grand nombre de résidus aromatiques. Un élément clé de cette interaction est le résidu Met-33 du second doigt de la toxine qui interagit par des forces de van der Waals avec plusieurs résidus aromatique de l'entrée de la gorge catalytique et en particulier le résidu Trp-279 (selon la numérotation de l'AChE de torpille). Ainsi l'absence de ce résidu dans la sous-unité catalytique des oiseaux (poulet, caille) ou des insectes, et de la butyrylcholinestérase (BChE), explique la résistance de ces enzymes à l'inhibition par les fasciculines.

La cinétique d'inhibition de l'AChE par la Fas2 est un processus lent qui dépend de la température. Ainsi la constante d'inhibition de l'AChE humaine est 8 fois plus élevée à 37°C qu'à 22°C (Karlsson *et al.*, 1984). La forte affinité et le faible taux de dissociation imposent une longue période d'incubation pour mesurer la constante d'inhibition et l'activité résiduelle : l'enzyme est incubée avec la toxine 14 à 16 à 37°C avant la mesure d'activité résiduelle (Radic *et al.*, 1994). A 25°C, dans un tampon phosphate, l'estimation *in vitro* de la demi-dissociation est de 48 h après une fixation pendant 4 h (Marchot *et al.*, 1993).

Plusieurs méthodes pour visualiser l'AChE

La distribution de l'AChE a été précisément étudiée au cours de la seconde moitié du XX^{ème} siècle en utilisant trois grandes méthodes qui permettent de visualiser spécifiquement l'AChE dans le cerveau, la JNM, et beaucoup d'autres tissus où l'enzyme est présente.

L'AChE est détectée par son activité enzymatique

Dès les années 1950, l'AChE est la première molécule visualisée dans la JNM. La méthode initialement décrite par Georges Koelle utilise un substrat modifié, l'acétylthiocholine, dont le produit d'hydrolyse réduit le Cu²⁺ en Cu⁺, lequel précipite (Tsuji et Larabi, 1983). Les Figures 1 a et d illustrent le marquage obtenu avec cette méthode au niveau d'une JNM (a) et du cerveau (d). Le précipité brun correspond au précipité provoqué par l'hydrolyse de l'acétylthiocholine. De nombreuses variations sur ce thème vont être développées pendant les 40 années suivantes pour révéler avec finesse la localisation de l'AChE. Parmi celles-ci, la méthode de Tago permet des marquages particulièrement fins quand la densité de l'AChE est faible (Tago *et al.*, 1986). La quantification est cependant difficile car la cinétique enzymatique peut varier en fonction de la position de l'AChE, de l'accessibilité aux substrats et de la possible hétérogénéité des propriétés catalytiques de l'AChE. En outre, la résolution spatiale est limitée car cette méthode altère la morphologie du tissu en microscopie électronique.

L'AChE est quantifiée par le DFP radioactif

Au cours des années 1960, le DFP radioactif est utilisé pour phosphoryler l'AChE et quantifier l'AChE dans la JNM (Rogers *et al.*, 1969 ; Salpeter, 1969). Le DFP est un inhibiteur irréversible des hydrolases à sérine, et donc de l'AChE. La réaction enzymatique entraîne la phosphorylation de l'AChE et son marquage par un dérivé radioactif, ^3H ou ^{32}P . Le marquage est révélé par une émulsion photographique qui précipite des grains d'argent là où sont émis les rayonnements radioactifs. L'observation au microscope électronique permet une première estimation du nombre de sites d'AChE dans les différents domaines de la JNM. Cette méthode est délicate et complexe car le DFP n'est pas spécifique de l'AChE, et elle nécessite plusieurs étapes pour limiter le marquage à l'AChE. Deux stratégies complémentaires sont utilisées. La première utilise la propriété de réactivation de l'AChE phosphorylée par les oximes, propriété non partagée par les autres hydrolases à sérine sensibles au DFP : dans une première étape, tous les sites potentiels sont phosphorylés avec du DFP non marqué puis, après action des oximes, seule l'AChE est réactivée et récupère la capacité de fixation du ^3H -DFP. La seconde stratégie vise à empêcher la fixation du DFP non marqué sur l'AChE en bloquant sa sérine catalytique avec un inhibiteur réversible, le 1,5-Bis(4-allyldiméthylammoniumphényl) pentan-3-one dibromide (BW284c51) puis, après incubation et lavage, à incuber les préparations avec le ^3H -DFP pour ne marquer que les sites AChE initialement protégés par le BW284c51.

L'AChE est détectée par des anticorps spécifiques

A partir des années 1980, les progrès de l'immunologie permettent la production d'anticorps dirigés contre l'AChE, leur localisation étant révélée grâce à des anticorps secondaires couplés à différents traceurs. Plusieurs anticorps polyclonaux permettent de visualiser l'AChE chez le rat et la souris (Marsh *et al.*, 1984). Les Figures 1 b et e montrent un exemple de visualisation de l'AChE avec cet anticorps, la résolution en microscopie fluorescente est bien meilleure qu'avec une méthode colorimétrique. Sur la Figure 1e, les contours du neurone sont visibles ainsi que les extensions axonales.

Mais pour le moment, aucun anticorps monoclonal ne permet de visualiser l'AChE chez la souris. Un anticorps monoclonal permettrait d'obtenir facilement des fragments plus petits (tels des $(\text{Fab}')_2$ ou Fab) et ayant donc une meilleure pénétration dans le tissu (voir la suite).

Des dérivés de la Fas2 pour quantifier et visualiser l'AChE à la JNM

Au cours des dix dernières années, plusieurs dérivés de la Fas2 ont été obtenus et constituent de nouveaux outils pour détecter et quantifier l'AChE.

La ^{125}I -Fas2 remplace efficacement le ^3H -DFP

Anglister a utilisé la Fas2 marquée par l'iode ^{125}I , (Anglister *et al.*, 1998), suivant la procédure précédemment décrite (Marchot *et al.*, 1993). Ce groupe a une longue expérience dans l'utilisation du ^3H -DFP et démontre la simplicité d'utilisation de la ^{125}I -Fas2 par rapport au ^3H -DFP. La ^{125}I -Fas2 permet une amélioration considérable de la quantification pour les raisons suivantes : (1) le marquage direct par application de la toxine sur le muscle *in vivo*, le lavage et l'attente de quelques heures sont autant d'étapes simples ; (2) le bruit de fond est très faible ; (3) l'activité spécifique de la

^{125}I -Fas2 est supérieure à celle du ^3H -DFP et l'émission du rayonnement γ permet à la fois une bonne résolution spatiale et une exposition courte, de quelques jours au lieu de mois avec le ^3H ; (4) la fixation est spécifique puisque tout le marquage par la ^{125}I -Fas2 est éliminé par le BW284c51.

L'AChE est détectée par des dérivés non radioactifs de la Fas2

La première utilisation de la Fas2 marquée par un dérivé fluorescent a permis de suivre dans le muscle de grenouille la co-localisation de l'AChE, marquée par la Fas2, et du récepteur nicotinique à l'ACh, marqué par l' α -bungarotoxine (Peng *et al.*, 1999). Pour obtenir une plus grande diversité de marquage avec la même source de Fas2, nous avons marqué la toxine avec la biotine (biot-Fas2). La biotine est ensuite révélée par la streptavidine couplée soit à des dérivés fluorescents de différentes couleurs, soit à l'or. Un exemple de marquage est montré dans la Figure 1 c.

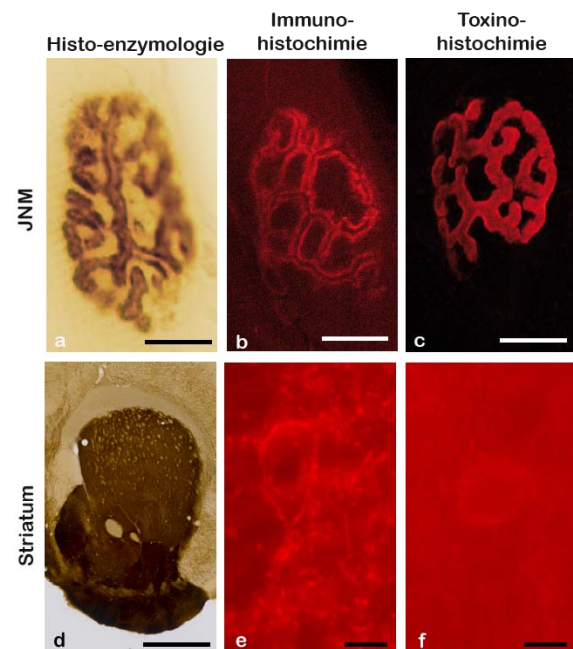


Fig. 1. Détection de l'AChE à la JNM dans le tibialis antérieur et dans le cerveau (striatum) à l'aide de trois techniques différentes : histo-enzymologie, immuno-histochimie et toxino-histochimie. Chacune de ces techniques montre l'AChE à la JNM, mais la Fas2 ne révèle pas l'AChE dans le cerveau. Barres : a-c et e-f : 10 μm , d : 1 mm.

Fig. 1. Detection of AChE at the neuromuscular junction (NMJ, tibialis anterior) and brain (striatum) by three techniques : histo-enzymology, immuno-histochemistry et toxin-histochemistry. Each method shows AChE at the NMJ but the toxin does not reveal AChE in the brain. Scale : a-c et e-f : 10 μm , d : 1 mm.

Les avantages de la Fas2 marquée pour visualiser l'AChE dans la JNM

Toutes les méthodes permettent de visualiser spécifiquement l'AChE au niveau de la JNM comme le montre l'absence de marquage dans des souris dépourvues d'AChE. Cependant elles ne sont pas identiques en terme de résolution spatiale, de sensibilité et d'accessibilité aux sites.

Une pénétration remarquable de la Fas2 dans les tissus fixés comparée aux anticorps

Pour comparer les marquages obtenus avec un anticorps et la toxine, nous avons incubé avec la biot-Fas2 et/ou l'anticorps anti-AChE des fibres dissociées d'un muscle de souris fixé par perfusion cardiaque avec une solution contenant deux fixateurs. L'anticorps est révélé avec un anticorps secondaire couplé avec un fluorophore rouge et la biot-Fas2 avec la streptavidine couplée avec un fluorophore vert. Sur la Figure 2, les images montrent une dissociation des marquages, lesquels ne se superposent pas. Cela ne résulte pas d'interaction entre ces 2 marquages qui sont identiques quand ils sont pratiqués indépendamment.

Pour obtenir une information plus précise, d'autres fibres sont marquées indépendamment soit avec la biot-

Fas2 révélée avec la streptavidine couplée à l'or soit avec l'anticorps anti-AChE révélé avec un anticorps secondaire couplé à l'or. Le tissu est ensuite préparé et coupé pour une observation en microscopie électronique. La Figure 3 montre clairement la différence de localisation du marquage. La Fas2 marque l'ensemble de la fente synaptique en incluant les replis sous-synaptiques (indiqués par une flèche) alors que l'anticorps ne marque pratiquement pas ce domaine des replis, mais s'accumule autour de la JNM. Ces différences de marquage peuvent simplement s'expliquer par la différence de taille et d'encombrement de la biot-Fas2 qui est environ 30 fois plus petite qu'un anticorps (7 kDa, contre 150-200 kDa pour une IgG complète). La révélation par anticorps secondaire surajoute à l'encombrement stérique de l'anticorps primaire alors que la révélation de la toxine utilise des molécules de petite taille (streptavidine, particules d'or).



Fig. 2. Détection de l'AChE dans la même JNM à l'aide d'un anticorps anti-AChE (rouge) et de la Fas2 (vert). Les zones marquées avec la Fas2 sont plus étendues que celles marquées avec l'anticorps, suggérant que ces deux composants n'atteignent pas les mêmes AChE. Barre : 5 μ m.

Fig. 2. Detection of AChE in the same NMJ with AChE antibody (red) and Fas2 (green). The staining with Fas2 is broader than the staining with the antibody, suggesting that the two compounds do not label the same AChE. Scale : 5 μ m.

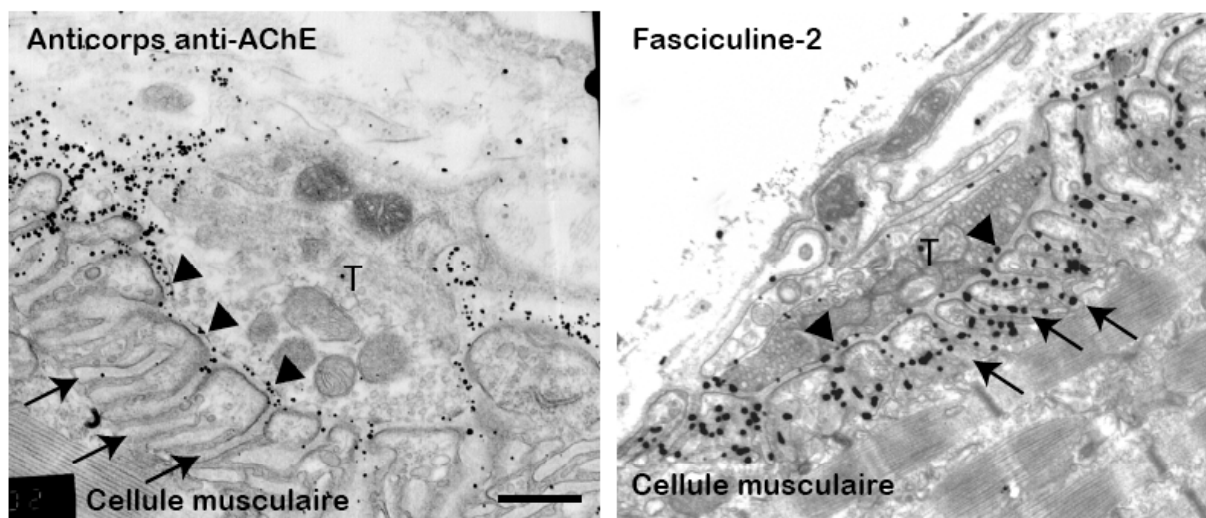


Fig. 3. Détection de l'AChE à la JNM à l'aide d'un anticorps anti-AChE et de la Fas2 en microscopie électronique. La Fas2 est biotinylée et l'anticorps anti-AChE est détecté à l'aide d'un anticorps secondaire biotinylé. Dans les deux cas, les muscles sont incubés dans la streptavidine couplée à l'or (Nanoprobes, 1,4 nm), puis la taille des particules d'or est augmentée par intensification à l'argent. Avec l'anticorps, l'AChE est détectée presque uniquement au niveau de la fente primaire (têtes de flèches), alors qu'avec la Fas2 le marquage atteint le fond des plis de la JNM (flèches). Barre : 400 nm.

Fig. 3. Detection of AChE in the NMJ with AChE antibody and Fas2 by electron microscopy. The Fas2 is biotinylated and the AChE antibody is revealed with a biotinylated secondary antibody. In both case, the muscles are incubated with gold streptavidin (Nanoprobe, 1.4 nm), then the size of the gold particles is increased by silver enhancement. With the antibody, AChE is labelled almost only in the primary fold (arrow heads) whereas with biot-Fas2, the labelling goes to the deep of the folds (arrows). Scale : 400 nm.

Une meilleure résolution spatiale en microscopie électronique

La révélation de l'activité AChE en microscopie électronique est possible mais difficile pour plusieurs raisons : (1) la morphologie est mal conservée avec l'utilisation de la méthode de Koelle ou de ses dérivés, des résultats ont été obtenus utilisant des substrats moins spécifiques que l'acétylthiocholine ; (2) la haute densité en sites catalytiques entraîne un dépôt très rapide et non homogène des produits de réaction. Plusieurs stratégies ont été développées pour réduire la réaction, l'une des plus élégantes consistant à diluer l'acétylthiocholine par l'ACh. Comme nous l'avons discuté précédemment, la révélation de la radioactivité limite la résolution spatiale et celle par l'anticorps la pénétration dans les replis sous-synaptiques. L'utilisation de la biot-Fas2 apparaît comme une méthode de choix pour localiser l'AChE en microscopie électronique au niveau de la JNM. La possibilité de marquer la Fas2 directement avec l'or ouvre de nouvelles possibilités pour un marquage simple et efficace de l'AChE.

Le marquage *in vivo* améliore la fixation de la toxine sur l'AChE et sa distribution dans les tissus

La Fas2 pénètre l'ensemble de l'organisme après injection dans la souris et inhibe la majorité de l'AChE extraite du muscle et prévient la révélation du marquage de l'AChE par la méthode de Koelle (Rodriguez-Ithurralde *et al.*, 1983). Comme la toxine non marquée, la biot-Fas2, peut être injectée directement dans l'animal par voie intrapéritonéale ou intraveineuse. L'injection intraveineuse permet de limiter la quantité de Fas2 injectée, ainsi l'injection de 7 µg par souris de 20 g permet un remarquable marquage de toutes les JNM de l'ensemble des muscles, et non pas simplement le marquage des JNM en surface obtenu par incubation de la toxine sur le muscle.

La biot-Fas2 ne permet pas de détecter certaines populations d'AChE

Les résultats précédents montrent que biot-Fas2 est un remarquable outil pour détecter, localiser et quantifier l'AChE principalement au niveau des JNM. Cependant la toxine n'est pas l'outil absolu.

La sensibilité de la détection est faible et ne permet pas de détecter l'AChE dans le cerveau

Alors que la visualisation de l'AChE au niveau de la JNM est particulièrement efficace avec la biot-Fas2, il est pratiquement impossible de détecter l'AChE dans le cerveau à l'aide de la biot-Fas2, à moins d'utiliser une amplification du signal qui nuit à sa spécificité. Il est probable que cette différence soit due à une faible densité de sites AChE à la surface des neurones comparée à la haute densité dans la JNM. Ainsi plusieurs éléments augmentent la densité au niveau de la JNM : (1) l'AChE est majoritairement accumulée sous forme de bouquets de 12 sous-unités catalytiques associées au collagène Q (Feng *et al.*, 1999) alors que ce sont des tétramères sur les neurones ; (2) la géométrie de la JNM avec des plis assure une amplification du signal lorsque la JNM est vue de face ; (3) le collagène Q assure la formations d'amas d'AChE dans la lame basale. Puisque dans le cerveau, l'AChE est localisée sur la membrane plasmique par une petite protéine transmembranaire PRiMA, il est possible que l'absence de marquage résulte de cette association. Ce n'est cependant pas le cas : (1) l'injection de Fas2 dans le cerveau entraîne des altérations fonctionnelles en accord avec l'inhibition de

l'AChE (Dajas-Bailador *et al.*, 1996) ; (2) la fasciculine 3 et Fas2 inhibent l'enzyme extraite du cerveau de rat ; (3) des cellules co-transfectées avec PRiMA et l'AChE sont parfaitement visualisées par la Fas2 (Perrier *et al.*, 2002).

La Fas2 ne passe pas la barrière hématoencéphalique

Alors que l'injection est remarquablement efficace pour marquer l'AChE dans toutes les JNM, la toxine ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique. L'accessibilité est donc également moins efficace dans le cerveau.

La Fas2 marquée pour suivre la dynamique de l'AChE *in vivo* dans une unique JNM

Une propriété remarquable de la Fas2 est sa très lente dissociation de l'AChE dans les analyse *in vitro*, rendant l'interaction très stable, pratiquement irréversible. Nous avons donc évalué si la Fas2 ne permettait pas simplement de visualiser et quantifier l'AChE à un moment donné mais de suivre au cours du temps le marquage (intensité, localisation) ou l'apparition d'un marquage. Nous souhaitons savoir s'il était possible de suivre ainsi au cours du temps la dynamique de l'AChE avec la Fas2 marquée comme l'avait été celle du récepteur nicotinique avec la bungarotoxine marquée (Akaaboune *et al.*, 1999). Pour ces études, nous utilisons une procédure classique d'incubation du muscle exposé avec la toxine. Les JNM de surface sont observées et la fluorescence est quantifiée sur la même JNM identifiée par sa morphologie unique.

La Fas2 marquée permet de suivre la dynamique de l'AChE *in vivo*

Dans une première approche nous avons utilisé la Fas2 marquée par Alexa 594 (A594) puis la biot-Fas2 pour une série de tests. *In vivo*, le marquage persiste des semaines. Il est possible de saturer l'ensemble des sites dans une JNM par application de 1 µM de A594-Fas2 (rouge) pendant au moins 3 h. Pour s'assurer de la saturation, après lavage, l'incubation est poursuivie avec de la Fas2 marquée par Alexa 488, A488-Fas2 (vert). Aucun marquage vert n'est observé. Après une période de 3 jours, il persiste environ 50% du marquage initial et après une semaine, 37%.

Pour savoir si la disparition du marquage correspond à une disparition de l'AChE ou bien à une dissociation de Fas2 et à sa diffusion de la JNM, nous avons réalisé de nombreux contrôles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Le muscle intact fixé au PFA 2% est traité comme *in vivo*, avec saturation avec A594-Fas2 (rouge) et incubation dans un tampon phosphate pendant plusieurs semaines. Pour savoir si la toxine s'est dissociée, nous appliquons A488-Fas2 (vert) et visualisons la même JNM. Dans aucun cas, nous n'observons de remplacement du marquage rouge par un marquage vert. Il faut noter que ce n'est pas parce qu'il reste du fixateur, en effet le marquage peut être déplacé en utilisant le BW284c51 un inhibiteur compétitif (Martinez-Pena y Valenzuela *et al.*, 2005). Il est également possible de quantifier la fluorescence au cours du temps lorsque le muscle est fixé et conservé dans un tube ou réimplanté dans le cou de la souris vivante, après saturation et lavage. La diminution de la fluorescence est de l'ordre de 10% pour le tissu fixé et conservé *in vitro* et de 15% pour le tissu fixé et implanté. Lorsque la synapse est vivante, la perte est de 63%.

Lorsque la JNM est saturée avec de la Fas2 non marquée, après quelques heures, l'application de A594-Fas2 entraîne un marquage fluorescent faible mais quantifiable, suggérant qu'après ce temps court, de nouvelles molécules d'AChE se sont insérées dans la JNM. Pour démontrer qu'il s'agit bien d'une nouvelle synthèse et non pas simplement de la dissociation de la Fas2, nous avons réalisé cette expérience *ex-vivo* avec le diaphragme. Le muscle est cultivé pendant 24 h sans ou avec cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse des protéines. Après 24 h, la fluorescence est détectée dans les muscles non traités et absente dans les muscles traités. Ainsi le nouveau marquage dépend de la synthèse d'AChE et non pas de la dissociation de la toxine. Lorsque nous avons remplacé la Fas2 directement marquée par un fluorophore par la biot-Fas2 révélée avec la streptavidine fluorescente, nous avons observé une meilleure stabilité de la biot-Fas2. En particulier, alors que le BW284c51 déplace complètement la toxine marquée directement, le BW284c51 ne déplace pratiquement pas la biot-Fas2, probablement à cause de la tétravalence de la streptavidine, laquelle connecte 4 biotines. La dynamique *in vivo* de l'AChE suivie par ces 2 toxines est cependant identique, probablement car la densité en site AChE est très élevée dans la matrice extracellulaire.

Cette stabilité du marquage dans une JNM intacte contraste avec l'analyse que nous avons faite sur du muscle congelé et coupé à froid puis incubé avec la Fas2. Dans des coupes, le marquage disparaît rapidement comme l'a aussi remarqué le groupe de Rotundo (Rotundo *et al.*, 2008). L'origine de ces différences pourrait dépendre de la destruction de l'AChE dans un tissu non fixé, coupé et maintenu dans un tampon non physiologique. Nous avons ainsi observé que la dissection d'un muscle de Mammifère dans des conditions physiologiques (Ringer oxygéné à froid) prévient la dégradation des formes asymétriques d'AChE dans lesquelles 12 sous unités catalytiques sont associées à un trimère de collagène Q. Ces complexes sont ceux qui sont accumulés dans la JNM. Il est donc probable que la diminution du marquage dans les coupes à froid résulte de la dégradation de l'AChE et non pas de la dissociation de la toxine et sa diffusion.

Pour conclure, la disparition de la fluorescence ne résulte, ni de la diffusion de la streptavidine, ni de celle de la Fas2, mais de la disparition de l'enzyme de la JNM. Il faut noter que contrairement au récepteur nicotinique à l'ACh marqué par la bungarotoxine biotinylée (biot-bung), l'AChE n'est pas recyclée (Bruneau et Akaaboune, 2006). La population recyclée est identifiée de la manière suivante : après saturation du récepteur avec biot-bung puis A594-streptavidin, au cours de l'endocytose le complexe récepteur/biot-bung/streptavidine perd la streptavidine avant d'être recyclé sur la membrane (Bruneau et Akaaboune, 2006).

L'insertion rapide d'AChE dans la JNM révélée par la Fas2

Alors que l'analyse avec le DFP semblait indiquer un délai de plusieurs jours avant l'apparition de nouvelles molécules d'AChE dans la JNM, nos analyses avec la Fas2 montrent une insertion d'AChE dès 4 h après saturation des sites avec la Fas2 non marquée. Cette insertion dépend de l'activité musculaire et en particulier du calcium intracellulaire (Martinez-Pena y Valenzuela *et al.*, 2005). Les différences sont probablement dues à différentes particularités de la détection par la Fas2 comparée au DFP : (1) le marquage avec la Fas2 est plus

sensible du fait du cycle complexe du DFP ; (2) la Fas2 bloque uniquement l'AChE exposée et pas les molécules en cours de synthèse ; (3) le DFP est liposoluble et particulièrement difficile à laver ; (4) le DFP bloque toutes les hydrolases à sérines et peut affecter d'autres événements cellulaires nécessaires à l'insertion d'AChE. La Fas2 permet une détection assez sensible, ne marque que l'AChE exposée, se lave facilement des tissus et sa cible est extrêmement spécifique.

La quantité d'AChE est stable mais les molécules sont renouvelées rapidement

Pour quantifier la dynamique de l'AChE, il est nécessaire d'utiliser la même A594-Fas2 pour marquer l'AChE. Après la saturation initiale, la fluorescence de la même JNM est mesurée au cours du temps, après 1, 2, 3 ou 7 jours dans la même JNM. A chaque temps, la saturation de nouveau avec de la A594-Fas2 permet de marquer les AChE nouvellement insérées. Il apparaît qu'au cours du temps, la quantité d'AChE est constante mais des molécules d'AChE disparaissent et autant de nouvelles molécules sont insérées. Il est intéressant de noter que l'utilisation de fasciculine et bungarotoxine marquées avec des fluorophores de couleurs différentes permet de montrer des voies d'élimination communes (Krejci *et al.*, 2006).

La Fas2 inhibe l'activité catalytique de l'AChE et modifie ses propriétés d'interaction

Lors des études *in vivo* de la dynamique de l'AChE, les effets observés peuvent dépendre de l'excès d'ACh induit par l'inhibition de l'AChE par la fasciculine. Ainsi, la saturation de l'AChE par la Fas2 entraîne une augmentation de la concentration d'ACh dans la fente synaptique, qui provoque l'augmentation du temps de la dépolarisation de la membrane post-synaptique, mais aussi l'augmentation des contenus quantiques (Minic *et al.*, 2002). La conséquence directe est aussi une augmentation de la dynamique des récepteurs nicotiniques à l'ACh.

L'interaction de la Fas2 modifie aussi l'interaction et l'insertion d'AChE dans la JNM comme le montre l'expérience suivante. Huit heures après saturation de l'AChE avec la Fas2, la JNM a perdu environ 20% du marquage, et l'ajout de Fas2 restaure le marquage à 100%. Par contre le remplacement toutes les 2 h de la solution de Fas2 entraîne après 8 h une perte de 40% du marquage, alors que nous attendions une conservation du nombre de sites puisque les AChE perdues auraient dû se réinsérer. Nous pouvons proposer que la fixation de la Fas2 sur l'AChE empêche son insertion dans la JNM (Krejci *et al.*, 2006).

Ces propriétés des toxines limitent donc l'utilisation de ces outils pour une analyse physiologique, puisque les toxines affectent les comportements des protéines.

Matériel et méthodes

Marquage de la fasciculine

La Fas2 (Latoxan) est marquée de manière covalente sur les NH₂ libres en utilisant des dérivés NHS-XX. Dans les protéines matures, les résidus NH₂ libres sont présents sur les chaînes latérales des résidus de lysine et sur l'extrémité N-terminale de la chaîne carbonée. Puisque certaines des lysines de la Fas2 participent à l'interaction avec l'AChE, les conditions de marquage doivent limiter la modification de ces résidus pour efficacement dériver

le NH₂ de l'extrémité N-terminale. Cette spécificité est obtenue en réalisant la réaction à pH 7,2, en se basant sur la différence des valeurs de pK_a des résidus lysine et du N-terminal.

D'un point de vue pratique, la Fas2 est solubilisée dans un tampon Hepes 20 mM à pH 7,2 à une concentration supérieure à 1,5 mg/mL. Le dérivé actif NHS-XX-biotin (Sigma), NHS-XX-Alexa (Molecular Probe) est ajouté dans un rapport molaire marqueur/Fas2 de 2:1. Après 1h30 d'incubation sous agitation et à température ambiante, la toxine est séparée des molécules non incorporées à l'aide d'une colonne NAP5 (Amersham Biosciences).

Le sérum polyclonal de lapin anti-AChE a été obtenu par Marsh (Marsh *et al.*, 1984).

Animaux

Les souris sont des hybrides F1 B6D2, animaux élevés avec un cycle jour nuit 12h-12h et avec nourriture et boisson à volonté.

Préparation du matériel histologique ; trois types d'approches pour marquer l'AChE

Préparation des tissus pour les marquages ex vivo

La souris est anesthésiée, et est perfusée par voie transcardiaque avec du sérum physiologique (NaCl 0,9%) puis un fixateur [paraformaldéhyde (PFA) 2%], auquel est ajouté du glutaraldéhyde (0,2%) lorsque des expériences de microscopie électronique sont envisagées. Le cerveau et les muscles sont prélevés, incubés une nuit dans le PFA 2% seul, puis stockés dans du PBS supplémenté en azide de sodium 0,03% jusqu'à utilisation. Les muscles sont disséqués en faisceaux de fibres et le cerveau est débité en coupes de 70 µm d'épaisseur à l'aide d'un vibratome.

L'AChE est détectée sur ces coupes flottantes de cerveau et sur les fibres musculaires, par différentes techniques.

Marquage général par la fasciculine in vivo

La Fas2 (350 µg/kg) est injectée par voie intraveineuse. Dans ce cas, la Fas2 passe dans la circulation générale et se fixe notamment au niveau de toutes les JNM de l'organisme. Après un délai de 2h, les animaux sont préparés comme précédemment. La Fas2 ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique, l'AChE du cerveau ne peut pas être détectée par cette technique.

Marquage d'un muscle spécifique et saturation des sites

Les analyses sont faites sur le sternomastoïdien, un muscle du cou facilement accessible. Après anesthésie, la souris est placée en décubitus dorsal sur la platine d'un microscope adapté. Après incision de la peau du cou, le muscle est disséqué et une cuvette est confectionnée à l'aide de la peau et des tissus voisins. Cette cuvette permet l'incubation de solutions, dont la Fas2 marquée ou non, au contact des JNM situées au milieu des fibres musculaires (Akaaboune *et al.*, 1999). La JNM marquée peut être visualisée à l'aide d'un microscope droit équipé d'un système d'analyse d'images. La dynamique de l'AChE peut être suivie pendant plusieurs jours. Dans ce cas, l'incision est suturée après chaque observation et le rétablissement de la souris est attendu avant toute nouvelle session de travail.

Références bibliographiques

Akaaboune M., Culican S.M., Turney S.G., Lichtman J.W. (1999)

Rapid and reversible effects of activity on acetylcholine receptor density at the neuromuscular junction *in vivo*. *Science* 286:503-7.

Anglister L., Eichler J., Szabo M., Haesaert B., Salpeter M.M. (1998) 125I-labeled fasciculin 2: a new tool for quantitation of acetylcholinesterase densities at synaptic sites by EM-autoradiography. *J. Neurosci. Methods* 81:63-71.

Bernard V., Decossas M., Liste I., Bloch B. (2006) Intraneuronal trafficking of G-protein-coupled receptors *in vivo*. *Trends Neurosci.* 29:140-7.

Bourne Y., Taylor P., Marchot P. (1995) Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: crystal structure of the complex. *Cell* 83:503-12.

Bruneau E.G., Akaaboune M. (2006) The dynamics of recycled acetylcholine receptors at the neuromuscular junction *in vivo*. *Development* 133:4485-93.

Dajas-Bailador F., Costa G., Emmett S., Bonilla C., Dajas F. (1996) Acetylcholinesterase inhibitors block acetylcholine-evoked release of dopamine in rat striatum, *in vivo*. *Brain Res* 722:12-18.

Eastman J., Wilson E.J., Cervenansky C., Rosenberry T.L. (1995) Fasciculin 2 binds to the peripheral site on acetylcholinesterase and inhibits substrate hydrolysis by slowing a step involving proton transfer during enzyme acylation. *J. Biol. Chem.* 270:19694-701.

Feng G., Krejci E., Molgó J., Cunningham J.M., Massoulié J., Sanes J.R. (1999) Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J. Cell. Biol.* 144:1349-60.

Harel M., Kleywegt G.J., Ravelli R.B., Silman I., Sussman J.L. (1995) Crystal structure of an acetylcholinesterase-fasciculin complex: interaction of a three-fingered toxin from snake venom with its target. *Structure* 3:1355-66.

Karlsson E., Mbugua P.M., Rodriguez-Ithurralde D. (1984) Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps*. *J. Physiol. (Paris)* 79:232-40.

Krejci E., Martinez-Pena y Valenzuela I., Ameziane R., Akaaboune M. (2006) Acetylcholinesterase dynamics at the neuromuscular junction of live animals. *J. Biol. Chem.* 281:10347-54.

Mallender W.D., Szegletes T., Rosenberry T.L. (1999) Organophosphorylation of acetylcholinesterase in the presence of peripheral site ligands. Distinct effects of propidium and fasciculin. *J. Biol. Chem.* 274:8491-9.

Marchot P., Khelif A., Ji Y.H., Mansuelle P., Bougis P.E. (1993) Binding of 125I-fasciculin to rat brain acetylcholinesterase. The complex still binds diisopropyl fluorophosphate. *J. Biol. Chem.* 268:12458-67.

Marsh D., Grassi J., Vigny M., Massoulié J. (1984) An immunological study of rat acetylcholinesterase: comparison with acetylcholinesterases from other vertebrates. *J. Neurochem.* 43:204-13.

Martinez-Pena y Valenzuela I., Hume R.I., Krejci E., Akaaboune M. (2005) *In vivo* regulation of acetylcholinesterase insertion at the neuromuscular junction. *J. Biol. Chem.* 280:31801-8.

Minic J., Molgó J., Karlsson E., Krejci E. (2002) Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase. *Eur. J. Neurosci.* 15:439-48.

Peng H.B., Xie H., Rossi S.G., Rotundo R.L. (1999) Acetylcholinesterase clustering at the neuromuscular junction involves perlecan and dystroglycan. *J. Cell. Biol.* 145:911-21.

Perrier A.L., Massoulié J., Krejci E. (2002) PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron* 33:275-85.

Radic Z., Taylor P. (2001) Interaction kinetics of reversible inhibitors and substrates with acetylcholinesterase and its fasciculin 2 complex. *J. Biol. Chem.* 276:4622-33.

Radic Z., Duran R., Vellom D.C., Li Y., Cervenansky C., Taylor P. (1994) Site of fasciculin interaction with acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* 269:11233-9.

Rodriguez-Ithurralde D., Silveira R., Barbeito L., Dajas J. (1983) Fasciculin, a powerful anticholinesterase polypeptide from *Dendroaspis angusticeps* venom. *Neurochem. Intern.* 5:267-74.

- Rogers A.W., Darzynkiewicz Z., Salpeter M.M., Ostrowski K., Barnard E.A. (1969) Quantitative studies on enzymes in structures in striated muscles by labeled inhibitor methods. I. The number of acetylcholinesterase molecules and of other DFP-reactive sites at motor endplates, measured by radioautography. *J. Cell. Biol.* 41:665-85.
- Salpeter M.M. (1969) Electronic microscope radioautography as a quantitative tool in enzyme cytochemistry. II. The distribution of DFP-reactive sites at motor endplates of a vertebrate twitch muscle. *J. Cell. Biol.* 42:122-34.
- Sun M., Lee C.J., Shin H.S. (2007) Reduced nicotinic receptor function in sympathetic ganglia is responsible for the hypothermia in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J. Physiol.* 578:751-64.
- Tago H., Kimura H., Maeda T. (1986) Visualization of detailed acetylcholinesterase fiber and neuron staining in rat brain by a sensitive histochemical procedure. *J. Histochem. Cytochem.* 34:1431-8.
- Tsuji S., Larabi Y. (1983) A modification of thiocholine-ferricyanide method of Karnovsky and Roots for localization of acetylcholinesterase activity without interference by Koelle's copper thiocholine iodide precipitate. *Histochemistry* 78:317-23.
-

Nouvelles observations appuyant le rôle de la toxine STb d'*Escherichia coli* dans la diarrhée chez l'Homme

Marie-Astrid ALBERT, J. Daniel DUBREUIL*

Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada.

* Auteur correspondant ; Tél : (450) 773-8521 #18433 ; Fax : (450) 778-8108 ;

Courriel : daniel.dubreuil@umontreal.ca

Résumé

Les *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC) sécrètent plusieurs toxines. Les entérotoxines LT (thermolabile) et STa (thermostable) sont responsables de diarrhées sévères chez l'Homme et les animaux. La toxine STb (thermostable) est synthétisée par certaines souches ETEC qui produisent aussi fréquemment LT et STa. Les souches synthétisant uniquement STb ont toutefois permis de confirmer son rôle dans la diarrhée porcine. Les souches possédant le gène de la toxine sont rencontrées chez plusieurs espèces animales dont l'Homme et elles sont sporadiquement isolées de cas de diarrhée humaine. D'autres toxines étant souvent produites simultanément, une relation de cause-à-effet n'a pu être clairement établie. Dans cette mini-revue, nous revoyons les résultats de diverses études, pour et contre un rôle de STb dans la diarrhée humaine.

New observations supporting the role of *Escherichia coli* heat-stable toxin b (STb) in human diarrhea

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) produce several types of enterotoxins. Heat-labile (LT) and heat-stable enterotoxin a (STa) are responsible for severe diarrhea in humans and animals. Heat-stable enterotoxin b (STb) is produced by some ETEC strains which secrete also frequently LT and STa. Strains synthesizing only STb confirmed its role as a porcine diarrheal agent. The toxin or STb-encoding gene were identified in numerous animal species and humans. Although found in human isolates, the STb toxin and/or its gene were observed sporadically in patients suffering from diarrhea. Considering that other toxins are often produced simultaneously, a causal relationship could not be clearly established. In this minireview, we re-examine results from various studies, for and against a role of STb in human diarrhea.

Keywords : *Escherichia coli*, STb enterotoxin, diarrhea, human.

Introduction

Les souches entérotoxigènes d'*Escherichia coli* (ETEC) sont responsables de diarrhées chez plusieurs espèces animales dont l'Homme. Une perturbation de l'homéostasie des fluides intestinaux survient suite à la libération d'entérotoxines par ces souches bactériennes. La diarrhée aqueuse résultante, très inconfortable chez l'Homme adulte, peut être plus sévère chez l'enfant. Elle engendre également des retards de croissance et/ou le décès d'animaux. Les ETEC produisent isolément ou en même temps quatre toxines, une sensible (LT) et trois résistantes à la chaleur (STa, STb et EAST1 pour *heat-stable toxin 1*).

Épidémiologie de la toxine STb

La toxine STb, peptide de 48 acides aminés, est une des toxines des ETEC impliquées dans la diarrhée chez l'animal, en particulier chez le porc, où son incidence est de 72,6% chez les souches possédant au moins un type de fimbriae (Zhang *et al.*, 2007). STb fut mise en évidence par Burgess *et al.* (1978). Elle diffère de la toxine STa par ses propriétés biochimiques ainsi que par son spectre d'activité toxique dans les segments

ligaturés d'intestins animaux et le test du souriceau nouveau-né.

Le rôle des toxines LT et STa dans la diarrhée animale et humaine est bien connu, en particulier chez les enfants des pays en développement et les voyageurs (Fairbrother *et al.*, 2005 ; Qadri *et al.*, 2005). La toxine STb a été initialement observée en association avec des souches isolées de porcs malades. Depuis, plusieurs souches de *E. coli* où on retrouve le gène codant pour STb (*estB*) furent mises en évidence chez divers animaux incluant les bovins (dont le bœuf d'eau), le poulet, le chien, le chat, le furet, le cheval et l'Homme (Akashi *et al.*, 1993 ; Holland *et al.*, 1996 ; Dubreuil, 2006a). Toutefois, la présence de ces souches n'était pas toujours associée à une diarrhée, certaines étant retrouvées chez l'animal apparemment sain (Dubreuil, 1997 ; Holland *et al.*, 1996). Les souches exclusivement positives pour STb et associées à une diarrhée aqueuse, semblent cependant indiquer un rôle de cette toxine chez d'autres animaux que le porc, même si leur incidence est faible (Dubreuil, 1997).

Berberov *et al.* (2004) ont évalué les signes cliniques après administration chez des porcelets de souches *E. coli* F4-positives (un facteur de colonisation retrouvé dans les isolats porcins) produisant différentes combinaisons de

toxines (souches isogéniques) (Figure 1). Ainsi, lorsque la souche produisant les toxines LT, STb et EAST1 est inoculée oralement, 100% des animaux présentent une colibacilliose avec une diarrhée déshydratante. D'autre part, 60% des porcelets inoculés avec une souche EAST1- et STb-positive présentent le même type de déshydratation. L'effet toxique est donc additif chez la souche produisant les trois entérotoxines. Dans cette étude, la toxine STa n'a pas été étudiée. Ces résultats soutiennent l'hypothèse de la contribution importante de STb à la diarrhée porcine. Plus récemment, une étude a démontré que, dans des anses ligaturées de porcelets gnotobiotiques, les toxines LT et STa ont une toxicité comparable (Zhang *et al.*, soumis).

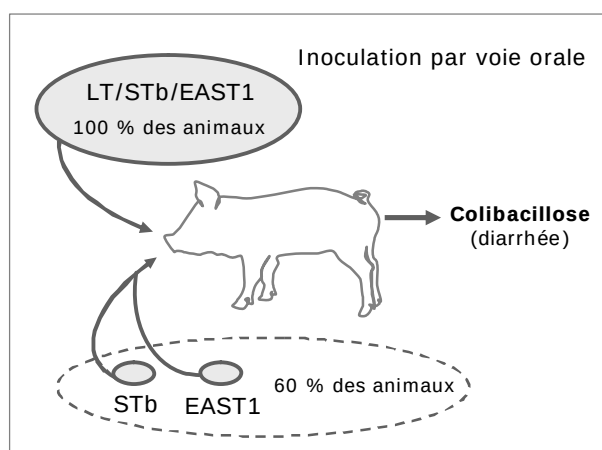


Fig. 1. Signes cliniques observés chez le porcelet suite à l'administration orale de souches ETEC F4-positives isogéniques présentant différents profils toxigéniques (Berberov *et al.*, 2004).

Fig. 1. Clinical signs observed in piglets after oral inoculation of isogenic ETEC F4-positive strains producing different combinations of toxins (Berberov *et al.*, 2004).

Chez l'Homme, la prévalence du gène *estB* est faible et les souches décrites dans les études produisent, en plus de STb, soit la toxine LT ou STa, soit les deux (Lortie *et al.*, 1991 ; Handl et Flock, 1992 ; Okamoto *et al.*, 1993 ; Dubreuil, 1997). Cependant, les isolats identifiés correspondent aux sérotypes toxigéniques trouvés chez le porc mais ne possèdent pas de facteurs de colonisation de l'intestin porcine et humaine connus (Lortie *et al.*, 1991). En 2003, Ngeleka *et al.* ont observé qu'un cinquième des isolats de *E. coli* issus de porcelets diarrhéiques présentaient deux nouveaux pathotypes soit AIDA-I/STb/EAST1 ou AIDA-I/STb, et étaient négatifs pour les antigènes fimbriaires porcins classiques dont le F4. Ces isolats induisaient la maladie lors d'infection expérimentale de porcelets. AIDA-I (*Adhesin Involved in Diffuse Adherence*) est une protéine membranaire de 100 kDa responsable de l'adhérence diffuse des bactéries aux cellules épithéliales de l'hôte. Ce marqueur de virulence et son gène furent observés initialement chez une souche de *E. coli* isolée d'un cas de diarrhée infantile humaine (Benz et Schmidt, 1989 ; 1992). Des porcelets privés de colostrum inoculés avec une souche AIDA-I/STb ont développé des symptômes de diarrhée en 16-20h tandis que la même souche mutée pour AIDA-I ne provoquait pas de symptômes de la maladie (Ravi *et al.*, 2007). Le gène codant pour AIDA-I est plus prévalent dans les isolats de porcs malades (26%) que dans les isolats humains (2-4%) (Niewerth *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2007). Enfin, les adhésines AIDA-I d'origine porcine et humaine partagent 78 à 87% d'homologie au niveau de

leur séquence primaire (Fang *et al.*, 2005). Le peu de souches STb-positives identifiées chez l'Homme malade supporte l'hypothèse d'un rôle occasionnel de la toxine STb dans la diarrhée humaine. Le fait que les séquences des toxines LT et STa trouvées dans les isolats humains correspondent à celles associées au porc suggère que la colonisation de l'intestin humain surviendrait à partir d'un réservoir animal (zoonose), le porc par exemple, via la nourriture contaminée ou les excréments animaux. La prévalence d'AIDA-I dans les isolats porcins et l'homologie de séquence entre AIDA-I porcine et humaine semblent également confirmer cette hypothèse.

Les toxines LT et STa retrouvées chez les souches humaines (h) diffèrent légèrement en séquence de celles isolées chez l'animal (p) comme la nomenclature en fait foi (i.e. LTh, LTp, STah et STap), même si LTp et STap sont aussi retrouvés chez l'Homme (Lortie *et al.*, 1991 ; Handl et Flock, 1992 ; Okamoto *et al.*, 1993 ; Dubreuil, 2006b). Pour STb par contre, il ne semble exister qu'un seul type de toxine, observé autant chez l'animal que chez l'Homme (Lortie *et al.*, 1991 ; Okamoto *et al.*, 1993). La séquence de STb ne peut donc pas permettre de différencier l'origine des souches de *E. coli*. Nous avons toutefois récemment identifié un variant de STb retrouvé chez certaines souches porcines, mais sa toxicité n'a pas encore été évaluée (Taillon *et al.*, sous presse dans *Journal of Medical Microbiology*).

Le récepteur pour STb

Une molécule agissant comme récepteur pour la toxine STb a été identifiée. Il s'agit du sulfatide, glycosphingolipide présent à la surface des cellules épithéliales intestinales du porc (Rousset *et al.*, 1998a). Cette molécule est aussi présente à la surface de plusieurs autres types cellulaires retrouvés dans différents organes. Chez le porcelet, outre l'intestin (duodénum, jéjunum, iléon, caecum et colon), le foie, les poumons, la rate et les reins démontrent un attachement vis-à-vis de la toxine STb (Rousset *et al.*, 1998b). Le sulfatide est présent dans la membrane cellulaire chez plusieurs animaux, dont l'Homme, au niveau de l'épithélium intestinal (Delacour *et al.*, 2005).

Physiopathologie de la toxine STb

L'équipe de notre laboratoire a montré l'internalisation de la toxine STb dans des cellules épithéliales intestinales et fibroblastiques de rat, de porc et de souris (Labrie *et al.*, 2002 ; Penel *et al.*, 2005 ; Dubreuil, 2006a) et la perméabilisation qui en résulte (Beausoleil *et al.*, 2002 ; Gonçalves *et al.*, 2007). Le modèle des anses ligaturées de rat a révélé que l'internalisation de STb est essentielle à l'expression de sa toxicité et donc à la diarrhée (Labrie *et al.*, 2002). La lignée cellulaire épithéliale HT-29, issue du colon humain, a également permis de mettre en évidence la liaison de STb à la membrane cellulaire et sa distribution dans le cytoplasme (Chao et Dreyfus, 1997). Récemment, nous avons pu observer par analyse en cytométrie en flux l'internalisation de STb dans des cellules mammaires humaines (Albert et Dubreuil, non-publié). À l'aide de vésicules de la bordure en brosse de jéjunum de porcelets, la formation de pores non-spécifiques par cette toxine a aussi pu être démontrée (Gonçalves *et al.*, 2007). Beausoleil *et al.* (2002) avaient déjà constaté l'internalisation accrue du bleu de Trypan via ces pores dans des cellules en culture traitées par STb, dont les HT-29. Cette même lignée cellulaire répondait à STb par une augmentation de calcium intracellulaire comme cela a également été démontré

chez des cellules de chien (Madin-Darby Canine Kidney) et de rat (cellules pituitaires primaires) (Dreyfus *et al.*, 1993). Pour que STb agisse, il doit donc reconnaître son récepteur, le sulfatide, et être ensuite internalisé probablement après la formation de pores transitoires non-spécifiques. Ces données confirment encore la présence du récepteur et les effets biologiques de la toxine STb, non seulement chez des cellules d'espèces animales différentes dont l'Homme, mais aussi chez des cellules d'origines tissulaires différentes.

Dans les chambres de Ussing, Weikel *et al.* (1986) ont observé que le surnageant d'une culture de la souche porcine P16 qui produit exclusivement STb n'est pas actif sur l'iléon prélevé chez l'Homme adulte (deux individus). Ils ont conclu de cette observation limitée, que l'iléon humain adulte ne peut répondre à STb, cela dû à l'absence de récepteur spécifique à l'entérotoxine dans ce tissu. Les tests n'ont cependant pas été réalisés chez l'enfant ou sur d'autres sections de l'intestin adulte. Chez le rat en effet, l'intensité des sécrétions varie selon le segment intestinal traité (Harville et Dreyfus, 1995). Maintenant que la nature chimique du récepteur pour STb et sa présence au niveau des cellules épithéliales de l'intestin humain sont connus, ces résultats seraient à reconsidérer.

L'entérotoxine STb peut causer l'accumulation de fluides dans les anses ligaturées de porcelets (Whipp, 1987) ainsi que de poulet (Akashi *et al.*, 1993), de lapin (Burgess *et al.*, 1978), de rat et de souris (Whipp, 1990; Fujii *et al.*, 1995; Harville et Dreyfus, 1995). Ce phénomène est observé chez des animaux autres que le porc et le poulet, par l'ajout à la préparation de STb testée, d'anti-trypsin, inhibiteur de la dégradation de la toxine par les protéases endogènes présentes dans la lumière intestinale en quantité variable selon l'espèce animale. Il faut cependant mentionner que cet ajout est nécessaire lorsqu'un surnageant de culture ou une préparation purifiée de STb est testé, mais non dans le cas d'une souche productrice de STb (Okamoto *et al.*, 1993). *In vivo*, l'étape préalable à l'infection par les ETEC est l'adhésion intime à l'épithélium intestinal avant la sécrétion localisée de facteurs de virulence comme les toxines. Il est donc probable que dans ces conditions, les toxines sécrétées soient protégées des enzymes intestinales par l'attachement intime de la bactérie aux entérocytes et qu'elles induisent malgré tout les perturbations cellulaires.

Au cours des nombreuses productions et purifications de la toxine STb réalisées dans notre laboratoire, nous avons observé fréquemment l'apparition rapide de diarrhée aqueuse chez les personnes dédiées à cette tâche. Malgré les mesures adoptées pour éviter ces intoxications, il semble que la manipulation de grandes quantités de toxine (plusieurs mg) a souvent pour conséquence la contamination des laborantins. Bien que d'autres causes soient possibles, cette observation quoique anecdotique pourrait plaider en faveur d'un rôle de STb dans la diarrhée humaine. Elle laisse penser que STb peut agir même en présence de protéases intestinales. Toutefois, des doses très élevées de toxine étaient en cause, pouvant expliquer qu'une certaine quantité n'était pas hydrolysée par les enzymes protéolytiques. Cette quantité de toxine résiduelle serait alors libre d'interagir avec l'épithélium intestinal.

Conclusion

Au cours de l'évolution, les bactéries ont développé un éventail de facteurs de virulence leur permettant de

s'adapter à divers hôtes et de les coloniser. La toxine STb est un facteur de virulence exprimé par les *E. coli* infectant et causant la diarrhée aqueuse chez le porc. Chez l'Homme, les toxines LT et STA sont des déterminants de virulence importants. Par contre, le faible taux de souches de *E. coli* isolées chez l'Homme atteint de diarrhée et ne produisant que la toxine STb semble aller à l'encontre d'un tropisme particulier de STb pour les tissus humains. L'homologie de séquence entre la toxine retrouvée dans les isolats diarrhéiques humains et celle associée au porc étaye également l'hypothèse que l'Homme n'est pas la cible préférentielle des *E. coli* exprimant STb. La contamination humaine à partir d'un réservoir animal est donc plus vraisemblable. La prévalence de l'adhésine AIDA-I chez le porc, un facteur de colonisation porcin ayant une grande homologie de séquence primaire avec AIDA-I humain, suggère notamment qu'une souche AIDA-I/STb pourrait être facilement transmise de l'animal à l'Homme et permettrait l'expression de la toxicité de STb chez l'humain. La toxine sécrétée rencontrerait son récepteur présent à la surface de l'épithélium intestinal de l'Homme. Elle entraînerait la diarrhée aqueuse, après internalisation, formation de pores non-spécifiques et effets intracellulaires dont une augmentation de calcium, comme observé *in vitro* avec la lignée HT-29 issue du colon humain.

En conclusion, on ne peut nier l'implication occasionnelle de la toxine STb comme agent causal de diarrhée chez l'Homme. Les études récentes apportent une meilleure compréhension des mécanismes impliqués et confirment que l'humain est une cible potentielle des *E. coli* exprimant STb.

Remerciements. Nous remercions Jacinthe Lachance pour le travail infographique.

Références bibliographiques

- Akashi N., Hitotsubashi S., Yamanaka H., Fujii Y., Tsuji T., Miyama A., Joya J. E., Okamoto K. (1993) Production of heat-stable enterotoxin II by chicken clinical isolates of *Escherichia coli*. *FEMS Microb. Lett.* 109:311-5.
- Beausoleil H.E., Labrie V., Dubreuil J.D. (2002) Trypan blue uptake by chinese hamster ovary cultured epithelial cells: a cellular model to study *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Toxicon* 40:185-91.
- Benz I., Schmidt M.A. (1989) Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57:1506-11.
- Benz I. et Schmidt M.A. (1992) Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). *Infect. Immun.* 60:13-8.
- Berberov E.M., Zhou Y., Francis D.H., Scott M.A., Kachman S.D., Moxley R.A. (2004) Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins. *Infect. Immun.* 72:3914-24.
- Burgess M.N., Bywater R.J., Cowley C.M., Mullan N.A., Newsome P.M. (1978) Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.* 21:526-31.
- Chao K.L., Dreyfus L.A. (1997) Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B with cultured human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 65:3209-17.
- Delacour D., Gouyer V., Zanetta J. P., Drobecq H., Leteurtre E., Grard G., Moreau-Hannedouche O., Maes E., Pons A., Andre S., Le Bivic A., Gabius H.J., Manninen A., Simons K., Huet G. (2005) Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J. Cell Biol.* 169:491-501.

- Dreyfus L.A., Harville B., Howard D.E., Shaban R., Beatty D. M., Morris S.J. (1993) Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (ST_B). *Proc. Nat. Acad. Sc. USA* 90:3202-6.
- Dubreuil J.D. (1997) *Escherichia coli* STb enterotoxin. *Microbiology* 143:1783-95.
- Dubreuil J.D. (2006a) *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b. In: Alouf J.E. et Popoff M.R., *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, third edition*, Elsevier, London, pp. 491-503.
- Dubreuil J. D.(2006b) *Escherichia coli*, *Vibrio*, and *Yersinia* species heat-stable enterotoxins. In: Alouf J.E. et Popoff M.R., *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, third edition*, Elsevier, London, pp. 798-817.
- Fairbrother J.M., Nadeau E., Gyles C.L. (2005) *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim. Health Res. Rev.* 6:17-39.
- Fang Y., Ngeleka M., Middleton D.M., Simko E. (2005) Characterization and immuno-detection of AIDA-I adhesin isolated from porcine *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* 109:65-73.
- Fujii Y., Kondo Y., Okamoto K. (1995) Involvement of prostaglandin E2 synthesis in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* 130:259-65.
- Gonçalves C., Vachon V., Schwartz J. L., Dubreuil J. D. (2007) The *Escherichia coli* enterotoxin STb permeabilizes piglet jejunal brush border membrane vesicles. *Infect. Immun.* 75:2208-13.
- Handl C.E., Flock J.I. (1992) STb producing *Escherichia coli* are rarely associated with infantile diarrhoea. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* 10:37-8.
- Harville B.A., Dreyfus L.A. (1995) Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2 in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. *Infect. Immun.* 63:745-50.
- Holland R.E., Schmidt A., Sriranganathan N., Grimes S.D., Wilson R.A., Brown C.M., Walker R.D. (1996) Characterization of *Escherichia coli* isolated from foals. *Vet. Microbiol.* 48:243-55.
- Labrie V., Harel J., Dubreuil J.D. (2002) *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) *in vivo* internalization within rat intestinal epithelial cells. *Veterinary Research* 33:223-8.
- Lortie L.A., Dubreuil J.D., Harel J. (1991) Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 29:656-9.
- Ngeleka M., Pritchard J., Appleyard G., Middleton D.M., Fairbrother J.M. (2003) Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15:242-52.
- Niewerth U., Frey A., Voss T., Le Bouguenec C., Baljer G., Franke S., Schmidt M.A. (2001) The AIDA autotransporter system is associated with F18 and Stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 8:143-9.
- Okamoto K., Fujii Y., Akashi N., Hitotsubashi S., Kurazono H., Karasawa T., Takeda Y. (1993) Identification and characterization of heat-stable enterotoxin II-producing *Escherichia coli* from patients with diarrhea. *Microbiol. Immunol.* 37:411-4.
- Penel S.M., Le P.U., Nabi I.R., Dubreuil J.D. (2005) Etude de la voie d'endocytose empruntée par l'entérotoxine STb d'*Escherichia coli*. In: Bon C., Goudey-Perrière F., Goyffon M., Sauviat M.-P., *Toxines et douleur*, Société Française pour l'Etude des Toxines, Rencontres en toxinologie, Lavoisier-Tec&Doc, Paris, pp. 187-8.
- Qadri F., Svennerholm A.M., Faruque A.S., Sack R.B. (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin. Microb. Rev.* 18:465-83.
- Ravi M., Ngeleka M., Kim S.H., Gyles C., Berthiaume F., Mourez M., Middleton D., Simko E. (2007) Contribution of AIDA-I to the pathogenicity of a porcine diarrheagenic *Escherichia coli* and to intestinal colonization through biofilm formation in pigs. *Vet. Microbiol.* 120:308-19.
- Rousset E., Harel J., Dubreuil J.D. (1998a) Binding characteristics of *Escherichia coli* enterotoxin b (STb) to the pig jejunum and partial characterization of the molecule involved. *Microb. Pathogenesis* 24, 277-88.
- Rousset E., Harel J., Dubreuil J.D. (1998b) Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. *Infect. Immun.* 66:5650-8.
- Weikel C.S., Tiemens K.M., Moseley S.L., Huq I.M., Guerrant R.L. (1986) Species specificity and lack of production of STb enterotoxin by *Escherichia coli* strains isolated from humans with diarrheal illness. *Infect. Immun.* 52:323-5.
- Whipp S.C. (1987) Protease degradation of *Escherichia coli* heat-stable, mouse-negative, pig-positive enterotoxin. *Infect. Immun.* 55:2057-60.
- Whipp S.C. (1990) Assay for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. *Infect. Immun.* 58:930-4.
- Zhang W., Zhao M., Ruesch L., Omot A., Francis D. (2007) Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet. Microbiol.* 123:145-52.

Présence d'un variant de la toxine STb d'Escherichia coli chez certains porcs malades

Christine TAILLON, Éric NADEAU, Michaël MOUREZ, J. Daniel DUBREUIL*

Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada.

* Auteur correspondant ; Tél : (450) 773-8521 # 18433 ; Fax : (450) 778-8108 ;
Courriel : daniel.dubreuil@umontreal.ca

Résumé

L'industrie porcine subit des pertes dues aux infections à *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC). STb est une toxine stable à la chaleur produite par les ETEC et est souvent associé à des isolats porcins. Afin de cribler des altérations du gène estB, 100 souches d'ETEC isolés de porcs malades au Québec, ont été choisies aléatoirement et analysées. Vingt-trois des 100 isolats indiquaient un changement His₁₂ en Asn. Tous les 23 variants étaient aussi positifs pour l'entérotoxine STa et résistants à la tétracycline. Près de 75% (17/23) des souches produisant un STb variant étaient associées à la toxine 'shiga-like' 2 (Stx2) (5/6) et des souches STa:STb (12/17). Comme le variant pourrait avoir une toxicité accrue, il serait important de déterminer sa toxicité dans un modèle animal.

Presence of an *Escherichia coli* STb toxin variant in diseased pigs

The porcine industry bears a huge loss resulting from enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infections. STb is one of two heat-stable toxins produced by ETEC and is mostly associated with pathogenic porcine isolates. To screen for alterations at the gene level, a collection of 100 STb-positive ETEC strains isolated from diseased pigs was randomly selected and analyzed. The translated DNA sequence revealed a change from His₁₂ to Asn in 23 isolates. All 23 variant strains were also positive for STa and resistant to tetracycline. The STb variant was associated with Stx2-positive strains (5/6) and STa:STb (13/17). The toxicity of the reported variant needs to be evaluated in an animal model, as it could possibly account for a more potent toxic agent in pigs.

Keywords : *Escherichia coli*, STb enterotoxin, variant, DNA sequence, virulence factor.

Introduction

Les diarrhées chez l'homme et chez les animaux de ferme sont fréquemment dues aux infections causées par divers pathotypes d'*Escherichia coli*. Parmi ces pathotypes, les souches d'*E. coli* entérotoxigènes (ETEC) causent, entre autres, la diarrhée du voyageur, mais aussi une diarrhée plus sévère chez les jeunes enfants, surtout dans les pays en voie de développement, entraînant parfois la mort. Ces souches ont aussi de grandes répercussions en élevage en causant, entre autres, des maladies chez les veaux et les porcelets.

Les ETEC provoquent la pathologie tout d'abord par la colonisation de l'intestin en adhérant à l'épithélium et ensuite par la production de toxines. Celles-ci augmentent la sécrétion et diminuent l'absorption d'eau et d'électrolytes par les entérocytes, causant ainsi la diarrhée (Qadri *et al.*, 2005). On retrouve deux types d'entérotoxines chez les ETEC, soit les thermolabiles, comme la toxine LT, et les thermostables, comme EAST-1, STa et STb. La toxine STb est fréquemment associée aux souches porcines, quoiqu'elle ait été retrouvée à quelques occasions associée à des isolats humains (Lortie *et al.*, 1991 ; Handl et Flock, 1992 ; Okamoto *et al.*, 1993). STb est une toxine de 5,2 kDa composé de deux hélices alpha antiparallèles séparées par une boucle riche en glycine. Deux ponts disulfure

stabilisent la structure tertiaire (Sukumar *et al.*, 1995).

Ces facteurs de virulence sont codés par des gènes souvent localisés sur de grands plasmides, sur lesquels on retrouve également des gènes de résistance aux antibiotiques. D'ailleurs, les gènes des toxines STa et STb sont localisés dans les transposons Tn1681 et Tn4521, respectivement. Une étude de Fekete *et al.* (2003) a révélé que le plasmide pTC, un plasmide conjugatif de 120 kb de la souche 2173 isolé d'un porc décédé de diarrhée post-sevrage, contenait un îlot de pathogénicité sur lequel se trouvaient les gènes codant pour les entérotoxines STa et STb et un gène de résistance à la tétracycline (*tetB*). Par ailleurs, la variation d'un acide aminé dans la séquence de la toxine STb a été mise en évidence, l'histidine en position 12 étant remplacée par une asparagine (Peter Fekete et Bela Nagy, 2008, communication personnelle). De plus, cette étude a révélé que cet îlot de pathogénicité était présent dans un grand nombre de souches et était particulièrement associé aux souches positives pour le fimbriae F18.

Matériel et méthodes

Dans le but de déterminer la présence de cette variation ainsi que d'autres altérations au niveau de la séquence codante pour la toxine STb, une collection de 100 souches isolées de porcs malades a été analysée.

Les isolats provenaient de porcs nouveaux-nés et sevrés de différentes fermes de diverses régions du Québec. Ces souches, toutes positives pour le gène *estB*, ont été testées pour les facteurs ou marqueurs de virulence suivants : l'entérotoxine thermolabile (LT), l'entérotoxine STa, l'entérotoxine STb, l'entérotoxine entéroaggrégative stable à la chaleur (EAST1), la porcine attaching and effacing associated protein (Paa), l'adhesin involved in diffuse adherence (AIDA), les Shiga toxines 1 et 2 (Stx1 and Stx2), *E. coli* attaching-and-effacing factor (EAE), et les fimbriae F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F17, F18, et F41. Nous avons extrait l'ADN des 100 isolats et la séquence codant pour la toxine STb a été amplifiée par réaction en chaîne par polymérase puis entièrement séquencée.

Résultats

Chez 77 souches, la séquence était identique à celle décrite originalement par Lee *et al.* (1983) (souche P307) (Figure 1). Les 23 souches restantes possédaient une variation dans la séquence, l'histidine en position 12 était remplacée par l'acide aminé asparagine, correspondant à la même variation que celle trouvée dans la souche 2173 par Fekete *et al.* (2003).

Souche P307 (séquence originale de STb)					
Codon #	28..	31..	34..	37..	40..
Séquence ADN	TGT	GAA	CAT	TAT	AGA
Acide aminé	Cys	Glu	His	Tyr	Arg
Acide aminé #	10	11	12	13	14

Souche 2368 (un variant identifié dans cette étude)					
Codon #	28..	31..	34..	37..	40..
Séquence ADN	TGT	GA A	AA T	TAT	AG A
Acide aminé	Gly	Glu	Asn	Tyr	Arg
Acide aminé #	10	11	12	13	14

Fig. 1. Comparaison des séquences entre la toxine originale et le variant identifié dans cette étude.

Fig. 1. Comparison of the sequences of the wild-type toxin and a variant identified in this study.

Ce variant de la toxine STb a été observé dans les souches datant de 1980 à 2007 inclusivement qui faisaient partie des souches sélectionnées dans cette étude. Puisque le plasmide pTC de la souche 2173 possédait un gène de résistance à la tétracycline (*tetB*), la sensibilité à la tétracycline a aussi été déterminée par la méthode de Kirby-Bauer. Cela a révélé que les 23 souches possédant la variation dans la séquence de STb étaient aussi résistantes à la tétracycline.

Suite à cette observation, une corrélation entre la présence ou non de ce variant et la présence de facteurs de virulence retrouvés dans les 100 souches ETEC étudiées a été effectuée. Les 23 souches variantes contiennent l'entérotoxine STa, comme la souche 2173. Aussi, 13 de ces 23 souches STa:STb ne possèdent aucun fimbriae porcine connu à ce moment. De plus, le sérotypage de ces souches a indiqué que 10 des 13 souches STa:STb possédaient le même sérotype, soit O?:K48, les 3 souches restantes n'étaient pas sérotypable. Les autres souches étaient associées aux fimbriae F4 (1/40), F5 (1/6), F6 (1/1) et F18 (5/11). La présence de Stx2 était fortement corrélée avec la

présence du variant (5/6).

Cette étude a révélé la présence d'un variant de la toxine STb dans une proportion importante (23/100). Cette variation du codon 34 est la même que celle observée par Fekete *et al.* (2003). Des études de mutagenèse dirigée ont démontré le rôle de certains acides aminés dans la toxicité et dans l'attachement de la toxine au sulfatide (Dreyfus *et al.*, 1992; Fujii *et al.*, 1992; Labrie *et al.*, 2001). Cependant, la présence d'une histidine en position 12 n'a pas été recherchée jusqu'à présent.

Ce variant semble fortement associé aux souches ETEC positives pour la toxine STa puisque toutes les souches variantes ont hybridé avec le gène codant pour STa. Les souches STa:STb sans fimbriae porcine sont moins bien caractérisées et peuvent être associées à la diarrhée puisque ce type de souche a été isolé de porcs diarrhéiques (John M. Fairbrother, laboratoire EcL, communication personnelle).

De plus, puisque toutes les 23 souches variantes étaient STa-positives et résistantes à la tétracycline, comme l'ont observé Fekete *et al.* (2003), cela peut indiquer que le gène variant de STb est aussi présent sur le plasmide pTC₂₁₇₃ ou son équivalent. Le clonage, l'expression et la purification du gène permettraient de comparer l'attachement de STb au sulfatide, son récepteur, ainsi que la toxicité dans un modèle animal comme les anses ligaturés chez le rat ou encore son hôte naturel, le porc.

Références bibliographiques

- Dreyfus L.A., Urban R.G., Whipp S.C., Slaughter C., Tachias K., Kupersztosch Y.M. (1992) Purification of the STb enterotoxin of *Escherichia coli* and the role of selected amino acids on its secretion, stability and toxicity. *Mol. Microbiol.* 6:2397-406.
- Fekete P.Z., Schneider G., Olasz F., Blum-Oehler G., Hacker J.H., Nagy B. (2003) Detection of a plasmid-encoded pathogenicity island in F18+ enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs. *Intern. J. Med. Microb.* 293:287-98.
- Fujii Y., Hayashi M., Hitotsubashi S., Fuke Y., Yamanaka H., Okamoto K. (1991) Purification and characterization of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J. Bacteriol.* 173:5516-22.
- Handl C.E., Flock J.I. (1992) STb producing *Escherichia coli* are rarely associated with infantile diarrhoea. *J. Diarrh. Dis. Res.* 10:37-8.
- Labrie V., Beausoleil H.E., Harel J., Dubreuil J.D. (2001) Binding to sulfatide and enterotoxicity of various *Escherichia coli* STb mutants. *Microbiology* 147:3141-8.
- Lee C.H., Moseley S.L., Moon H.W., Whipp S.C., Gyles C.L., So M. (1983) Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin II producers. *Infect. Immun.* 42:264-8.
- Lortie L.A., Dubreuil J.D., Harel J. (1991) Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 29:656-9.
- Okamoto F.Y., Akashi N., Hitotsubashi S., Kurazono H., Karasawa T., Takeda Y. (1993) Identification and characterization of heat-stable enterotoxin II-producing *Escherichia coli* from patients with diarrhea. *Microbiol. Immun.* 37:411-4.
- Qadri F., Khan A.I., Faruque A.S., Begum Y.A., Chowdhury F., Nair G.B., Salam M.A., Sack D. A., Svennerholm A.M. (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* diarrhea, Bangladesh, 2004. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1104-7.
- Sukumar M., Rizo J., Wall M., Dreyfus L.A., Kupersztosch Y.M., Gierach L.M. (1995) The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. *Protein Science* 4:1718-29.

Le domaine T de la toxine diphtérique favorise la liaison et la pénétration membranaire du domaine catalytique

Anne CHASSAING¹, Sylvain PICHARD¹, Vincent FORGE², Daniel GILLET^{1*}

¹ CEA, DSV/iBiTec-S/SIMOPRO/LTMB, bât. 152, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex ; ² CEA/DSV/LCBM/MIR, CEA Grenoble, 38054 Grenoble Cedex, France.

* Auteur correspondant ; Tél : +33 (0)1 69 08 76 46 ; Fax : +33 (0)1 69 08 90 71 ; Courriel : daniel.gillet@cea.fr

Résumé

La toxine diphtérique (58 kDa) est une toxine bactérienne translocante, à cible intracellulaire, dont l'activité est régulée par le pH. L'étape de translocation du domaine C dans le cytosol est encore mal connue. L'objectif de ce travail est de déterminer l'influence du comportement des domaines C et T l'un sur l'autre, en fonction du pH. Pour cela, nous avons produit deux mutants de la protéine CT, CT_{W50/153F} et CT_{W206/281F}. L'étude spectroscopique de ces mutants a permis d'identifier les changements de conformation dépendants du pH des deux domaines dans la protéine CT. La conclusion de ce travail est que le domaine T aide à la liaison et la pénétration du domaine C dans les membranes, alors que son comportement reste identique en présence ou non du domaine catalytique.

The T domain of diphtheria toxin drives membrane binding and penetration of the C domain

Diphtheria toxin (58 kDa) is a pH-dependant bacterial translocating toxin, with an intracellular target. The translocation step of the C domain in the cytosol remains unclear. The aim of this work is to determine the effects of the T and C domains one on the other, as a function of pH. For this, we produced two mutants of the CT protein, CT_{W50/153F} and CT_{W206/281F}. Spectroscopic studies on these mutants allowed to identify the pH-dependant conformational changes of the two domains within the CT protein. The main result of the study is that the T domain triggers membrane binding and penetration of the C domain, without being influenced by the presence of the C domain.

Keywords : Diphtheria toxin, translocation, conformational change, molten globule, membrane interaction.

Introduction

La toxine diphtérique (58 kDa) est une toxine bactérienne translocante, à cible intracellulaire, dont l'activité est régulée par le pH (Chenal *et al.*, 2002b ; Perier *et al.*, 2007). La toxine se lie à la surface cellulaire puis est internalisée. Le pH acide de l'endosome conduit à l'insertion du domaine de translocation (T) dans la membrane, lequel permet la translocation du fragment catalytique (C) dans le cytoplasme. L'étape de translocation du domaine C est encore mal connue. Certaines études suggèrent que le passage du domaine C se fait à travers un canal formé par la sous-unité B (Boquet et Pappenheimer, 1976 ; London, 1992). D'autres suggèrent que les deux domaines sont en contact avec la membrane et que les sites hydrophiles de C sont masqués par la chaîne B (Hu et Holmes, 1984 ; Papini *et al.*, 1987 ; Zhao et London, 1988). Cependant, la majorité des études porte sur les domaines C et T isolés. L'objectif de cette étude est de déterminer l'influence des domaines C et T, l'un sur l'autre, lors de la translocation. Pour cela, nous avons produit deux mutants de la protéine CT, CT_{W50/153F} et CT_{W206/281F}. Ces deux mutants permettent respectivement d'étudier la fluorescence du tryptophane (Trp, W) dans le domaine C et dans le domaine T, en présence ou non de vésicules lipidiques anioniques. Les résultats ont permis de décrire les changements de conformation respectifs des domaines

C et T dans la protéine CT. Le principal résultat est que le domaine T favorise la pénétration membranaire du domaine C dans les premières étapes de la translocation, et que le domaine T se comporte de manière identique, lié ou non au domaine C.

L'acquisition d'un état molten globule par les domaines C et T en solution est conservée dans la protéine CT

Des expériences de dichroïsme circulaire ont montré qu'en solution, les protéines C, T, et CT mutées sont repliées dans leurs structures natives à pH 7,2 et perdent leurs structures tertiaires à pH 3,5 (*non représenté*). Isolés, les domaines C et T sont capables d'adopter une structure de type molten globule (MG) avec conservation de la structure secondaire et perte des contraintes structurales tertiaires (Hayashibara et London, 2005). Le λ_{max} de fluorescence du Trp a été utilisé pour étudier les changements conformationnels dépendants du pH des protéines, C, T, CT_{W50/153F}, CT_{W206/281F}, en solution (*Figure 1*). Toutes les protéines suivent une transition dépendante du pH, traduisant l'exposition au solvant de leurs Trp. La transition du domaine C est profondément modifiée dans la protéine CT (*Figure 1, triangles vides*). En effet, celle-ci a lieu 0,9 unités de pH plus basique pour C isolé (*Figure 1, triangles pleins*). En revanche, la transition de T dans la protéine CT est peu modifiée. Ces résultats suggèrent

que dans la protéine CT, la transition vers l'état MG du domaine T est inchangée alors que celle du domaine C a lieu à pH plus élevé. La liaison entre les domaines C et T crée donc une interaction entre eux. Cette interaction modifie le comportement du domaine C en solution.

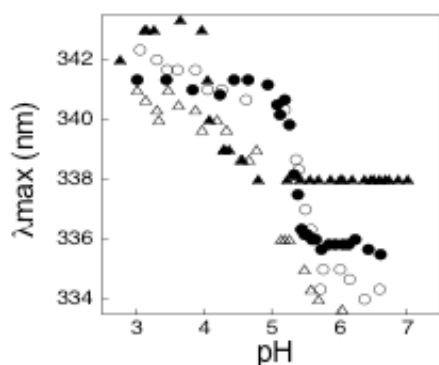


Fig. 1. Fluorescence du Trp des protéines T (ronds pleins), C (triangles pleins), CT_{W206/281F} (triangles vides) et CT_{W50/153F} (ronds vides), en solution, en fonction du pH.

Fig. 1. Trp fluorescence in solution of T (close circles), C (close triangles), CT_{W206/281F} (open triangles) and CT_{W50/153F} (open circles).

Le domaine T favorise l'interaction du domaine C avec la membrane

L'interaction des protéines C, T et des mutants CT avec des vésicules anioniques [SUV pour *Small Unilamellar Vesicle* ; LUV pour *Large Unilamellar Vesicle* ; PC/PA (pour *Phosphatidyl Cholin/Phosphatidic Acid*) 9:1] a été étudiée en fonction du pH (Figures 2 et 3). La liaison à la membrane a été étudiée par ultracentrifugation et fluorescence du Trp. L'interaction des protéines avec la région interfaciale de la membrane a été étudiée par FRET entre les Trp des protéines et un groupement dansyl lié aux têtes polaires des lipides (Figure 2).

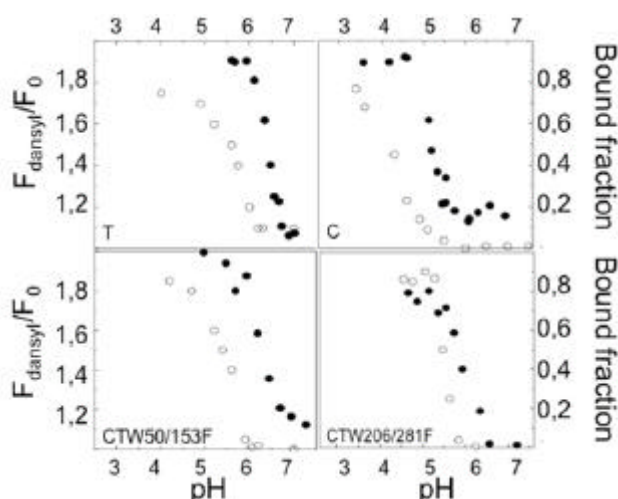


Fig. 2. FRET entre les Trp des protéines C, T et CT mutées et les SUV contenant du dansyl-DHPE (ronds vides), et partition de C, T et CT dans la membrane en fonction du pH (ronds pleins).

Fig. 2. FRET from the Trp of C, T, and CT mutants to dansyl-DHPE-containing SUV (open circles) and partition of C, T, and CT mutants between the buffer and LUV as a function of pH (close circles).

Le pH de demi transition de la liaison aux LUV est de 5,2 ; 6,5 pour les protéines C et T ; 6,4 et 6,1 pour

CT_{W50/153F} et CT_{W206/281F} respectivement. Pour déterminer quel domaine de la protéine CT se lie à la membrane en fonction du pH, des expériences de FRET ont été menées. Plus l'intensité du signal de fluorescence est élevée, plus les Trp de la protéine s'insèrent dans la région interfaciale de la membrane.

Le domaine T pénètre dans la zone interfaciale de la membrane seulement lorsqu'il est complètement lié (Figures 2 et 4). En revanche, le domaine C pénètre dans la membrane dès sa liaison, puis poursuit son insertion sur une unité de pH. Pour CT_{W50/153F} et CT_{W206/281F}, l'insertion dans la région interfaciale débute lorsque 50% de la protéine est liée. Alors que le signal du domaine T dans CT continue à augmenter après la liaison totale de la protéine à la membrane, le FRET de C dans la protéine CT stoppe à pH 5, lorsque toute la protéine est liée.

Le domaine T favorise la pénétration du domaine C dans la membrane

Les transitions structurales des domaines C et T de la protéine CT ont été étudiées par fluorescence du Trp, en fonction du pH et en présence de LUV anioniques (Figure 3).

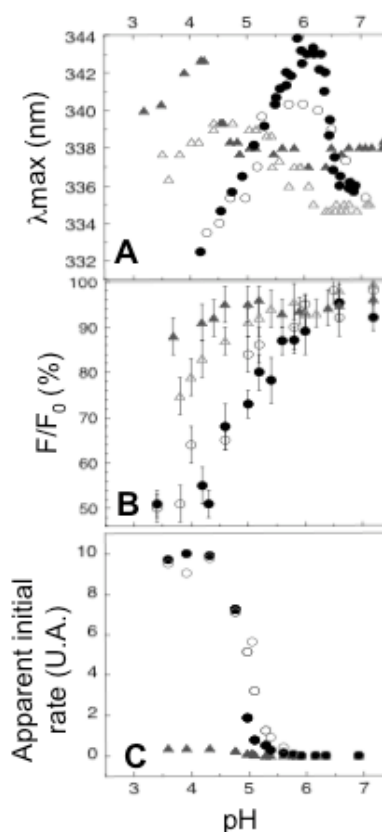


Fig. 3. (A) Interaction entre C, T et des mutants CT et des LUV anioniques, en fonction du pH. T (ronds pleins), C (triangles pleins), CT_{W206/281F} (triangles vides), CT_{W50/153F} (ronds vides) (B) Quenching de fluorescence des Trp par le Br-PC. (C) Cinétique de libération de sulforhodamine encapsulée dans des LUV. T (ronds pleins), C (triangles pleins), CT (ronds vides).

Fig. 3. (A) Interaction of C, T and CT mutants with anionic LUV, as a function of pH. T (close circles), C (close triangles), CT_{W206/281F} (open triangles), CT_{W50/153F} (open circles). (B) Fluorescence quenching of Trp by Br-PC. (C) Kinetics of sulforhodamine release in LUV. T (close circles), C (close triangles), and CT (open triangles).

Le domaine T suit deux transitions, entre pH 7 et pH 6, puis pH 6 et pH 4, correspondant respectivement à la liaison à la membrane et la réorganisation dans la membrane (Chenal *et al.*, 2002a ; Perier *et al.*, 2007). Le domaine C isolé suit également deux transitions (Figure 3A, triangles pleins), de 338 nm à 343 nm entre pH 4,9 et pH 3,5 et 343 nm à 340 nm entre pH 4,1 et pH 3,5. L'augmentation du λ_{max} lors de la deuxième transition correspond certainement à un dépliement partiel de la protéine, comme pour le domaine T (Montagner *et al.*, 2007 ; Perier *et al.*, 2007).

Dans la protéine CT, le domaine T suit deux transitions très similaires à celles du domaine T isolé (Figure 3A, ronds vides). La diminution d'amplitude de 3 nm de ces deux transitions peut être corrélée aux expériences de binding. En effet, la liaison à la membrane du domaine T dans la protéine CT est moins coopérative que la liaison du domaine T isolé (Figure 2, ronds pleins). La transition du domaine T dans CT n'est pas achevée lorsque T commence sa deuxième transition et pénètre dans la membrane. Le domaine C dans la protéine CT suit également deux transitions dépendantes du pH en présence LUV anioniques. En effet, le λ_{max} varie de 335 à 339 nm entre pH 6,4 et 5,0 puis de 339 à 336 nm entre pH 5,0 et 3,6 (Figure 3A, triangles vides). Ainsi, le domaine C dans CT suit, comme le domaine C isolé, deux transitions, mais celles-ci ont lieu une unité de pH plus élevée. Ceci suggère fortement que dans la protéine CT, le domaine T favorise l'interaction du domaine C avec la membrane.

Le comportement du domaine T n'est pas perturbé par l'insertion du domaine C dans la membrane

Afin de caractériser de manière plus fine la position des Trp de C, T et CT dans la membrane, des phospholipides bromés contenant des groupements brome aux positions C6 et C7 de la chaîne acyle ont été incorporés dans les LUV à un ratio PC/Br-PC/PA de 7:2:1. Lorsque la protéine s'insère profondément dans la membrane, la fluorescence des Trp est quenchée par le brome. Le quenching de fluorescence du domaine C isolé augmente légèrement à partir de pH 4,6, jusqu'à 12% de quenching à pH 3,8 (Figure 3B, triangles pleins), indiquant une faible pénétration de C dans la bicouche. La fluorescence des Trp du domaine T est progressivement quenchée au fur et à mesure que le pH décroît, jusqu'à 48% d'extinction à pH 3,8 (Figure 3B, ronds pleins). Des valeurs similaires sont obtenues pour CT_{W50/153F}, ce qui montre que le domaine T dans la protéine CT pénètre à la même profondeur dans la partie hydrophobe de la bicouche que le domaine T isolé. La protéine CT_{W206/281F} (Figure 3B, triangles vides) représente une situation intermédiaire, avec une extinction de fluorescence jusqu'à 25% à pH 3,8, ce qui représente une extinction deux fois plus importante que pour le domaine C isolé. Ainsi, le domaine C dans la protéine CT pénètre plus profondément dans la bicouche lipidique.

Enfin, des expériences de perméabilisation de LUV ont été menées afin d'étudier les cinétiques de perméabilisation des protéines C, T et CT, et donc leur pénétration dans la membrane (LUV/protéine : 1000). Pour cela, la libération de la sulforhodamine encapsulée dans des LUV a été suivie par fluorescence (Figure 3C). Alors que la perméabilisation par le domaine C isolé est peu efficace, l'efficacité de perméabilisation de la

protéine CT s'avère légèrement plus efficace que celle du domaine T.

Modèle d'insertion des domaines C et T dans des membranes anioniques

La Figure 4 résume les résultats obtenus en solution et en présence de LUV, par les diverses méthodes présentées. Ce modèle représente la succession d'étapes conduisant à la pénétration des deux domaines dans la bicouche. Ce bilan montre que le domaine T se comporte de manière indépendante du domaine C en solution, et pendant l'interaction avec la membrane ; à l'inverse, le domaine C est fortement influencé par la présence du domaine T.

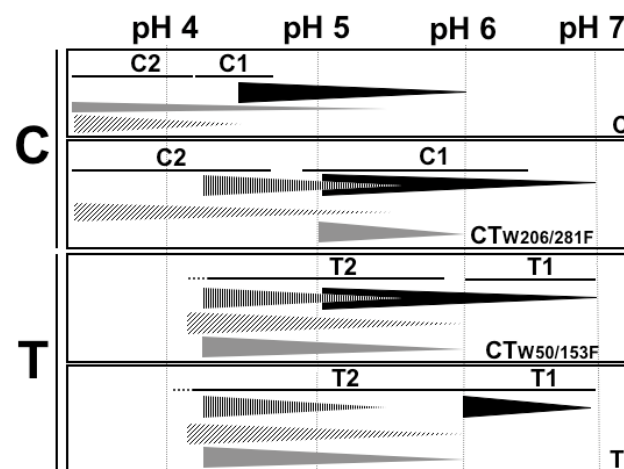


Fig. 4. Représentation schématisée des phénomènes intervenant lors de l'interaction des protéines T, C et CT avec les membranes anioniques. La figure résume les résultats obtenus par les différentes méthodes spectroscopiques. C1, C2, T1, T2 sont les transitions des domaines C et T en présence de LUV. La liaison (noir), la pénétration dans la zone interfaciale (gris), la pénétration dans la zone hydrophobe (obliques) et la perméabilisation (verticales) sont indiquées par des triangles couchés.

Fig. 4. Schematic representation of the phenomena occurring during the interaction of proteins T, C and CT with anionic membranes. The figure summarizes the data obtained by the different spectroscopic methods. C1, C2, T1, T2 are the transitions of C and T in the presence of LUV. The binding (black), interfacial layer penetration (grey), acyl chain layer penetration (obliques), and permeabilization (verticals) are indicated by arrows.

De pH 7 à pH 6, la protéine se lie à la membrane (Figures 3 et 4). Le domaine T est certainement à l'origine de la liaison car (i) le domaine T présente les mêmes changements de conformation (Figure 4, T1 et T2) isolé ou dans CT, (ii) le changement de conformation C1, qui est certainement attribué à la liaison aux LUV, ainsi que cette liaison, ont lieu à pH moins acide lorsque C est lié à T.

De pH 6 à pH 4, les deux domaines de la protéine CT pénètrent dans la membrane (Figure 4, gris et obliques). Le domaine T n'est pas influencé par la présence du domaine C, alors que l'interaction membranaire de C est fortement influencée par T. Les étapes de pénétration dans la membrane sont différentes pour les deux domaines. La pénétration du domaine T est plus profonde et affecte les régions interfaciale et hydrophobe (Figures 3B et 4). En revanche, l'interaction de C avec la membrane est plus superficielle et affecte essentiellement la région

interfaciale. Lors de l'étape de pénétration, T subit un changement de conformation T2 (*Figure 3A*). C termine son changement de conformation C1. Pour C, le changement de conformation C2 correspond à la pénétration dans les chaînes acyles. Le domaine T perméabilise les membranes pendant cette étape de pénétration (*Figure 4*). La présence du domaine T est indispensable pour la perméabilisation, C étant incapable de perforer les membranes.

Conclusion

De récentes études ont suggéré que le domaine T agit comme un chaperon du domaine C, permettant son passage à travers la membrane à pH acide (Hammond *et al.*, 2002). En effet, le domaine T est capable de se lier, en solution ou en présence de membrane à des protéines présentant un état MG ou à des peptides hydrophobes (Ren *et al.*, 1999). Cependant ce rôle de chaperon du domaine T n'a pas été démontré. Ce travail montre que le domaine T agit sur la conformation du domaine C, en solution et en présence de membranes anioniques, en accélérant son passage de sa structure native à l'état MG. Le domaine T ne facilite pas l'insertion membranaire de C uniquement en ayant un rôle d'ancre membranaire, il stabilise également la conformation MG de C, qui est propice à l'insertion de C et certainement à sa translocation. Le domaine T expose des surfaces hydrophobes à pH acide, qui interagissent probablement avec les zones hydrophobes du domaine C. En ce sens, T agirait comme un chaperon du domaine C. Enfin, la protéine CT perméabilise les membranes anioniques à pH acide, ce qui suggère que la translocation de C ne se fait pas à travers le canal formé par T, comme le suggèrent certains modèles.

Références bibliographiques

- Boquet P., Pappenheimer A.M. Jr. (1976) Interaction of diphtheria toxin with mammalian cell membranes. *J. Biol. Chem.* 251:5770-8.
- Chenal A., Savarin P., Nizard P., Guillaud F., Gillet D., Forge V. (2002a) Membrane protein insertion regulated by bringing electrostatic and hydrophobic interactions into play. A case study with the translocation domain of diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* 277:43425-32.
- Chenal A., Nizard P., Gillet D. (2002b) Structure and function of diphtheria toxin: From pathology to engineering. *J. Toxicol. Toxin. Rev.* 21:321-59.
- Hammond K., Caputo G. A., London E. (2002) Interaction of the membrane-inserted diphtheria toxin T domain with peptides and its possible implications for chaperone-like T domain behavior. *Biochemistry* 41:3243-53.
- Hayashibara M., London E. (2005) Topography of diphtheria toxin A chain inserted into lipid vesicles. *Biochemistry* 44:2183-96.
- Hu V.W., Holmes R.K. (1984) Evidence for direct insertion of fragments A and B of diphtheria toxin into model membranes. *J. Biol. Chem.* 259:12226-33.
- London E. (1992) Diphtheria toxin: membrane interaction and membrane translocation. *Biochim. Biophys. Acta* 1113:25-51.
- Montagner C., Perier A., Pichard S., Vernier G., Ménez A., Gillet D., Forge V., Chenal A. (2007) Behavior of the N-Terminal Helices of the Diphtheria Toxin T Domain during the Successive Steps of Membrane Interaction. *Biochemistry* 46:1878-87.
- Papini E., Colonna R., Cusinato F., Montecucco C., Tomasi M., Rappuoli R. (1987) Lipid interaction of diphtheria toxin and mutants with altered fragment B. 1. Liposome aggregation and fusion. *Eur. J. Biochem. / FEBS* 169:629-35.
- Perier A., Chassaing A., Raffestin S., Pichard S., Masella M., Ménez A., Forge V., Chenal A., Gillet D. (2007). Concerted protonation of key histidines triggers membrane interaction of the diphtheria toxin T domain. *J. Biol. Chem.* 282:24239-45.
- Ren J., Kachel K., Kim H., Malenbaum S.E., Collier R.J., London E. (1999) Interaction of diphtheria toxin T domain with molten globule-like proteins and its implications for translocation. *Science (New York, NY)* 284:955-7.
- Zhao J.M., London E. (1988) Conformation and model membrane interactions of diphtheria toxin fragment A. *J. Biol. Chem.* 263:15369-177.

Phytotherapy and adverse reactions

Nubilde MARTÍNEZ*, Edmundo CAYAMA, Nubi LEÓN, Lisbeth PÉREZ

Instituto de Investigaciones Biomédicas (Biomed), Urb. Cantarrana, La Rinconada Sector, Final calle Cecilio Acosta, Las Delicias, Maracay, estado Aragua, Venezuela.

* Corresponding author ; Tel : +58-243-2420577 ; Fax : +58-0243-2425333 ; E-mail : nubildemartinez@gmail.com

Abstract

From previous generations, medicinal plants have been used as a therapeutic resource in the treatment of some pathologies. In order to make an appropriate use of this resource, it is necessary to know its active ingredients and adverse effects. The objective of this research was to analyze the life experiences of the population of Santa Rita, Aragua state, Venezuela, in order to find out if they use plants properly and, should it not be so, to teach them the correct handling of the plants. In the qualitative type investigation, a case study was selected, and a descriptive type analysis was performed. The sample was made up of 25 interviewees who attended medical consultations in two primary care units and agreed on participating. Among the plants they mentioned as producing adverse reactions, respecting the order in which they were reported, are : garlic, chamomile, onion, lemon verbena, jimsonweed, goosefoot, physic nut, castor oil plant, jequirity, oleander, yellow oleander, passion fruit, lime, chinese hibiscus, banana, lemongrass, fig and peppermint. It was concluded that the population has some knowledge of the adverse effects, but there is confusion as to the preparation methods and lack of knowledge of the fact that some plants become toxic after being cooked.

Phytothérapie et effets indésirables

Depuis longtemps, les plantes médicinales ont été utilisées dans le traitement de nombreuses pathologies. Leur bon usage nécessite une connaissance de leurs principes actifs et de leurs effets toxiques. L'objectif de notre enquête est d'analyser les expériences vécues par la population de Santa Rita, de l'État d'Aragua, au Venezuela, afin de savoir si elle utilise correctement les plantes et, dans le cas contraire, de lui en enseigner le bon usage. Pour ce type d'investigation qualitative, nous avons sélectionné une étude de cas et une analyse descriptive a été réalisée. L'échantillonnage porte sur 25 patients consultant dans deux unités de soins et ayant accepté de participer à l'enquête. Les plantes responsables d'effets secondaires par ordre de fréquence sont les suivantes : ail, camomille, oignon, citron, verveine-citronnelle, datura stramoine, chénopode, pourghère, ricin, haricot pater noster, laurier-rose, thévétia du Pérou, fruit de la passion, citron vert, hibiscus rose de Chine, banane, citronnelle, figue et menthe poivrée. Nous avons constaté que la population concernée avait une certaine connaissance des effets indésirables, mais qu'il existait des confusions sur les modes de préparation et un manque d'informations sur la toxicité après cuisson.

Keywords : *Phytotherapy, adverse effects, medicinal plants.*

Introduction

Phytotherapy, which is the art of using medicinal plants, has been in effect from ancient generations up to the present. Plants are a therapeutic resource suitable for treating some pathologies, but it is necessary to know about their active principles, therapeutic efficiency, adverse and/or toxic effects (which could occur when their properties are not known), correct dose, falsification or substitution of the botanic species, contamination of the plants with pesticides and inadequate extraction of the active principles, among others. Most of the people who use phytotherapy, think it to be safe just because plants are natural. But their culture condition and their natural origin do not guarantee total harmlessness nor eliminate the negative effects that some plants can produce when ingested without knowledge and without control. Generally speaking, people don't know that plants have active principles whose effects are similar to those of some drugs and that at some point they can become toxic if prepared inadequately or if taken in combination, because synergy or potentiation can be produced, making it necessary to be careful when

consuming them. Some plant species produce adverse reactions and toxicity on contact with the skin, for example : rash producing plants, e.g. nettle and fireman ; others are irritants through mechanical incisions, e.g. prickly pear ; another group of plants can produce toxicity when taken for edible plants or when some vegetables are eaten unripe and in general, when a plant species is taken for another. This research was based on the life experiences of the inhabitants of Santa Rita town in the Francisco Linares Alcántara country, Aragua state, Venezuela, near the University of Carabobo area, Aragua Branch, and it was considered pertinent to select this population for documenting their narrated experiments in relation to the use of phytotherapy as a therapeutic resource and the possible adverse reactions which could arise, with the intention of finding out whether plants are really used adequately and, were it not so, designing programs in conjunction with public health institutions in order to teach them proper handling.

Materials and methods

This investigation is of the qualitative type, the method

chosen was case study, as referred to by Serrano (2004). It is a descriptive and analytic study according to Usher and Bryant (1997) and Taylor and Bogdan (1998), because it describes the practices and beliefs of people who use phytotherapy and who live in Santa Rita parish, Aragua state Venezuela. The information was collected through a field work (Tamayo, 2001).

The sampling used was of the theoretical or non-probabilistic type (Canales, 2001 ; Guerrero, 2001) and the sample was made up of 25 people who attended medical consultation as patients or as patient companions in two primary care units of the Santa Rita parish who agreed to participate. In this research the following elements were applied : documental and bibliographic analysis, experience narration, observation and in-depth interviews. The documental analysis was performed to obtain information about the different plants used by those surveyed. Among the plants mentioned are as above.

Garlic, *Allium sativum* L. *Alliaceae*

(In South America : ajo). The pharmacological activity of garlic includes a variety of organosulfurated compounds, the most important being "alliin" which becomes alicin, which in turn provokes the production of tears and can have a highly irritating action and it also contains a mucilaginous extract, albuminoid materials, potassium salts and silica among others. Garlic has also beta blocker, hypocholesterolemic, anti-platelet, diuretic and anthelmintic properties (Delens, 2000 ; Thomas *et al.*, 2008) and it is used in phytotherapy as anti-flatulent, anti-inflammatory, diuretic, expectorant, hypotensive, vasodilator, among others. The administering modes are as tincture, syrup and oil (Kendler, 1987 ; Albornoz, 1993)



Fig. 1. Garlic, *Allium sativum* L., *Alliaceae*.

Fig. 1. Ail commun.

Garlic must not be administered to children, nor to pregnant or breast-feeding women. It can cause contact dermatitis. Prolonged ingestion may cause digestive and kidney disorders and it shouldn't be consumed by people undergoing oral anti-coagulant treatment (warfarina) since it lengthens the time of prothrombin activity, clotting and coagulation. It can produce allergic reactions : dermatitis on contact, asthma crisis on smelling garlic powder, gastric burning, nausea, vomiting and diarrhoea.

Chamomile, *Matricaria recutita* L., *Asteraceae*

(In South America : manzanilla). The flowers of this plant are used for its active ingredients : essential oils composed of sesquiterpenes (β -bisabolol and derivatives such as bisaboloxides A, B, C), azulenes such as camazulene and a hydrogel fraction containing apigenin (Delens, 2000 ; Fonseca *et al.*, 2007). Diverse properties are attributed to this plant, including anti-inflammatory, sedative, carminative, anti-allergic, diaphoretic and anti-spasmodic properties (Albornoz, 1993 ; Brandao *et al.*, 1998 ; Nogueira *et al.*, 2008).



Fig. 2. Chamomile, *Matricaria recutita*, L., *Asteraceae*.

Fig 2. Camomille.

When flowers are cooked and diluted, they are well tolerated ; but when they are very concentrated and ingested for a long period of time, they can produce severe poisoning, especially in kids less than 2 years of age who can have convulsions and in extreme cases die from respiratory arrest (Martinez *et al.*, 2001 ; Rodriguez *et al.*, 2007).

Onion, *Allium cepa* L. *Alliaceae*

(In South America : cebolla). The bulb is the part of this plant that contains most of the active ingredients : the quercetin, a flavonoid that confers various properties, such as anti-spasmodic, diuretic, protective of blood vessels, as well as, anti-asthmatic properties which could be explained by the bronchial spasmolytic activity due to the presence of isothiocyanates (Delens, 2000). Onion also contains acrolein, which confers an anti-inflammatory action and acts as an adjuvant in the sweeping function of the bronchial ciliae. It also contains disulfide allyl, which also has anti-inflammatory properties and is easily eliminated through the respiratory canals and the kidneys. It is used as an anti-inflammatory in case of haemorrhoids, insect bites, burns, abscesses ; it is also used as an expectorant and others (Kendler, 1987 ; Albornoz, 1993). When people are weak or tired, they are encouraged to ingest onion because of its energizing properties.



Fig. 3. Onion, *Allium cepa* L., *Alliaceae*.

Fig. 3. Oignon potager.

Onion should not be administered in any form or presentation to people who are bleeding or recently operated and in the healing phase and/or who have clotting problems because this bulb has prothrombic activity and anti-platelet properties, which would aggravate the case and lengthen the clotting and prothrombic activity times (Martinez and Hernandez, 1990 ; Martinez, 2006).

Lemon verbena, *Lippia alba* (Miller) N.E.Br, *Verbenaceae*

(In South America : poleo, cidron). The parts of this plant containing the greatest amounts of active principles are the fresh leaves and the flowers and their active principles are: an essential oil rich in geraniol, nerol, borneol, β -caryophyllene, bisabolene and others that provide this plant with expectorant and anti-inflammatory properties. This plant is also considered a stomach stimulant and a carminative (Albornoz, 1993 ; Vale *et al.*, 1999 ; Delens, 2000 ; Do Vale *et al.*, 2002 ; Martinez, 2006 ; Oliveira *et al.*, 2006). According to ethno-pharmacological research, this plant is widely used

for having digestive properties and sedative effects ; it acts also as a respiratory stimulant and is an anti-hypertensive medication (Gazola *et al.*, 2004 ; Hennebelle *et al.*, 2008).



Fig. 4. Lemon verbena, *Lippia alba* (Mill.) N.E Br., Verbenaceae.

Fig. 4. Verveine-citronnelle (verveine odorante).

The concoction of this plant should not be given to kids less than 2 years of age since their excretion and elimination organs are not fully developed which produces an accumulation of active principles exceeding therapeutic levels and it shouldn't be administered in conjunction with acetaminophen since drug interactions (hepatotoxicity) may occur (Martinez and Hernandez, 1990 ; Martinez, 2003, 2006).

Jimsonweed, *Datura stramonium* L., Solanaceae

(In South America : estramonio. In Venezuela : Ñongué or cat's ball ; also called "locowich" in the U.S.). It is cultivated as an ornamental species and it also grows in the wild. The leaves, the flowers and specially the seeds are the parts of this plant that contain most of the alkaloids. Its alkaloids are derived from tropane, and the most important of them are hyoscyamine, atropine and scopolamine, (Topolov *et al.*, 1983). Atropine (obtained in the extraction process) is a stimulant of the central nervous system (C.N.S.) and a potent anti-cholinergic (Bania *et al.*, 2004). Scopolamine (burundanga) is a C.N.S depressant, sometimes used by delinquents since it produces sudden stimulation and immediate amnesia which prevents their victims from recognizing them ; jimsonweed only remains in the body for short periods of time, making it difficult to carry out both clinical and toxicological screening test in legal medical laboratories (Farmacopea Caribeña, 1997). Jimsonweed is thought to have anti-spasmodic and anti-inflammatory effects, and it is believed to be a respiratory decongestant and an analgesic for haemorrhoids. The inadequate use of this plant can produce atropine poisoning symptoms such as visual disturbances, thirst, redness of the skin, nervous disorders, fever and convulsions (Martinez and Hernandez, 1990 ; Martinez, 2006).



Fig. 5. Jimsonweed, *Datura stramonium* L., Solanaceae.

Fig. 5. *Datura stramonium* (stramoine officinale).

The use of jimsonweed is contraindicated in pregnant women and in children less than 14 years of age. In some communities this plant and other species from the same family, are believed to have magical properties ; when ingested by children or animals, they showed the following characteristics : "crazy as a goat, red as a tomato and hot as an iron plate". These symptoms

correspond to an atropine poisoning and not to a magical or religious trance often attributed to the effects of the plant. In folk medicine, it is commonly used in inhalations or by applying two drops of concoction in each nostril as respiratory decongestant (Martinez, 2008).

Goosefoot, *Chenopodium ambrosioides* L., Amaranthaceae

The plant called "pasote or quenopodio", is widely used in Venezuela. The active ingredients found in its root, leaves and flowering tops are ascaridole, β -pinene, limonene, D-camphor, saponins and mineral salts. Goosefoot has anti-parasitic, analgesic and anti-inflammatory properties (Alonso, 2007) ; it also has anti-spasmodic effects.



Fig. 6. Goosefoot, *Chenopodium ambrosioides* L. Amaranthaceae.

Fig. 6. Chénopode (épinard sauvage).

Great care and observance of the dose are recommended because it is a high-risk plant since the therapeutic and toxicity ranges are very close. The signs and symptoms of poisoning produced by this plant are nausea, vomiting, depression of the central nervous system, liver and kidney damage, deafness, visual disturbances, cardiac and respiratory depression ; death has been reported in many cases. Due to references to pediatric deaths, it should not be administered to children under the age of five, pregnant women (because of the risk of abortion), or elderly or convalescent people. The active ingredient ascaridole (contained in the essential oil) has anthelmintic properties with a crippling and narcotic effect on *Ascaris* worms, pinworms and hookworms, but it is ineffective against *Taenia* and *Trichuris* worms.

Ascaridol is regarded as officinal and its essence is recognized by the French pharmacopoeia ; its use is recommended at the Primary Health Care. A concoction of 100 g of fresh leaves and flowering tops into 1,5 L of water, must be boiled, left to cool down for 5 min and be administered at a rate of three cups per day (450 mL) for adults or a cup (150 mL) divided into three (3) doses for children over three years of age. According to the Caribbean Pharmacopoeia (1997) and Alonso (2007), 0.03 to 0.10 grams of leaves per kg per day, for no more than three days is the recommended dose for children. According to the W.H.O., a single dose of 20 grams of the fresh plant have the effect of rapidly expelling parasites, without apparent side effects. It is advisable to take a saline laxative three days after treatment. According to popular belief, it should not be taken during full moon, because it would stir up earthworms (Martinez, 2008).

Physic nut, *Jatropha curcas* L., Euphorbiaceae

(In South America : piñón). In popular use the leaves of the physic nut are the most widely used part of this plant. The seeds and the extremely caustic latex contain the largest amount of the active ingredient, curcin. Anti-microbial properties are attributed to this plant and its inhibitory activity against *Candida albicans* was

demonstrated *in vitro* (Thomaso, 1989) ; latex applied to patients with plantar warts for 11-20 days was almost 100% effective in eliminating them (Marroquin, 1992).



Fig. 7. Physic nut, *Jatropa curcas* L., Euphorbiaceae.

Fig. 7. Pourghère (pignon d'Inde, médicinier).

When eaten, the seeds produce acute symptoms of poisoning whose manifestations are vomiting, abdominal pain and diarrhoea, low blood pressure, malaise, weakness, and respiratory disorders. In severe cases, the patient may collapse, come into coma and die. There are multiple references to pediatric intoxication linked to the ingestion of these seeds, as referred by Martinez and Hernandez (1990), Paez (2000), Martinez (2003, 2006).

Castor oil plant, *Ricinus communis* L., Euphorbiaceae

(In Venezuela : Tártago or Higuereta). The seeds of this plant contain the largest amount of active ingredients, among them fixed oils, substances containing nitrogen such as ricinine (slightly toxic alkaloid) and ricin (of protein structure and highly toxic). There are references about the use of castor oil as a laxative in hospitals especially in cases of poisoning caused by non-soluble substances (Martinez and Hernandez, 1990 ; Farmacopea Caribeña, 1997 ; Martinez, 2006). When the seeds of this plant are ingested, clinical manifestations may appear several hours after eating : nausea followed by vomiting, diarrhoea, chills, burning sensation in the mouth, thirst, cyanosis, cardiac arrhythmias, seizures and eventually death by respiratory arrest. This plant has laxative properties due to the presence of ricinoleic acid that causes irritation of the intestinal mucous membrane and then, increases peristaltism (Alonso, 2007).

In vitro, the aqueous and acetone extracts were shown to have anti-microbial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella vewport*, *Salmonella typha*, *Sarcinia lutea*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus albus* (Misas *et al.*, 1979).

Extracts from the ricin roots have a significant hypoglycemic activity in albinos rats (previously made diabetic through the use of estreptozotocin) (Atal and Kapur, 1982). Experimental studies in rats showed that the ethanolic extract of the leaves exerts a hepatoprotective activity in poisoning caused by galactosamine and carbon tetrachloride (Visen *et al.*, 1992).



Fig. 8. Castor oil plant, *Ricinus communis* L., Euphorbiaceae.

Fig. 8. Ricin commun.

Due to its uterine stimulant action, it is contraindicated in pregnant women, and should not be

used as a slimming agent because its chronic use can complicate underlying metabolic pathologies such as anorexia and /or bulimia. Ricin has the capacity to agglutinate red blood cells and may trigger disseminated intravascular coagulation ; some authors consider ricin to be toxic, since the ingestion of 3 or 4 seeds of *Ricinus communis* can be fatal in children. The symptoms of poisoning usually appear after a few days and may be fatal after 6 to 8 days. Mortality rate is approximately 6%. The treatment is symptomatic (Martinez and Hernandez, 1990 ; Farmacopea Caribeña, 1997 ; Martinez, 2006).

Jequirity, *Abrus precatorius* L., Fabaceae

The common Venezuelan name is "peonía". Some South American Indian tribes use the seeds to make necklaces and amulets. The seeds have large amounts of abrin, this active ingredient has an effect similar to that of the rattle snake venom. The seeds are highly toxic especially when chewed. These seeds are popularly used to counter the "evil eye" in young children in spite of the toxic risk of abrin ingestion. The symptoms produced after ingesting this seeds are nausea, vomiting, colic, hand tremors, bloody diarrhoea, cardiac and circulatory failure, convulsions, paralysis of the respiratory and vasomotor centres, shock and death.



Fig. 9. Jequirity, *Abrus precatorius* L., Fabaceae.

Fig. 9. Haricot paternoster (pois rouge).

Oleander, *Nerium oleander* L., Apocynaceae

The common venezuelan name is "flor de la reina o Berbería". The largest quantity of active ingredients is in the leaves of the plant and they are highly toxic. They contain cardiotoxic heterosids such as oleandrin which through hydrolysis becomes oleandrin and oleandrogenin ; strophanthin, neriantosid, adinnerosid and folinerosid. Oleandrin is a cardiac glucosid derived from gitoxin 16- acetylate. Healing properties for chickenpox are attributed to this plant, which is used for taking baths, as well as for inhalations to cure sinusitis. The applications of this plant externally in case of skin infections as well as in the immuno-oncology area open up new perspectives for using this species (Alonso, 2007). If any part of this plant is used as folk medicine, it should be done carefully to avoid the arrhythmic effects on the heart because the cardiotoxic heterosides give to this plant a digitalin-type action. Considering the high level of toxicity of this plant, it is not recommended for internal use.



Fig. 10. Oleander, *Nerium oleander* L., Apocynaceae

Fig. 10. Laurier rose.

Symptoms of poisoning that appear upon the

ingestion of this plant are nausea, vomiting, dizziness, epigastralgia, diarrhoea, arrhythmias, unconsciousness and respiratory arrest. Some authors believe that infusions are more toxic than alcoholic extracts. There are references of children who died after ingestion of some flowers or leaves of the plant and there have been reports of mass intoxications after consumption of beef kebabs when the twigs have been used as skewers.

Luckynut or Yellow oleander, *Thevetia peruviana*, Apocynaceae

(Commonly known as "Retama o Cascabel" in Venezuela). All parts of this plant are very toxic, mainly, the seeds and the latex, the latter being the largest carrier of the following group of cardiotoxic glycosides (cerebrin, nerifolin and tevetin, for instance). The leaves contain lignans : orthocumaric, ferulic, benzenoid, and gentisic acids, and flavonoids such as syringic acid and tamarixetin (Griffiths, 1959 ; Daniel *et al.*, 1978). The ferulic acid that they contain gives them the following properties : analgesic, anti-platelet, anti-dysmenorrheic, anti-spasmodic, and hepatoprotective (Duke, 1992).



Fig. 11. Luckynut or Yellow oleander, *Thevetia peruviana*, Apocynaceae.

Fig. 11. Thévétia du Pérou (faux-laurier jaune).

Due to the high toxicity of this plant, it should be administered and handled by people trained in phytomedicine. Ingestion of these seeds can produce burns in the mouth, diarrhoea, vomiting, mydriasis, cardiac arrhythmias, seizures, shock, cardiac arrest and death. There are accounts of the death of children caused by the ingestion of 1 to 2 seeds.

Passion fruit, *Passiflora adenopoda* Dc., Passifloraceae

The common venezuelan and south american name is "Parchita". The whole plant and its unripe fruit contain large amounts of cyanogenic glycosides, which are biotransformed into hydrocyanic acid, itself hydrolysed into cyanide. Some references exist of children after ingestion of these unripe fruits. It is recommended that this fruit has to be only eaten when ripe (Martinez and Hernandez, 1990; Vélez and Vélez, 1990 ; Martinez, 2000).



Fig. 12. Passion fruit, *Passiflora adenopoda* Dc., Passifloraceae

Fig. 12. Fruit de la passion (passiflore).

Popular culture attributes sedating and fever-causing properties to this plant. The *P. adenopoda* species is the one that contains the higher amounts of cyanide glycosids and because of that it is the most toxic of all.

Other passiflora species are used to treat insomnia, hypertension and cough fits. The way to prepare the tincture is by macerating 200 g of flowers in 1 L of 60° alcohol for 9 days, then it is filtered and stored in a container (Albornoz, 1993 ; Alonso, 2007).

Lemon, *Citrus x limon*, L., Burm. f. Rutaceae

(The common venezuelan name is "limón".) The leaves, bark and flowers contain large amounts of essential oils such as limonene, linalol, nerol, geraniol and β -pinene, while the fruit's flesh contains a large amount of organic acids (citric and malic mainly) and vitamin C ; the pericarp contains pectin. The leaves are diuretic, but do not have hypothermic properties. The juice of the fresh fruit causes gastric stimulation *in vitro*. Essential oils present a broad spectrum of anti-bacterial activity, and they are used as insect repellent (Albornoz, 1993). The aqueous extract of the fruit is active *in vitro* against *Epidermophyton flocosum* and *Trichophyton mentagrophytes*. The concoction has anti-fungal properties when administered orally.



Fig. 13. Key lime, *Citrus aurantiifolia*, Rutaceae

Fig. 13. Citron vert (limette).

It is advisable not to use this fruit or any part of this plant on the skin in the presence of sunlight, because the furocoumarin in the leaves and in the skin of the fruit could trigger photosensitivity, forming dark spots in the skin ; this effect is produced by most citrus species (Martinez and Hernandez, 1990 ; Martinez, 2003, 2006).

Chinese hibiscus, *Hibiscus rosa-sinensis* L., Malvaceae

(Common venezuelan name is "Cayena"). The flower contains citric, oxalic and tartaric acids, sucrose, fructose and glucose ; the presence of alkaloids is presumed in the leaves and stems but there are authors who disagree on this. The flower also contains large amounts of mucilages, lipids, alkanes, B-sitosterol and triterpenoides taraxeril (Srivastava *et al.*, 1976). *Hibiscus* has hypoglycemic activity ; it is used in conjunctivitis, asthma and flu ; additionally, astringent, expectorant, antihemorrhagic and anti-spasmodic properties are attributed to it. It is also used in seat baths in case of hemorrhoids (Alonso, 2007).

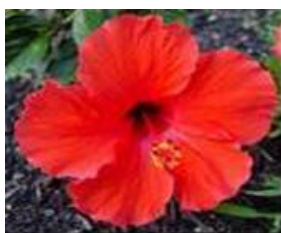


Fig. 14. Chinese Hibiscus, *Hibiscus rosa-sinensis* L., Malvaceae.

Fig. 14. Hibiscus rose de Chine.

This plant should not be used internally because it is too irritating and it is contraindicated for pregnant or breastfeeding women, infants and children under 2 years

of age. It must be prepared in the form of infusions, because, if cooked, it releases a quantity of mucilage with highly irritating properties ; there are references of intoxication from this plant (Martinez *et al.*, 2006). To prepare the infusion adequately, water is boiled and taken off the fire, after which, 2 flowers are added per cup of water, covered for 5 minutes, and then, the flowers are taken out and sugar is added.

Banana, *Musa paradisiaca* L., Musaceae

(The common venezuelan name is "Cambur"). Among the active ingredients present in the skin and flesh of the fruit, serotonin and dopamine are at the highest percentage. Banana also contains free folic acid, norepinephrine, tyramine, malic and peptic acids, and gummy and mucilaginous materials (Velez and Velez, 1990). It is therefore recommended not to ingest alcohol in conjunction with banana, because acute intoxication may appear.



Fig. 15. Banana, *Musa paradisiaca*, Musaceae.

Fig. 15. Bananier

Symptoms include : vomiting, nausea, dizziness, headaches, gastrointestinal discomfort and severe hypotension. The fruit also contains norepinephrine, while the whole plant has a large amount of tanins (Martinez and Hernandez, 1990 ; Farmacopea caribeña, 1997 ; Paez, 2000 ; Martinez, 2006). Popular culture attributes liver-protective qualities to this fruit. It is also used to cure diarrhoea by grating and boiling the unripe banana and taking it in soup (Conaplamed, 2000).

Lemon grass, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, Poaceae

(The common venezuelan name of this plant is "Malojillo"). The active ingredients are citral, D-citronel and geraniol. The whole plant as well as the essential oil extracted from it, are used for the antiseptic, digestive, carminative, bronchodilator and diaphoretic effects attributed to them. They have hypoglycaemic and antimicrobial activities (Gazola *et al.*, 2004 ; Nogueira *et al.*, 2008).



Fig. 16. Lemongrass, *Cymbopogon citratus* (Dc.) Stapf Poaceae.

Fig. 16. Citronnelle.

One must be very careful with this plant, so, concentrated concoctions should not be prepared nor given to children under 2 years of age. There are references to poisoning risks and deaths of children by ingestion of concentrated concoctions of this plant either alone or mixed with acetaminophen (Martinez and Hernandez, 1990 ; Lezama *et al.*, 2002 ; Martinez,

2006). After consuming between 500 and 1000 mL of this concoction some people manifested a weakening or calming sensation. Ingestion of this plant for prolonged periods can produce serious injuries to the oesophageal mucous membrane due to the presence of microfilaments released by the plant while it is being simmered. This inconvenience can be solved by filtering the concoction using a cloth strainer before ingesting it (Martinez and Hernandez, 1990 ; Delens, 2000; Lezama *et al.*, 2002 ; Martinez, 2003). It is popularly used as an insect repellent.

Fig, *Ficus carica* L., Moraceae

The common venezuelan and south american name is "Higo". The following active ingredients are present in this plant : sugars such as glucose, fructose, sucrose ; organic acids such as citric, malic and acetic ; gummy and mucilaginous materials. The branches and leaves contain enzymes of the diastase, esterase, lipase and protease types. Traditionally, fig has been used for their astringent, emollient, expectorant, laxative and keratolytic properties. The latex of this plant has been used as an ointment to remove skin abscesses. In addition, it has hypoglycemic activity and it is used to treat dysentery (Albornoz, 1993). Fig has also been used to cure constipation, bronchitis, hyperlipidemia, eczema, psoriasis, vitiligo and diabetes.



Fig. 17. Fig, *Ficus carica* L., Moraceae.

Fig. 17. Figue.

There are references to cases of perinatal asphyxia in infants after ingestion of concoction of fig leaves based on the popular belief that such extract facilitates and relieves labour without taking into account that it directly affects both the mother and the child, who in many cases dies from respiratory depression shortly after being born, (Martinez, 2003, 2006, 2008).

Peppermint, *Menta x piperita* L., Lamiaceae

(Hierbabuena o Yerbabuena in South America). The leaves of peppermint contain essential oils made up of menthol (33-35%), menthyl acetate (10-20%), menthone (9-13%) and to a lesser extent the B-phellandrene, limonene (3-7%), pinene, piperitone, pulegone (0.5-4%), isomenthone, sabinene, esters of menthol (valerianate, isovalerianate, acetates, etc) (Alonso, 2007).



Fig 18. Peppermint, *Menta x piperita*, L., Lamiaceae.

Fig 18. Menthe poivrée.

The content in essential oils varies according to

species, age of the leave and hours of exposition of the plant to sunlight. When the plant is very young, the essential oil is rich in pulegone and poor in menthone and menthol, a ratio that reverses as the plant matures. Peppermint is used for its anti-spasmodic, carminative, digestive, anti-emetic, analgesic and anti-pruritic properties, among others (Alonso, 2007).

Brews of the plant should not be prepared very concentrated since that could produce narcotic effects, inhibit voluntary and reflex movements and even cause death by respiratory depression (Beziat, 1983). Brews should not be administered to patients with liver damage or biliary obstruction, to children under two years of age, or to pregnant or breast-feeding women (Shultz *et al.*, 2001). There are references to poisoning in children under two years of age (Della Loggia and Tubaro 1990 ; Meneghello, 1991 ; Gobel *et al.*, 1994 ; Martinez, 2006).

Conclusion

All that has been said about these plants, their active ingredients, their toxicity levels, and everything concerning popular culture is an approximation between official medical knowledge and popular wisdom. It all shows that these plants have not only therapeutic but also toxic properties and that it is essential for all the professionals and/or communities using the plants to know about their benefits and risks. After comparing scientific knowledge with popular wisdom, it can be concluded that there exist many coincidences, but some differences as well. It was observed that those who were interviewed were confused as to the preparation procedures and they stated that infusion and concoction were similar ; this confusion may cause problems and adverse reactions, since many plants become toxic when cooked. Infusion consist of pouring boiling water on the plant without cooking and concoction is when the plant is simmered for approximately 5-10 min, after the water has reached the boiling point. There lies the importance of knowing what the beliefs of some communities are, regarding the use of plants and also the importance of teaching those communities how to use them properly when necessary.

Acknowledgements. We especially thank our friend Pedro Prince for his support in the translation of this paper to the English language, in this final version.

References

- Albornoz A. (1993) Medicina Tradicional Herbaria. Instituto Editorial Farmacoterapéutico Latino S.A., Caracas, Venezuela pp. 346, 403, 453, 465, 472, 479.
- Alonso J. (2007) Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Editorial Corpus y Distribuidora Rosario, Argentina pp. 47, 720-23, 799-802, 876-77.
- Atal C., Kapur B. (1982) Cultivation of Medicinal Plants. *Jammu-Tawi. Reg. Res. Lab.* pp. 877.
- Beziat M. (1983) Toxicité des huiles essentielles. Thèse Universitaire. Univ. Montpellier.
- Canales M. (2001) Investigación Cualitativa y Reflexividad Social (Ed.) Medellín.
- <http://www.wa.es/ponencia.contexto>
- Daniel H., Sabris S. (1978) Chemotaxonomical studies on Apocynaceae. *Indian J. Exp. Biol.* 16:512-3.
- Delens M. (2000) Cuaderno de Fitoterapia Clínica. Conaplamed. Vol I. Editorial Edigráfica C.A. Mérida, Venezuela pp. 23-24, 31-32, 41-42.
- Della Loggia R., Tubaro A. (1990) Evaluation of some pharmacological activities of a peppermint extract. *Fitoter. Vol LXI* 3: 215-21.
- Duke J. (1992) Handbook of Biologically active phytochemicals and their bioactivities. Boca Ratón, Florida: CRC Press, pp. 183.
- Duke J. (1992) Handbook of phytochemicals constituents of GRAS herbs and other economic plants. Boca ratón, Florida: CRC Press, pp. 654.
- Farmacopea Caribeña (1997) Emile Desormeaux (Ed.) Francia. pp. 75-79, 169-171.
- Griffiths L. (1959) On the distribution of gentisic acid in green plant. *J. Exp. Biol.* 10:437.
- Gobel H., Shmidth G., Soyka D. (1994) Effects of peppermint and eucalyptus oil preparations on neurophysiological and experimental algometric headache parameters. *Cephalgia* 14:228-34.
- Guerrero L. (2001) La Entrevista en el Método Cualitativo (Ed.) Santiago de Chile.
- Hennebelle T., Sahpaz S., Joseph H., Bailleul F. (2008) Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *J. Ethnopharmacol.* 116:211-22.
- <http://www.csociales.uchile.cl/investigacion/genetica/cg04.htm>
- Jiménez S. (2001) Toxicología. Editorial El Manual Moderno, Bogotá, Colombia, pp. 508-16.
- Jisen P., Shukla B., Patraik G., Tripathi S., *et al* (1992) Hepatoprotective activity of *Ricinus communis* leaves. *Int. J. Pharmacogn.* 30:241-50.
- Lezama B., Martínez N., González M., Parra X. (2002) Encefalopatía Tóxica por Malojillo y Orégano. *Farmacia al Día* 13(2) :103-8.
- Marroquín E. (1992) Clinical trial of *Jatropha curcas* in the treatment of common warts (Ed.) TRAMIL Vol. VI. Guadalupe. U.A.G / Enda Caribe.
- Martínez N., Hernández J. (1990) Intoxicaciones por Plantas en la Infancia. Compendio de Puericultura y Pediatría. Tomo II. Ediciones de la Biblioteca de la Universidad Central de Venezuela. Caracas, pp. 339-49.
- Martínez N., Correa J., Flores N., Rivero K. (2001) Intoxicación por *Hibiscus*. *Farmacia al Día* 12(12):591-5.
- Martínez N. (2003) Las Plantas Medicinales no son tan Inofensivas como Parecen. Latin American Society for Nutrition (Ed.) Venezuelan chapter, pp. 17-29.
- Martínez N. (2006) Elementos Culturales en relación con la utilización de las Plantas Medicinales en Venezuela desde una Teoría de Acción Humana con un Enfoque Socioeducativo. Tesis Doctoral trabajo de Ascenso. Universidad de Carabobo.
- Martínez N. (2006) Intoxication by Peppermint (*Mentha x piperita*). Comparison of two pediatric cases. 2nd International Conference on Natural Toxins, Cairo, Egypt, Abstract p. 83.
- Martínez N. (2008) Fitoterapia en Uso por la Población de Santa Rita, Municipio Francisco Linares Alcántara, estado Aragua. Trabajo de Ascenso. Universidad de Carabobo. Venezuela.
- Meneghello J. (1991) Pediatría. Vol II 4^o (Ed.) Mediterranea.
- Misas C., Hernández N., Abraham A. (1979) Contribution to the biological evaluation of cuban plants. *Revista cubana de Medicina Tropical* 31:5-51.
- Páez F. (2000) Plantas Tóxicas que nos Rodean. Ediciones de la Universidad Ezequiel Zamora, Colección Ciencia y Tecnología, arinas, Venezuela, pp. 87-89.
- Serrano B.J. (2004) Estudio de Casos en Etnografía, Metodología en la Investigación Sociocultural. Editorial Alfa Omega grupo, Editor S.A. México D.F., pp. 203, 217.
- Shultz V., Hânsel R., Tyler V. (2001) Rational Phytotherapy (Ed.) Springer Verlag.
- Srivastava D., Bhatt S., Udupa K. (1976) Gas chromatographic identification of fatty alcohol and hydrocarbons of *Hibiscus rosa-sinensis* leaves. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* 53:607.
- Tamayo (2001) El Proceso de Investigación Científica. 4^o Edición. Editorial Limusa. México.
- Taylor S., Bogdan R. (1998) Introducción a los Métodos Cualitativos de Investigación (Ed.) Paidós, Barcelona, España.
- Thomaso O. (1989) Re-examination of the antimicrobial activities of *Xilopia acthiopica*, *Carica papaya*, *Ocimum gratissimum* and

- Jatropha curcas*. *Fitoterapia* 60:147-55.
- Topolov, T., Gabrolov M., Yankolov J (1983) Plantas Medicinales & Fitoterapia (Bilki & Belcosvirane). Plovdiv (Ed.) Jristo G. Danov, pp 443-528.
- Usher R., Bryant I. (1997) La Educación de Adultos como Teoría, Práctica e Investigación: El Triángulo Cautivo. Editorial Morata. Segunda Edición. Madrid España.
- Vélez F., De Vélez G. (1990) Plantas alimenticias de Venezuela autóctonas e introducidas. Fundación Bigott Sociedad de Ciencias Naturales La Salle, pp 55.
-

Profil des accidents par des animaux venimeux au Brésil, 2001 à 2006

Rosany BOCHNER^{1*}, Judith Tiomny FISZON²

¹ Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde (ICICT), Laboratório de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde (LabCiTleS), Av. Brasil, 4365 – Prédio Haity Moussatché, sala 206, CEP. 21045-900 – Rio de Janeiro, Brasil ; ² Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP), Departamento de Ciências Sociais (DCS), Rua Leopoldo Bulhões, 1480, sala 909, CEP. 21041-210 – Rio de Janeiro, Brasil.

* Auteur correspondant ; Tel : + 55 21 3865-3247 ; Fax : +55 21 2290-1696 ; Courriel : rosany@cict.fiocruz.br

Résumé

Dans les années 80, l'épidémiologie des envenimations au Brésil présentait les fréquences relatives suivantes : serpents (62%), scorpions (22%), araignées (16%). Les données de 2001 à 2006 ont été collectées en considérant les régions géographiques du pays, l'animal agresseur, le profil de la victime, la rapidité d'intervention et l'efficacité des soins. On a constaté une augmentation du taux moyen de ces accidents : 16% par des scorpions, 12% par des araignées et 9% par des serpents. Depuis 2004, le scorpion est devenu le responsable de la majorité des accidents. En 2006, la fréquence relative des envenimations ophidiennes et scorpioniques était de 34% et 44%. Plusieurs hypothèses peuvent justifier cette situation. L'augmentation de la sévérité des accidents et les changements environnementaux peuvent indiquer une nouvelle distribution d'espèces des animaux venimeux.

Profile of accidents caused by venomous animals in Brazil, 2001-2006

In the 80's, the epidemiology of venomous animals' accidents in Brazil presented the following relative frequencies : snakes (62%), scorpions (22%) and spiders (16%). Data from 2001 to 2006 were collected according to the geographical regions of the country, aggressor, profile of the victim, rapidity of intervention and care effectiveness. The results point to an annual tax increase of accidents : 16% for scorpions, 12% for spiders and 9% for snakes. Since 2004, scorpions became to be responsible for the greater part of cases. In 2006 the relative frequency of ophidism was 34% and of scorpionism was 44%. Different hypotheses could justify this picture. The seriousness of the accidents and changes in the environment could indicate a new distribution of venomous animal species.

Keywords : Snakes, spiders, scorpions.

Introduction

Le Brésil est un pays aux dimensions continentales (8,5 millions de kilomètres carrés) dont la population atteint 189 millions d'habitants en 2007. Le pays est partagé en cinq régions qui présentent une grande diversité démographique, socio-économique et environnementale. Dans les années 80, quand le Brésil a commencé à enregistrer les accidents dus à des animaux venimeux (serpents, araignées et scorpions), 77% des envenimations étaient causées par des serpents. Au début du XXI^{ème} siècle, les données rendues disponibles par Internet par le Sistema de Informação de Agravos de Notificação-SINAN¹ permettent d'actualiser l'épidémiologie des accidents par des animaux venimeux (serpents, araignées, scorpions, abeilles, chenilles, poissons et autres animaux) jusqu'en 2006. Cette source d'information considère seulement les victimes qui ont eu recours à des soins médicaux. Ainsi, ont été enregistrées dans l'année 2006, 99.441 envenimations par différents

animaux, dont 29.215 causées par des serpents, 19.119 par des araignées et 38.407 par des scorpions. Les envenimations causées par ces trois groupes d'animaux ont été analysées pendant la période 2001 à 2006 selon la région géographique, l'animal agresseur (serpent, araignée et scorpion), la morbidité (le nombre total d'envenimations suivies de soins médicaux pour 100.000 habitants), la létalité (pourcentage représentant le nombre de décès par envenimation par rapport au nombre total de victimes), le profil de la victime, la rapidité de l'intervention et l'efficacité des soins.

Envenimations selon la région géographique et l'animal agresseur

Au Brésil, entre 2001 à 2006, le nombre des accidents par les trois types d'animaux venimeux a augmenté avec des taux moyens annuels de 16% pour les scorpions, 12% pour les araignées et 9% pour les serpents. Dans le même temps, la population brésilienne a augmenté de 1,6% par an. Le nombre d'envenimations par des scorpions a pris une importance telle qu'en 2004 il a dépassé celui dû à des serpents et en 2006, 44% des envenimations ont été

¹ <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinan/animaisp/bases/animaisbr.def>

causées par des scorpions contre 34% causées par des serpents (*Tableau 1*). La *Figure 1* montre la diversité entre les régions en ce qui concerne la démographie et l'urbanisation qui gèrent des distributions différentes par les trois types d'envenimation.

Tableau 1. Nombre d'envenimations par des serpents, par des araignées et par des scorpions au Brésil pour la période 2001 à 2006.

Table 1. Snake, spider and scorpion envenomings in Brazil between 2001 and 2006.

Années / Période	Animaux		
	Serpents	Araignées	Scorpions
2001	18657	10862	18179
2002	23725	12981	22934
2003	26739	15905	24546
2004	27625	18097	30287
2005	28608	19531	35943
2006	29215	19119	38407
2001-2006	154569	96495	170296

Source : Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN

Entre 2001 et 2006, c'est dans les régions Nord-est et Sud-est qu'a été enregistrée la majorité des envenimations (255.816 sur 421.360, soit 61%). Ces régions présentent des résultats semblables en ce qui concerne les fréquences absolues d'accidents par des

scorpions et par des serpents et l'envenimation scorpionique prédomine. La région Sud-est est la plus peuplée (43% de la population du pays) et la plus urbanisée (91% d'urbanisation). La morbidité d'envenimation par des scorpions dans la région Nord-est est la plus élevée du pays (26/100.000 habitants) suivie de la morbidité de la région Sud-est (16/100.000 habitants) (*Tableau 2*). Dans les régions Nord et Centre-ouest, l'envenimation ophidienne est la plus fréquente. Ces régions sont les moins peuplées, et c'est là que le nombre total de victimes des trois types d'accidents est le plus bas. Pourtant, elles présentent une grande activité agricole et pastorale qui favorise l'occurrence d'accidents ophidiens (Chippaux, 1998, 2002). Cela explique que la morbidité des envenimations par serpents y soit élevée (49 et 20/100.000 habitants) (*Tableau 2*).

La région Sud a un comportement singulier ; les accidents par des araignées sont les plus fréquents avec une forte morbidité (44/100.000 habitants) et l'envenimation scorpionique présente la plus petite fréquence absolue observée et la morbidité la plus faible (2/100.000 habitants (*Tableau 2*). Par contre, la létalité due aux morsures de serpents est la plus élevée, celle des accidents dus aux araignées est la plus faible.

La forte létalité observée dans la région Centre-Ouest est plus surprenante ; c'est la plus élevée du pays (*Tableau 2*).

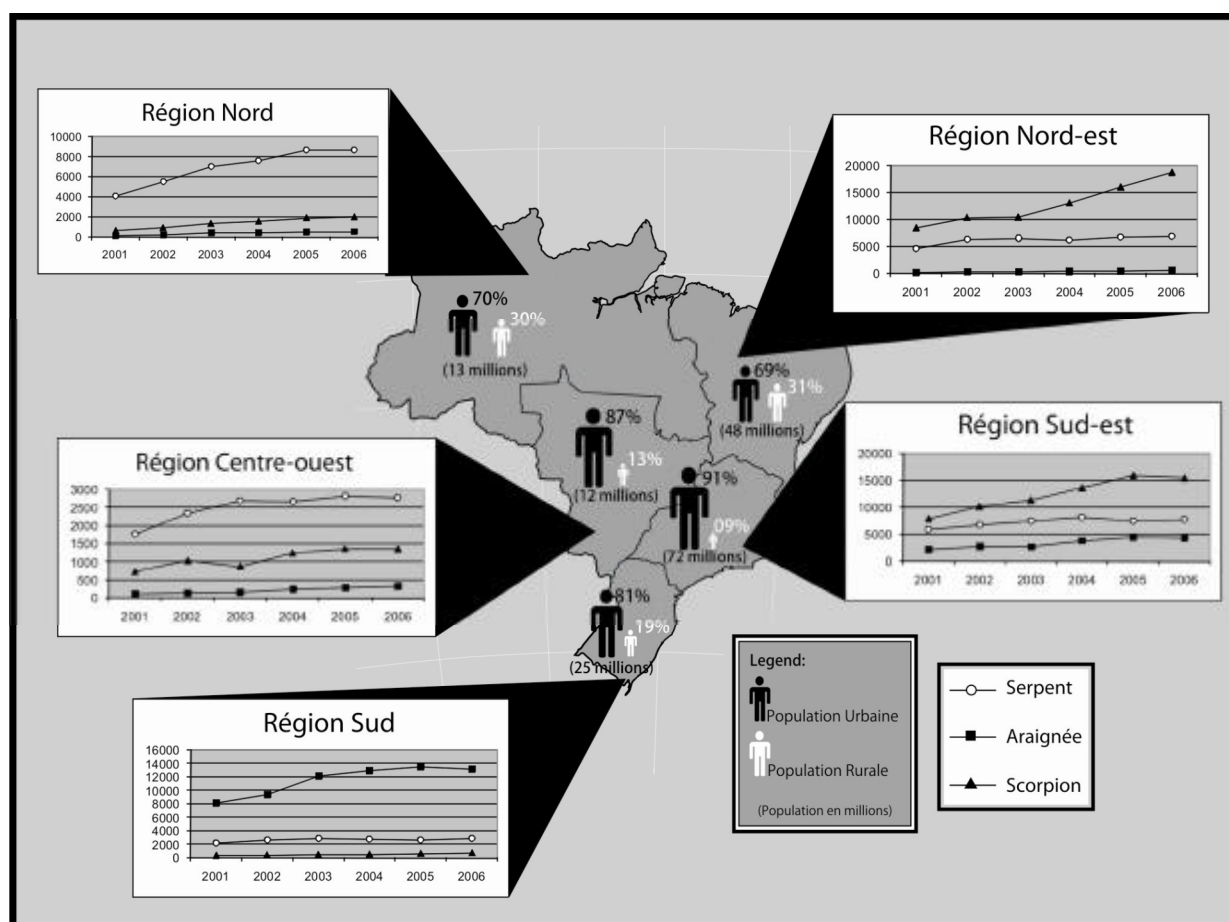


Fig. 1. Fréquence absolue des envenimations (serpents, araignées, scorpions) pour les années 2001 à 2006, la population totale (2000) et sa distribution urbaine et rurale pour chaque région du Brésil.

Fig. 1. Snake, spider and scorpion envenomings, 2001 – 2006, regional urban and rural population in Brazil, 2000.

Tableau 2. Morbidité et létalité des envenimations par des serpents, des araignées et des scorpions au Brésil pour la période 2001 à 2006.

Table 2. Morbidity and lethality of snake, spider and scorpion envenomings in Brazil, 2001 - 2006.

Pays et Régions	Morbidité des envenimations/ 100.000 hab.	Létalité
BRÉSIL		
Serpent	14	0,39
Araignée	9	0,04
Scorpion	16	0,16
Région Nord		
Serpent	49	0,49
Araignée	3	0,08
Scorpion	10	0,17
Région Nord-est		
Serpent	13	0,48
Araignée	1	0,08
Scorpion	26	0,13
Région Sud-est		
Serpent	10	0,25
Araignée	4	0,04
Scorpion	16	0,19
Région Sud		
Serpent	10	0,19
Araignée	44	0,04
Scorpion	2	-
Région Centre-ouest		
Serpent	20	0,57
Araignée	2	0,08
Scorpion	9	0,30

Sources : Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, Departamento de Informática do SUS - DATASUS

Profil des envenimations par des animaux venimeux

Le *Tableau 3* présente un résumé du profil des victimes d'envenimations, la rapidité de l'intervention et l'efficacité des soins. Les classes d'âge qui comptent le plus grand nombre d'envenimations sont 20 - 39 et 40 - 59 ans. Pourtant, plus de 25% des victimes de l'envenimation scorpionique sont des enfants et des jeunes d'âge inférieur à 15 ans.

Les envenimations par des araignées et par des scorpions se répartissent de façon équivalente entre les deux sexes, mais en ce concerne les accidents ophidiens, les hommes sont près de trois fois plus atteints.

Les données de scolarité sont incomplètes pour 31% des notifications d'envenimation. En ce qui concerne les données complètes (*Tableau 3*), on peut vérifier que la scolarité des victimes des accidents ophidiens est inférieure au niveau d'instruction des autres victimes.

Le délai de consultation après l'accident est variable selon l'animal agresseur. Si d'une part, 40,3% des accidents par scorpion sont accueillis par des services de santé en une heure, d'autre part, 27,2% des victimes des accidents par des araignées reçoivent les premiers secours après douze heures. Plus de la moitié

des victimes des accidents ophidiens arrivent aux services de santé en moins de trois heures, ce qui est un délai raisonnable pour un traitement thérapeutique adéquat. Le haut pourcentage de guérison reflète l'efficacité de soins pour les trois types d'envenimation.

Considérations finales

On peut constater l'augmentation du nombre d'accidents causés par ces trois types d'animaux recensés par les services de santé. Plusieurs hypothèses peuvent justifier cette situation :

- Le report des cas est dépendant de facteurs comme la sévérité clinique, la capacité de prise en charge, le réseaux d'information épidémiologique. Ainsi il peut être amélioré dans le temps, notamment avec l'expérience du personnel de santé, ce qui peut « artificiellement » augmenter le nombre de victimes sollicitant des soins.

- L'amélioration de la prise en charge des envenimations par les services de santé, incite les victimes à davantage consulter.

- La diminution de la surface de la forêt (activités agricoles et pastorales et développement urbain rapide et mal contrôlé) a pu favoriser une nouvelle distribution des espèces venimeuses et un rapprochement entre l'Homme et l'animal agresseur (Lourenço *et al.*, 1995a, 1995b ; Goyffon, 1995).

- L'augmentation de la sévérité des accidents, en particulier par des araignées et par des scorpions, peut justifier la croissance d'utilisation de soins médicaux et par conséquent, le nombre de notifications (White, 1995).

- La croissance du nombre de cas d'envenimations scorpioniques et la gravité de ces accidents peut être expliquée, dans la région Sud-est, par la substitution de *Tityus bahiensis* par *Tityus serrulatus*, qui est une espèce plus dangereuse et bien adaptée aux nouvelles conditions environnementales, le résultat des activités humaines (Lourenço *et al.*, 1995a, 1995b ; Eickstedt *et al.*, 1996). Dans cette région, la petite différence entre les létalités des accidents par des serpents et par des scorpions renforce cette hypothèse d'une concentration plus grande de *Tityus serrulatus* et plus proche de l'Homme par rapport aux autres espèces de scorpions.

- La rapidité de l'intervention après les accidents par des scorpions peut être liée au fait que ces accidents arrivent plus fréquemment dans des zones urbaines, plus proches des centres de traitement.

- Une autre considération est liée au groupe d'âge plus atteint pour ce type d'accident, les enfants et les jeunes, qui demandent plus de soins.

- Il y a aussi l'autre explication, la douleur intense au moment de la piqûre, qui incite la victime à chercher un soin médical immédiatement.

Les accidents par des araignées arrivent aussi plus fréquemment dans les zones urbaines, mais le retard de l'intervention est lié à l'espèce d'araignée *Loxosceles*, responsable de la plupart de ces accidents au Brésil. La morsure de cette araignée n'est douloureuse qu'après quelques heures, ce qui peut expliquer le retard de l'intervention. En plus, la plupart de ces accidents arrivent fréquemment la nuit et peuvent passer inaperçus par la victime jusqu'au matin (White, 1995).

Malgré le grand nombre d'études sur les envenimations ophidiennes, les variables utilisées au Brésil sont les mêmes que celles qui ont été utilisées par Vital Brazil dans le début du XX^{ème} siècle (Bochner *et al.*, 2003, 2004). Les changements dans le profil

épidémiologique des envenimations par des animaux venimeux et la disponibilité de nouvelles données par le SINAN demandent des études complémentaires pour

comprendre les relations entre la fréquence de cas et les données socio-économiques, environnementales et biologiques par chaque région du pays.

Tableau 3. Profil des envenimations par des animaux venimeux au Brésil, 2001 à 2006.

Table 3. Profile of envenomings in Brazil, 2001 – 2006.

Groupe d'âge	Serpent			Araignée			Scorpion		
	N ^o	%	% Accumulé	N ^o	%	% Accumulé	N ^o	%	% Accumulé
<5	4305	2,8	2,8	6475	6,7	6,7	13232	7,7	7,7
5-9	8806	5,7	8,5	5629	5,8	12,5	14906	8,7	16,5
10-14	14003	9,0	17,5	5689	5,9	18,4	14759	8,6	25,1
15-19	18016	11,6	29,1	7696	8,0	26,3	15631	9,1	34,3
20-39	58938	38,0	67,1	35738	36,9	63,3	57703	33,8	68,0
40-59	38620	24,9	92,0	25592	26,5	89,7	36876	21,6	89,6
≥ 60	12372	8,0	100,0	9801	10,1	99,9	17712	10,4	100,0
Ignoré	25	0,0		118	0,1		56	0,0	
Sexe	N ^o	%		N ^o	%		N ^o	%	
Masculin	119320	76,9		47405	49,0		88796	52,0	
Feminin	35629	23,0		49257	50,9		81935	48,0	
Ignoré	136	0,1		76	0,1		144	0,1	
Scolarité	N ^o	%	% Accumulé	N ^o	%	% Accumulé	N ^o	%	% Accumulé
Aucun année conclu	17674	11,4	11,4	3468	3,6	3,6	10126	5,9	5,9
1 - 3 annés conclus	31002	20,0	31,4	13134	13,6	17,2	20680	12,1	18,0
4 - 7 annés conclus	41949	27,0	58,4	27665	28,6	45,8	32696	19,1	37,2
8 - 11 annés conclus	10679	6,9	65,3	14946	15,4	61,2	15097	8,8	46,0
≥ 12 années conclus	2253	1,5	66,8	6112	6,3	67,5	3995	2,3	48,3
Ne s'applique pas	8758	5,6		9213	9,5		20706	12,1	
Ignorée	42770	27,6		22200	22,9		67575	39,5	
Heures après l'accident	N ^o	%	% Accumulé	N ^o	%	% Accumulé	N ^o	%	% Accumulé
0-1	36064	23,3	23,3	19737	20,4	20,4	68866	40,3	40,3
1-3	51055	32,9	56,2	16500	17,1	37,5	45215	26,5	66,8
3-6	26411	17,0	73,2	7979	8,2	45,7	15868	9,3	76,0
6-12	15064	9,7	82,9	11640	12,0	57,7	8030	4,7	80,7
≥ 12	11823	7,6	90,5	26284	27,2	84,9	6336	3,7	84,5
Ignoré	14668	9,5		14598	15,1		26560	15,5	
Évolution	N ^o	%		N ^o	%		N ^o	%	
Guérison	132269	85,3		89365	92,4		157670	92,3	
Guérison avec séquelle	2650	1,7		991	1,0		1249	0,7	
Décès	610	0,4		40	0,0		277	0,2	
Ignorée	19556	12,6		6342	6,6		11679	6,8	

Source : Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN

Références bibliographiques

- Bochner R., Struchiner C.J. (2004) Aspectos ambientais e sócio-econômicos relacionados à incidência de acidentes ofídicos no Estado do Rio de Janeiro de 1990 a 1996: uma análise exploratória. *Cad. Saúde Pública* 20:976-85.
- Bochner R., Struchiner C.J. (2003) Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. *Cad. Saúde Pública* 19:7-16.
- Chippaux J.P. (2002) *Venins de serpent et envenimations*. IRD Éditions, Paris, 288 p.
- Chippaux J.P. (1998) Snake-bites : appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ* 76:515-24.
- Goyffon M. (1995) New epidemiological aspects of scorpionism. In: Bon C., Goyffon M. (Eds.), *Envenomings and their treatments*, Ed. Fondation Marcel Mérieux, Lyon, pp. 25-9.

- Eickstedt V.R.D. von, Ribeiro, L.A., Candido, D.M., Albuquerque, M.J., Jorge, M.T. (1996) Evolution of scorpionism by *Tityus bahiensis* (Perty) and *Tityus serrulatus* Lutz and Mello and geographical distribution of the two species in the state of São Paulo – Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins* 2:92-105.
- Lourenço W.R., Cuellar O. (1995a) Scorpions, scorpionism, life history strategies and parthenogenesis. *J. Venom. Anim. Toxins* 1:51-62.
- Lourenço W.R., Cloudsley-Thompson J.L. (1995b) Effects of human activities on the environment and on the distribution of dangerous species of scorpions. In: Bon C., Goyffon M (Eds.), *Envenomings and their treatments*, Ed. Fondation Marcel Mérieux, Lyon, pp. 49-60.
- White J. (1995) An overview of spider bite and its treatment. In: Bon C., Goyffon M (Eds.), *Envenomings and their treatments*, Ed. Fondation Marcel Mérieux, Lyon, pp. 321-35.

Les toxines des venins des scorpions du genre *Androctonus*

Najwa ABBAS¹, Jean-Pierre ROSSO¹, Maya BELGHAZI², Brigitte CEARD¹, Pierre-Edouard BOUGIS¹, Marie-France MARTIN-EAUCLAIRE^{1*}

¹ Equipe ToxCiM, Département de Signalisation Neuronale, Centre de Recherche en Neurobiologie-Neurophysiologie de Marseille (CRN2M, CNRS UMR-6231), Universités de la Méditerranée et Paul Cézanne ; ² Centre d'Analyse Protéomique de Marseille (CAPM), IFR Jean Roche, Faculté de Médecine Secteur Nord, Bd Pierre Dramard, 13916 Marseille cedex 20, France.

* Auteur correspondant ; Tél : +33 (0)4 91 69 89 14 ; Courriel : marie-france.eauclaire@univmed.fr

Résumé

Parmi les scorpions les plus dangereux au Monde, il faut citer en priorité certaines espèces du genre *Androctonus*, comme *Androctonus australis* en Algérie et en Tunisie ou *Androctonus mauretanicus* au Maroc. Ces deux espèces sont responsables d'environ 100 000 piqûres par an sur l'ensemble du Maghreb, suivies de 1 à 7 % de décès. Les composants de leurs venins présentant une activité toxique sont à ce jour bien identifiés et caractérisés sur les plans chimique, pharmacologique et immunologique. Les toxines les plus mortelles pour les Mammifères par voie périphérique modulent les canaux sodium activés par le voltage (Na_v). Ici sera effectué un bilan des toxines identifiées à partir des venins de deux espèces d'*Androctonus* et sera discutée l'immunothérapie mise en œuvre pour les combattre.

The toxins from the scorpions *Androctonus*

Among the most dangerous scorpions in the World, some species from the genus *Androctonus*, as *Androctonus australis* in Algeria and Tunisia and *Androctonus mauretanicus* in Morocco have to be held up in priority. These two species are responsible of about 100 000 stings each year in North-Africa. These stings are followed by 1 to 7 % of casualty. The toxic components of their venoms are today perfectly well characterized at the chemical, pharmacological and immunological levels. The most lethal toxins for mammals by subcutaneous injection bind to voltage-gated sodium channels (Na_v) from excitable cells. Here will be achieved an overview of the toxins identified from venoms of two species of *Androctonus* as well as a discussion concerning immunotherapy.

Keywords : Scorpion toxins, Na_v channels, *Androctonus*, immunotherapy.

Introduction

Les scorpions les plus dangereux pour l'Homme sont regroupés dans la famille des Buthidés. Environ une vingtaine d'espèces seulement pose des problèmes de santé publique majeurs aux pays concernés par leur présence. Parmi elles, il faut citer en priorité certaines espèces de l'Ancien Monde appartenant au genre *Androctonus*, comme *A. australis* en Algérie (morpho hector) et en Tunisie (sous espèce *garzonii*) ou *A. mauretanicus* au Maroc. Ces deux espèces sont responsables d'environ 100.000 piqûres par an sur l'ensemble du Maghreb, suivies de 1 à 7 % de décès. Elles sont reconnues comme les plus mortelles au Monde, avec une DL_{50} (dose létale pour 50 % des individus d'une population homogène de la même espèce) moyenne variant entre 1 et 5 μ g pour la souris de 20 g en injection sous-cutanée. En outre, ces animaux de grande taille peuvent inoculer jusqu'à 500 μ g d'un venin particulièrement riche en toxines. À cause de leur dangerosité, les venins de ces deux espèces d'*Androctonus* ont fait l'objet d'études approfondies et la majorité de leurs composants présentant une activité toxique est à ce jour bien identifiée et caractérisée sur les plans chimique, pharmacologique et immunologique. Les toxines les plus mortelles pour les Mammifères par voie périphérique modulent les canaux sodium activés par le voltage (Na_v), c'est-à-dire les protéines membranaires

responsables du transit des ions sodium. Leur fixation sur le site 3 du canal prolonge sa phase d'inactivation, provoque une large entrée de sodium dans la cellule et entraîne une dépolarisation de la membrane cellulaire. Ces toxines, dites toxines «alpha», sont responsables de 90 % de l'activité létale des venins des *A. australis* et *mauretanicus*. Leur neutralisation par des anti-sérums spécifiques permettrait d'inhiber totalement l'activité létale du venin, mais, malheureusement, leur grand polymorphisme antigénique, dû au large polymorphisme structural de ce groupe de toxines, complique la sérothérapie.

Résultats

Les peptides du venin d'*Androctonus australis*

Nous présentons (Figure 1) l'ensemble des séquences d'acides aminés des toxines d'*A. australis* caractérisées à ce jour et publiées dans la littérature (données d'Uniprot). Outre les toxines de type alpha particulièrement létales dont les propriétés chimiques et biologiques ont été extrêmement étudiées, figurent ici des molécules ne présentant aucun danger pour l'être humain et qui sont cependant particulièrement intéressantes du point de vue de leur pharmacologie. Sont listées diverses toxines décrites comme étant de type «bêta», c'est-à-dire des toxines capables d'agir au niveau de l'activation des canaux Na_v en se fixant sur le

site 4 situé dans le domaine II des canaux, ainsi que le font les toxines composant majoritairement les venins des scorpions du Nouveau Monde. Chez *Androctonus australis* sont trouvées des toxines spécifiques des canaux Na_v d'insecte (par exemple l'AaH IT1 de type contracturant) et dépourvues totalement d'activité toxique pour les Mammifères. D'autres toxines présentent une totale innocuité par voie sous-cutanée mais sont

toxiques par voie intra-cérébroventriculaire chez la souris. Citons les bloqueurs de canaux K⁺, qui existent comme molécules courtes d'une trentaine de résidus d'acides aminés (elles sont appelées alpha-KTx) ou longues (ce sont alors des bêta-KTx ou K-bêta). Enfin, figurent ci-dessous des séquences déduites d'ADNc clonés mais dont les protéines n'ont pas forcément été mises en évidence.

ANDROCTONUS AUSTRALIS		
Prot.	masse	
P699397117	KLVKYAVFVGTLRLTLQTVVHKVGKTQFGCPAYQGYCDDHCQD-IKKEEGFCHGF---KCKCGIPMGF	AaTX K-β
P456964021	VRIPVSKCH-SGQCLPKCKD-AGMRFGKCMNG---KCDCTPK	kaliotoxin-2(KTX2)
P602333869	QNETNKKCQG--GSCASVCRRVIGVAAGKCIING---RCVCYP	α-KTx15.1(Aa1)
Q86SD83853	QVETNKKCQG--GSCASVCRRVIGVAAGKCIING---RCVCYP	α-KTx15.x1 (ADNc)
Q867F43867	QIETNKKCQG--GSCASVCRRVIGVAAGKCIING---RCVCYP	α-KTx15.x2 (ADNc)
P566864206	GFGCPFNQGACHRHCRS-IRRRGGYACAGLFKQTCTCYR	defensin
P566853968	SIVPIRCRSNRD-CRRFCGF---RGGRCITYA-RQ-CLCGY	buthinin
P566843076	RSVCRRQIKI-C-----RRRGG-CYYK---CTNRPY	androctonin
Q9blm37170	ARDAYIAKND-NCVYE--CFQDSY---CNDLC-TKNGAKSGTCDWIGTYGDACLALPDNVP-IKLS-GECHR	AahP985
Q9blm47187	KKDGIVDDK-NCTFF--CGRNAY---CNDEC-KKKGAESEGYCQWASPYGNACYCYKLPDRVS-TKKK-GGCN	AahP1005
P014847244	VKDGIVDDV-NCTYF--CGRNAY---CNEEC-TKLKGESGYCQWASPYGNACYCYKLPDHVR-TKGP-CRCH	Aah II
P014796803	KRDGYIVYPN-NCVYH--CVPP-----CDGLC-KKNGGSSGSCSFLVPSGLACWCKDLDPNVP-IKDTSRKCT	Aah I
P014806822	VRDGIVDDK-NCVYH--CVPP-----CDGLC-KKNGAKSGSCGFLIPSGLACWCVLPDPNVP-IKDPSPYKCHS	Aah III
P456586883	GRDGIVDDK-NCVYH--CVPP-----CDGLC-KKNGAKSGSCGFLVPSGLACWCKDLDPNVP-IKDPSPDDCHK	Aah IV
P567437340	GRDGIVVKNGTNCKYS--CEIGSEYE-YCGPLCKRKNAKT-GYCY-----AFACWCIDVDPDDVKLYGDDGTYCSS	Aah VI
P809507632	ARDGYIVHDGTNCKYS--CEFGSEYK-YCGPLCEKKAKT-GYCY-----LFACWCIEVPDEVRVWGEDGFMCS	anatsrl
P815046880	DGYI-KRHDGCKVT--CLINDN-Y--CDTEC-KREGGSYGYCYSV---GFACWCEGLPDDKA-WKSETNTCD	Aah IT5
P211507778	EHGYLLNKYTCKVW--CVINNE-E--CGYLCNKRGGYGYCYFW---KLACYCQGARKSEL-WNYKTNKCDL	Aah IT4
P151477869	KKNGYAVDSSGKAPECLLSNYCYNECTKVHYADKGYCCLLSYCFGLNDDKKVLEISDTRKSYCDTPIIN	Aah IT2
P014977824	KKNGYAVDSSGKAPECLLSNYCNNECTKVHYADKGYCCLLSYCFGLNDDKKVLEISDTRKSYCDTTIIN	Aah IT1
Q9BLM05538	VRDGIVFVEPD-NCVH--CMPSSE-M--CDRGC-KHNGATSGSCAFSKGKNACWCKGL	Ntx P993
Q9BLM15904	VRDGIVFVEPD-NCLVY--CMPSPE-I--CDRGC-KRYGATSGFCKEFSKGENFCWCKGL	Ntx P996
Q9BLM25656	VRDGIVFVEPD-NCVIY--CMPSSE-V--CDRGC-KHNGATSGTCKEFSKGNVCWCKGL	Ntx P1008
Q4LCT16012	ADVPNGNYPLDSSDDTYL-CAPLGE-NPSCIQIC-RKHGVKYGICYAFQ----CWCEYFGR	peptide AaF1CA7
Q4LCS76566	ADVPNGNYPLDSSDDTYL-CAPLGE-NPSCIQIC-RKHGVKYGICYAFQ----CWCEYLED-KNVKS	peptide AaF1CA26
Q4LCS96592	ADVPNGNYPLDSSDDTYL-CAPLGE-NPSCIQIC-RKHGVKYGICYAFQ----CWCEYLED-KNVKI	peptide AaF1CA22
Q4LCT06652	ADVPNGNYPLDSSDDTYL-CAPLGE-NPFCIKIC-RKHGVKYGICYAFQ----CWCEYLED-KNVKI	peptide AaF1CA8
Q4LCT26689	ADVPNGNYPLDSSDDTYL-CAPLGE-NPFCIKIC-RKHGVKYGILMLRLP----CWCEYFGKIKNVKI	peptide AaF1CA5
Q4LCT36965	ADVPNGNYPLRPFYRYG-CAVPGD-SDYCVRVK-RKHGVRYGYCWFFFT----CWCEYLED-KNIKI	peptide AaF1CA1
Q4LCS87019	ADVPNGNYPLDRSGKYP-CTITWKKNPS-CQIC-KKHGVKYGICYDFQ----CWCEIFGLRKTFTKI	peptide AaF1CA25

Fig. 1. Comparaison des séquences d'acides aminés des protéines d'*Androctonus australis* caractérisées à ce jour. Prot. : uniprotKB/swissprot entry number ; masse (Da) = masses avec cystéines oxydées. Les cystéines appariées en pont disulfure ont le même code couleur.

Fig. 1. Comparison of the amino acid sequences from the *Androctonus australis* proteins characterized so far.

Parmi les peptides dont les activités sont peu ou pas du tout caractérisées, se trouve le groupe des peptides «Birtoxine-like» (peptides AaF1CA1, CA5, CA7, CA8, CA22, CA25 et CA26), peptides d'une soixantaine d'acides aminés réticulés par seulement trois ponts disulfure (Martin-Eauclaire *et al.*, 2005 ; Calistan *et al.*, 2006).

Ces peptides semblent exister en grande quantité dans les venins d'*Androctonus* sans qu'un rôle précis leur ait été pour l'heure attribué. Leur létalité pour les Mammifères est contestable, mais plusieurs groupes internationaux s'accordent à leur trouver une action de

type bêta sur les insectes. Le blocage de certains K_v (K_v1.3 en particulier) par l'un de ces peptides (AaF1CA22, identifié par ailleurs KAaH2) a été décrit (Srairi-Abid *et al.*, 2005).

Les peptides du venin d'*Androctonus mauretanicus mauretanicus*

La Figure 2 récapitule nos connaissances sur les molécules purifiées du venin d'*A. mauretanicus mauretanicus*. Nous avons tout récemment montré, par une étude exhaustive de spectrométrie de masse MALDI/TOF «off-line», que le venin obtenu par stimulation manuelle du post-opisthosome contenait

seulement 74 constituants dans ses fractions solubles toxiques (Oukkache *et al.*, 2008). A ce jour, huit molécules ont été séquencées et biologiquement bien caractérisées. Parmi elles, trois toxines alpha, dont la très puissante Amm V, responsable de 48% de la létalité du venin. Les toxines «courtes» de ce venin ont été parmi les premières à être identifiées comme des bloqueurs de divers types de canaux K⁺ : AmmP01 et AmmP05 bloquent le type SKCa, la Kaliotoxine bloque les types K_v1.1 et K_v1.3 et Ammtx3 bloque les types K_v4.1 et Herg. Enfin, le peptide non-toxique P2, qui comporte quatre ponts disulfure pour 35 résidus d'acides aminés, serait une «chlorotoxine». Cependant, nous n'avons pas mis en évidence ce type d'activité pour P2 jusqu'à aujourd'hui. En outre, P2, initialement purifié à partir d'un venin obtenu par excitation électrique des animaux, n'a jamais été retrouvé dans aucun des venins obtenus par

extraction «manuelle». Se pose donc la question de sa présence physiologique dans le venin brut.

Parmi les 74 masses identifiées, des modifications post-traductionnelles ont été mises en évidence pour trois molécules : l'amidation du C-terminal de AmmP05, la transformation de la glutamine N-terminale de Ammtx3 en acide pyroglutamique, la mono- ou disulfonation des méthionines de la KTX.

Activités pharmacologiques des toxines des venins d'*Androctonus australis* et *mauretanicus*

Dans le *Tableau 1* sont récapitulées les différentes activités pharmacologiques caractérisées à ce jour dans les venins d'*A. australis* et d'*A. mauretanicus*. Certaines activités sont proposées en vertu des homologies de structure.

ANDROCTONUS MAURETANICUS MAURETANICUS			
Prot.masse			
P246624150	GVEINVKCSGSPQCLKPKCKDA-GMRFGKCMNRKCHCTPK	Kchannel toxin α-KTx 3.1	Kaliotoxin(KTX)
P602083839	QIETNKKCQGS-CASVCRKVGVAAGKCINGRCVCYP	Kchannel toxin α-KTx 15.3	(Ammtx3)
P317193415	TVCNLR-CQLSCRS-L-GL-LGKCIGVKCECVKH	Kchannel toxin α-KTx 5.2	(AmmP05)
P562153178	VSCED---CPEHCSTQ-KA-QAKCDNDKCVCEPI	Kchannel toxin α-KTx 8.1	(AmmP01)
P014983665	CGPCTTDPYTESKCATCCGGRGKCVGPQCLCNRI		P2(chlorotoxine)
P014827293	LKDGYYIDDLNCTFFCGRNAYCDECKKKGGESGYCQWASPYGNACWCYKLPDRVSIKEK-GRCN		Amm V
Q7YXD37375	LKDGYYVNDINCTYFCGRNAYCNELCIKLKGGESGYCQWASPYGNSCYCYKLPDHVRTKGP-GRCND		Amm VIII
Q2YHM17308	GVRDAYIADNKNCFITCYRDSYCKTECIKNGAETGYCIWIGEYGNACWCYKLPNKVPIKVP-GKCN		Amm VIIIrpg1
Q2YHM17280	GVRDAYIADNKNCFITCYKDSYCKTECIKNGAETGYCIWIGEYGNACWCYKLPNKVPIKVP-GKCN		Amm VIIIrpg2
Q2YHM17265	GVRDAYIADNKNCFITCYKDSYCKTECIKNGAETGYCWWIGKYGNACWCYKLPNKVPIKVP-GKCN		Amm VIIIrpg3
AMMIII7001	GRDGYIVDTKNCVYHCYYP--CDGLCKKNQAKSGSGFLYPSGLACWCVALPENVPICKDPNDCHK		Amm III

Fig. 2. Comparaison des séquences d'acides aminés des protéines d'*Androctonus mauretanicus* caractérisées à ce jour. KTX, Ammtx3, AmmP05, AmmP01 sont des bloqueurs de canaux K⁺ (respectivement K_v1.1 et K_v1.3, K_v4.1 et Herg, SKCa2 et 3) ; P2 est un peptide dépourvu d'activité, mais classé plus tard par d'autres comme "chlorotoxine" ; Amm V, Amm III et Amm VIII modulent les canaux Na⁺ en se fixant sur le site 3 ; Amm VIII related gene products 1, 2 et 3 sont déduits de séquences d'oligonucléotides.

Fig. 2. Comparison of the amino acid sequences from the *Androctonus mauretanicus* proteins characterized so far.

Les peptides d'autres espèces d'*Androctonus*

Peu d'informations concernant les venins des autres espèces d'*Androctonus*, comme *A. aeneas*, *A. amoreuxi*, *A. crassicauda*, sont disponibles dans la littérature. Ces venins ont été peu ou pas du tout étudiés à ce jour. Pourquoi? Plusieurs raisons peuvent être avancées. Tout d'abord, leur activité létale pour les Mammifères est largement inférieure à celle des espèces *A. australis* et *A. mauretanicus*. Leur habitat est aussi plus dispersé et les accidents mortels pour l'Homme sont plus rares. Enfin, les pays où sévissent ces espèces n'ont pas réalisé d'études systématiques sur ces venins comme l'ont effectué les trois Instituts Pasteur du Maghreb sur les venins des *A. australis* et *A. mauretanicus*. Cependant, ces autres espèces d'*Androctonus* présentent des risques non négligeables pour les populations locales. Est présentée en *Figure 3* une mappemonde sur laquelle figurent en vert les zones où sévit *Androctonus*. Le *Tableau 2* liste l'ensemble des espèces du genre *Androctonus* répertoriées en taxonomie.

Récemment, une étude protéomique par MALDI-TOF d'un venin «manuel» d'*A. crassicauda* a montré que ce venin contenait seulement 70 masses (dont une famille de molécules entre 3 et 4 kDa, une autre entre 6 et 8 kDa, et enfin quelques masses entre 12 et 16 kDa). Ces résultats sont en accord avec notre étude récente

effectuée sur le venin d'*A. mauretanicus* (Oukkache *et al.*, 2008). Diverses protéines de type «Birtoxin-like» ont été mises en évidence par dégradation d'Edman ou clonage d'ADNc (Calistan *et al.*, 2006). Nous avons décidé d'aborder une première caractérisation des toxines du venin d'*A. amoreuxi*, avec comme objectif la comparaison de leurs propriétés immunologiques avec celles des toxines extrêmement létales déjà identifiées, non seulement dans les venins d'*Androctonus*, mais aussi dans d'autres espèces de scorpions responsables de problèmes de santé publique dans l'Ancien Monde, à savoir *Leiurus quinquestriatus* et *Buthus occitanus*. Les toxines «alpha» et «alpha-like» de ces venins se classent essentiellement en quatre groupes structuraux et immunologiques : le groupe de AaH I (AaH I, AaH III, AaH IV et Amm III), le groupe de AaH II (AaH II, Amm V et VIII, Bot III et IX, Lqq V), le groupe de Bot I (Bot I et II et la majorité des toxines «alpha-like» purifiées des venins de *Buthus*) et enfin le groupe de la Lqq IV, dont peu de membres sont répertoriés à ce jour.

Notre étude du venin d'*A. amoreuxi* montre que ce venin contient des molécules reconnues en ELISA par des anticorps spécifiques des quatre groupes structuraux et immunologiques dans lesquels se classent les toxines des scorpions de l'Ancien Monde. Cependant, les mêmes molécules sont incapables de réagir avec les anticorps lorsqu'elles sont testées en phase liquide par RIA.

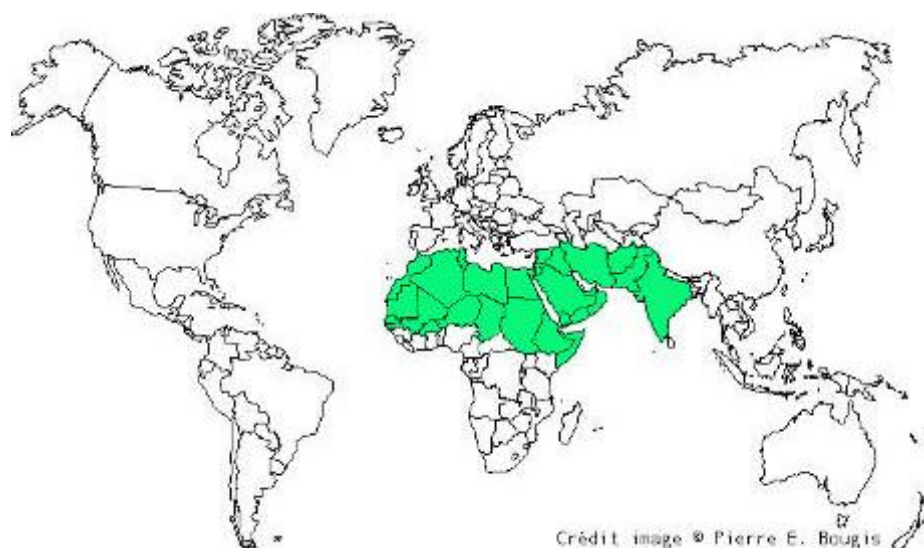
Sachant que les épitopes des toxines de scorpion sont avant tout conformationnels, ces résultats s'expliquent facilement à la vue des séquences peptidiques des trois toxines étudiées (Chen *et al.*, 2003). De plus, la neutralisation de l'activité toxique du venin d'*A. amoreuxi* par des sérums spécifiques préparés contre les fractions

toxiques totales de venins de Buthidae d'Afrique du Nord a été testée *in vivo* chez la souris. Contrairement à toute attente, le pouvoir neutralisant du sérum fabriqué contre le venin de *Buthus occitanus tunetanus* s'avère au moins dix fois supérieur à celui des sérums fabriqués contre les venins d'*A. australis*.

Tableau 1. Activités biologiques des toxines d'*Androctonus australis* et d'*A. mauretanicus* caractérisées dans les Figures 1 et 2.

Table 1. Biological activities of *Androctonus australis* and *A. mauretanicus* toxins characterized in Figures 1 and 2.

Cible / mode d'action	Toxines
Canaux Sodium	
Toxines alpha se fixant sur le site 3 des canaux sodium activés par le voltage ; inhibent l'inactivation du canal ; spécificité envers les mammifères	Aah I, Aah II, Aah III, Aah IV, Amm V, Amm VIII ; Aah P985, Aah P1005, Amm III, Amm VIIIrgp1,2,3 (par homologie)
Toxine bêta anti-insectes se liant indépendamment du voltage au site 4 des canaux sodium ; affecte l'activation du canal	Aah VI
Toxines bêta anti-insectes excitatrices se liant indépendamment du voltage au site 4 des canaux sodium ; affectent l'activation du canal	Aah IT1, Aah IT2, Aah IT5
Toxine active sur les insectes et les mammifères, probablement de type bêta	Aah IT4
Toxine bêta anti-insectes, modifie le voltage d'activation des canaux sodium (type para/tipE)	Aah peptide AaF1CA25
Canaux Potassium	
Toxines bloquant les canaux potassium voltage dépendant de type Kv1.1 et Kv1.3	Aah Kaliotoxine, Amm Kaliotoxine, Aah peptide AaF1CA8, Aah peptide AaF1CA22
Toxines bloquant des canaux potassium voltage dépendant de type Kv1.4 et Herg	Ammtx3, Aah alpha-KTx15.x1, Aah alpha-KTx15.x2, Aah Aa
Toxines bloquant des canaux potassium activés par le calcium (SK-Ca2 et SK-Ca3) (canaux potassium sensibles à l'apamine)	AmmP01, AmmP05
Toxines bloquant des canaux potassium voltage dépendant (type rectification retardée)	Aah AaTX K-bêta (par homologie)
Canaux Chlorure	
Blocage des canaux chlorure de faible conductance	Amm P2 (par homologie)
Membrane des cellules bactériennes	
Toxine active sur les bactéries GRAM positif	Aah Defensine
Toxine active sur les bactéries GRAM positif et GRAM négatif	Aah Buthinine
Toxine active sur les bactéries GRAM positif, GRAM négatif et les champignons filamenteux	Aah Androctonine
Cible non identifiée	Aah peptides AaF1CA1, AaF1CA5, AaF1CA7, AaF1CA26, Aah Ntx P993, Aah Ntx P996, Aah Ntx P1008 ; Aah anatstr1 (non toxique)



Crédit image © Pierre E. Bougis

Fig. 3. Localisation des espèces d'*Androctonus*.

Fig.3. Localisation of *Androctonus* species.

Tableau 2. Différentes espèces d'*Androctonus* identifiées. En rouge : scorpions avec toxines décrites dans la banque de données Uniprot.

Table 2. Different *Androctonus* species identified. In red : scorpions with toxins described in Uniprot database.

Espèces	Références*
<i>Androctonus afghanus</i>	Lourenço & Qi, 2006
<i>Androctonus alexandrplotkini</i>	Lourenço & Qi, 2007
<i>Androctonus amoreuxi</i>	Audouin, 1826
<i>Androctonus australis</i>	Linnaeus, 1758
Sous espèce <i>A. australis hector</i> (Aah)	C.L.Koch, 1839
Sous espèce <i>A. australis garzonii</i> (Aag)	Goyffon & Lamy, 1973
<i>Androctonus baluchicus</i>	Pocock, 1900
<i>Androctonus bicolor</i>	Ehrenberg, 1828
<i>Androctonus crassicauda</i>	Olivier, 1807
<i>Androctonus dekeyseri</i>	Lourenço, 2005
<i>Androctonus finitimus</i>	Pocock, 1897
<i>Androctonus gonneti</i>	Vachon, 1948
<i>Androctonus hoggarensis</i>	Pallary, 1929
<i>Androctonus liouvillei</i>	Pallary, 1924
<i>Androctonus maelfaiti</i>	Lourenço, 2005
<i>Androctonus mauretanicus</i>	Pocock, 1902
Sous espèce <i>A. mauretanicus mauretanicus</i> (Amm)	Pocock, 1902
<i>Androctonus sergenti</i>	Vachon, 1948

* : World bibliography of scorpions. Dupré Gérard décembre 2004 (site internet the scorpion fauna)

Ce résultat à priori inattendu est cependant en total accord avec les structures primaires des premières toxines isolées du venin d'*A. amoreuxi*. Cette étude constitue une première avancée dans la définition immunologique des toxines contenues dans les venins des sous-espèces d'*Androctonus*. Nous avons continué notre étude par la caractérisation de molécules *a priori* non toxiques, mais choisies en fonction de leur masse. Nous avons identifié plusieurs toxines de type bêta dotées d'activité anti-insectes et des toxines courtes bloquant certains canaux K⁺. Ces molécules sont en cours d'étude.

Conclusion

Les venins des scorpions du genre *Androctonus* étudiés à ce jour montrent une composition relativement homogène, et ce en dépit de leurs différences de toxicité. La quasi-totalité de la létalité du venin pour les Mammifères est portée par des toxines de type alpha d'une soixantaine de résidus, présentant des séquences en acides aminés apparentées mais variables suivant les sous-espèces. Ces séquences peuvent se classer en différents groupes structuraux corrélés à un groupe immunologique plus ou moins spécifique. Cependant, d'autres molécules présentant diverses activités pharmacologiques sont à présent parfaitement caractérisées dans ces venins, tout comme dans d'autres venins de Buthidés tels que ceux de *Leiurus* ou de *Buthus*. Sont également bien connues des molécules bloquant les canaux K⁺ ; par exemple, des molécules d'une masse entre 3,0 et 3,5 kDa bloquent les canaux K⁺ de type SKCa2/3. Des molécules d'environ 3,8 kDa bloquent les canaux K⁺ de type K_v4.x ou Herg. D'autres autour de 4,0 à 4,5 kDa bloquent les canaux K⁺ de type shaker (K_v1.1, K_v1.2, K_v1.3), BKCa ou Herg. Des toxines plus longues

d'environ 7,0 kDa sont capables de bloquer des canaux K⁺ de la rectification retardée et d'être aussi des antimicrobiens.

Enfin, outre les toxines anti-insectes purifiées de longue date dans ces venins, des molécules «hybrides» présentant à la fois une activité pharmacologique de type bêta et une activité anti-insecte ont été identifiées. Dans les venins d'*A. australis* et d'*A. mauretanicus*, ces molécules ne présentent pas d'activité toxique majeure pour les Mammifères et leur rôle reste encore à clarifier.

Références bibliographiques

- Caliskan F., García B.I., Coronas F.I., Batista C.V., Zamudio F.Z., Possani L.D. (2006) Characterization of venom components from the scorpion *Androctonus crassicauda* of Turkey : peptides and genes. *Toxicon* 48:12-22.
- Chen T., Folan R., Kwok H., O'Kane E.J., Bjourson A.J., Shaw C. (2003) Isolation of scorpion (*Androctonus amoreuxi*) putative alpha neurotoxins and parallel cloning of their respective cDNAs from a single sample of venom. *Regul. Pept.* 115:115-21.
- Ehrenberg C.G. (1828) Vorläufige Übersicht der in Nord-Afrika und West-Asien einheimischen Scorpione und deren geographischen Verbreitung, nach den eigenen Beobachtungen von Dr. Hemprich und Dr. Ehrenberg. *Verh. Ges. naturf. Freunde Berlin*, 1:348-62.
- Martin-Eauclaire M.F., Ceard B., Bosmans F., Rosso J.P., Tytgat J., Bougis P.E. (2005) New "Birtoxin analogs" from *Androctonus australis* venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333:524-30.
- Oukkache N., Rosso J.P., Alami M., Ghalim N., Saïle R., Hassar M., Bougis P.E., Martin-Eauclaire M.F. (2008) New analysis of the toxic compounds from the *Androctonus mauretanicus* scorpion venom. *Toxicon* 51:835-52.
- Srairi-Abid N., Guijarro J.I., Benkhalifa R., Mantegazza M., Cheikh A., Ben Aissa M., Haumont P.Y., Delepierre M., El Ayeb M. (2005) A new type of scorpion Na⁺ channel-toxin-like polypeptide active on K⁺ channels. *Biochem. J.* 388:455-64.

Incidence de la fraction toxique du venin d'*Androctonus australis hector* dans la leucocytose pulmonaire

Sassia SAMI-MERAH^{1,2}, Djelila HAMMOUDI-TRIKI^{1,2}, Djamila AROUNE¹, Marie-France MARTIN-EAUCLAIRE³, Fatima LARABA-DJEBARI^{1,2*}

¹ Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences Biologiques, USTHB, El-Alia Bab Ezzouar, Alger, Algérie ; ² Laboratoire de Recherche et Développement sur les Venins, Institut Pasteur d'Algérie, Alger, Algérie ; ³ Equipe ToxCiM, Dépt. Signalisation Neuronale, Centre de Recherche en Neurobiologie-Neurophysiologie de Marseille, IFR Jean-Roche, Faculté de Médecine Secteur Nord, Marseille, France.

* Auteur correspondant ; Tél : 00 213 21 91 74 27 ; Fax : 00 213 21 91 72 21 ; Courriel : flaraba@hotmail.com

Résumé

L'observation des sections semi-fines des poumons et l'analyse des liquides de lavages pleuraux des rats envenimés par le venin du scorpion Androctonus australis hector ou sa fraction toxique FtoxG-50 montrent une activation massive des cellules inflammatoires et un recrutement rapide des leucocytes dans la cavité pleurale, avec une prédominance des lymphocytes suivie par une accumulation des monocytes et des polynucléaires. L'accumulation des leucocytes dans les sites inflammatoires est associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire.

Involvement of the toxic fraction from *Androctonus australis hector* venom in pulmonary leukocytosis

Analysis of lung sections and pleural cavity washing solutions from rats envenomed with the venom of the scorpion, Androctonus australis hector, or its toxic fraction, FtoxG-50, revealed intense inflammatory infiltrates and a massive recruitment of leukocytes. The rapid recruitment of leukocytes in the pleural cavity is characterized by an acute, predominant infiltration of lymphocytes followed by an accumulation of monocytes and polynuclear cells. Leukocyte accumulation is associated with a vascular permeability increase in the lung.

Keywords: *Androctonus australis, leukocyte, lung, pleural cavity, venom.*

Introduction

L'œdème pulmonaire représente la cause principale de décès dans le cas des envenimations scorpioniques graves (Ismail *et al.*, 1995). Il est attribué à une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire consécutive à une libération accrue des médiateurs de l'inflammation (Amaral *et al.*, 1994). Nous avons déjà observé une inflammation caractérisée par une infiltration des leucocytes au niveau de la cavité péritonéale et du myocarde après injection du venin d'*Androctonus australis hector* (Aah) ou de sa toxine Aah II (Sami-Merah *et al.*, 2007). Des résultats similaires ont été obtenus après envenimation avec le venin de *Tityus serrulatus* ou sa fraction TsTX-I (Pessini *et al.*, 2003 ; D'Suze *et al.*, 2004).

L'objectif de cette étude était d'une part de montrer, sur des coupes semi-fines de poumon, l'implication du venin d'Aah et de sa fraction toxique FtoxG-50 (constituée de toutes les toxines du venin) dans le recrutement des leucocytes conduisant à l'apparition de l'œdème pulmonaire, et d'autre part d'identifier les populations cellulaires séquestrées au niveau des cavités pleurales après 3 h et 24 h d'envenimation.

Effet du venin d'Aah et de sa fraction toxique sur le parenchyme pulmonaire

Les rats ont reçu une injection de venin (0,5 mg/kg) ou

de la fraction toxique FtoxG-50 (0,4 mg/kg) par voie intra-péritonéale. Après 24 h, les poumons sont fixés par une perfusion au glutaraldéhyde (0,25 g/L, 1 h). Après dissection des animaux, des fragments de poumons sont post-fixés au tétraoxyde d'osmium (0,4 g/L) pendant 1 h puis inclus dans une résine époxy. Des coupes de 0,5 µm sont effectuées à l'ultra-microtome et colorées au bleu de toluidine (Figure 1).

L'examen des coupes montre une désorganisation totale du parenchyme pulmonaire. En effet, le venin d'Aah et la fraction FtoxG-50 provoquent des œdèmes inflammatoires caractérisés par une séquestration des leucocytes dans le parenchyme pulmonaire. Ces œdèmes inflammatoires sont observés au niveau des espaces intra et inter alvéolaires et sont associés à une augmentation de la perméabilité vasculaire.

Populations cellulaires recrutées dans l'inflammation pleurale

Les observations sont réalisées 3 h et 24 h après l'injection. La cavité pleurale des rats a été rincée avec une solution physiologique. Le dénombrement cellulaire, réalisé à l'aide d'un hématocytomètre (ADVIA, Hematology system), a permis d'identifier et de dénombrer les cellules prélevées : polynucléaires neutrophiles, monocytes et lymphocytes caractéristiques de la leucocytose pleurale. Le nombre de cellules est rapporté au microlitre de liquide de rinçage.

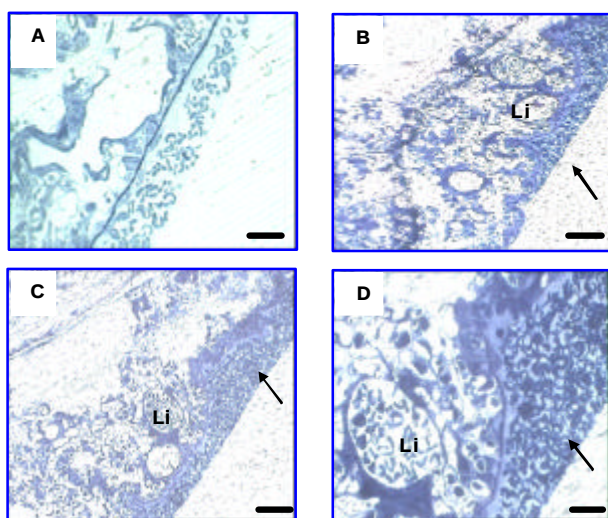


Fig 1. Effets du venin d'Aah et de la fraction FtoxG-50 sur le poumon de rats après 24 h. (A) Témoins non traités, (B) venin (0,5 mg/kg), (C, D) fraction FtoxG-5 (0,4 mg/kg). Li : infiltration leucocytaire, la flèche indique l'influx des leucocytes. Les barres représentent 125 µm pour A, B, C (Obj. x40) et 50 µm pour D (Obj. x100).

Fig. 1. Effects of Aah venom and fraction FtoxG50 on rat lung 24 h after envenomation. (A) Control, (B) venom (0,5 mg/kg), (C, D) FtoxG50 (0,4 mg/kg). Li : Leukocyte infiltration, the arrow indicates the leukocyte influx. Bars in A, B and C : 125 mm (Obj. x40) ; in D : 50 mm (Obj. x100).

L'analyse des liquides de lavage des cavités pleurales des rats envenimés révèle que le venin d'Aah et sa fraction FtoxG-50 induisent une importante leucocytose. Le recrutement rapide des leucocytes dans la cavité pleurale 3 h post-injection est caractérisé par une prédominance des lymphocytes, suivie à 24 h par une accumulation des monocytes et des polynucléaires. Le nombre total de monocytes recueillis dans la cavité pleurale est environ 4,5 fois plus élevé que chez les rats témoins. Cette leucocytose est plus importante chez les rats envenimés avec la fraction FtoxG-50 (Figure 2).

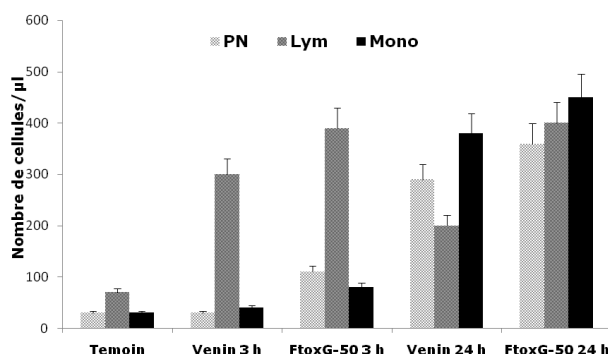


Fig. 2. Dénombrement des leucocytes dans la cavité pleurale 3 h et 24 h après envenimation de rats avec le venin d'Aah (0,5 mg/kg) ou sa fraction FtoxG-50 (0,4 mg/kg) : PN : polynucléaires neutrophiles ; Lym : lymphocytes ; Mon : monocytes.

Fig. 2. Recruitment of inflammatory cells in the pleural cavity 3 h and 24 h after envenomation with Aah venom (0.5 mg/kg) or fraction FtoxG-50 (0.4 mg/kg) : PN : neutrophils ; Lym : lymphocytes ; Mon : monocytes.

Discussion

Les venins de scorpion provoquent une infiltration leucocytaire au niveau des tissus altérés et dans la cavité péritonéale. Il a été déjà montré que le venin d'Aah et sa toxine Aah II purifiée provoquent une infiltration importante des leucocytes (polynucléaires neutrophiles, monocytes et lymphocytes) dans la cavité péritonéale. Cette leucocytose était plus importante avec la toxine Aah II purifiée qu'avec le venin (Sami-Merah *et al.*, 2007). Ces résultats montrent que le venin d'Aah et sa fraction toxique induisent aussi une leucocytose pulmonaire. Des résultats similaires ont été obtenus par D'Suze et collaborateurs (1999) qui, lors d'une envenimation avec le venin de *Tityus discrepans*, ont observé une dilatation des parois alvéolaires et des œdèmes avec une infiltration leucocytaire au niveau des poumons. Les mêmes lésions ont été rapportées par Matos et collaborateurs (1999) après envenimation des rats avec le venin de *Tityus serrulatus* ou sa fraction toxique majoritaire. Selon ces auteurs, ces altérations tissulaires seraient principalement dues aux toxines présentes dans le venin de *T. serrulatus*.

Ces études montrent clairement que les toxines de ces venins, bien qu'appartenant à des genres différents, sont responsables des mêmes effets inflammatoires.

Conclusion

Le venin d'Aah et sa fraction toxique FtoxG-50 induisent une réponse inflammatoire considérable. Ce processus se traduit par une accumulation des leucocytes dans le parenchyme pulmonaire et dans la cavité pleurale. Ces résultats suggèrent un rôle principal de FtoxG-50 dans l'induction de la leucocytose pulmonaire ainsi que dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'installation de l'œdème pulmonaire.

Références bibliographiques

- Amaral C.S.F., Barbosa A.J.A., Leite V.H.R., Tafuri W.L., Resende A.A. (1994) Scorpion sting-induced pulmonary oedema, evidence of alveolar capillary membrane permeability. *Toxicon* 32:999-1003.
- Matos I.M., Souza D.G., Seabra D.G., Freire-Maia L., Teixeira M.M. (1999) Effects of tachykinin NK (1) or PAF receptor blockade on the lung injury induced by scorpion venom in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 376:296-300.
- D'Suze G., Comellas A., Pesce L., Sevcik C., Sanchez de Leon R. (1999) *Tityus discrepans* venom produces a respiratory distress syndrome in rabbits through an indirect mechanism. *Toxicon* 37:173-80.
- D'Suze G., Salazar V., Diaz P., Sevcik C., Azpurua H., Bracho N. (2004) Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rats. *Toxicon* 44:851-60.
- Ismail M. (1995) The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon* 33:825-58.
- Pessini A.C., Souza A.M., Faccioli L.H., Gregorio Z.M., Arantes E.C. (2003) Time course of acute-phase response induced by *Tityus serrulatus* venom and TsTX-I in mice. *Int. Immunopharmacol.* 3:765-74.
- Sami-Merah S., Hammoudi-Triki D., Martin-Eauclaire M.F., Laraba-Djebbari F. (2007) La toxine Aah II d'*Androctonus australis hector*: effets inflammatoires et histopathologiques. In: Goudey-Perrière F., Benoit E., Marchot P., Popoff M.R. (Eds.), *Toxines émergentes: nouveaux risques*. Coll. Rencontres en Toxinologie, Lavoisier, pp. 203-4.

Immunoglobulines F(ab')₂ produites contre la fraction toxique du venin du scorpion marocain (*Androctonus mauretanicus mauretanicus*)

Naoual OUKKACHE¹, Abdelaziz KAROUMI¹, Mohamed HASSAR¹, Fatima CHGOURY¹, Lotfi BOUSSADDA¹, Rachid SAILE², Marie-France MARTIN-EAUCCLAIRE³, Noredine GHALIM^{1*}

¹ Laboratoire des Venins et Toxines, Institut Pasteur du Maroc, 1 place Louis Pasteur, 20100-Casablanca, Maroc ;

² Faculté des Sciences Ben M'sik, Université Hassan II, Casablanca, Maroc ; ³ CRN2M, CNRS UMR 6231, Université de la Méditerranée et Université Paul Cézanne, IFR Jean Roche, Faculté de médecine-Nord, Université de la Méditerranée, Marseille, France.

* Auteur correspondant ; Tél : 212 22 43 44 60 ; Fax : 212 22 26 09 57 ; Courriel : noredine.ghalim@pasteur.ma

Résumé

Les envenimations par piqûre de scorpion constituent un problème majeur de santé publique au Maroc. Le traitement spécifique de ces envenimations est l'immunothérapie utilisant des anticorps spécifiques. Nous avons fractionné du venin d'*Androctonus mauretanicus mauretanicus* (A.m.m.) par gel filtration. Deux fractions ont été obtenues, G₁ et G₂. La fraction G₂ est constituée de protéines de faible poids moléculaire (< 14 kDa) ; elle représente 24% des protéines du venin et 100% de son pouvoir toxique. Elle a été utilisée dans le programme d'immunisation, et les fragments F(ab')₂ ont été purifiés, ce qui a permis d'augmenter les titres du sérum, sa spécificité et ainsi d'améliorer la sérothérapie. Par ailleurs, nous avons confirmé, par des tests de neutralisation *in vivo*, que le sérum anti-venin A.m.m. protège contre le venin de *Buthus occitanus*, un autre scorpion d'importance médicale trouvé au Maroc.

Immunoglobulins F(ab')₂ produced against the toxic fraction of the moroccan scorpion venom (*Androctonus mauretanicus mauretanicus*)

Scorpion envenomations are a serious problem of public health in Morocco. Their unique specific treatment is anti-venom immunotherapy, which consists in the administration of specific antitoxin antibodies to the patients. Gel filtration chromatography of *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (A.m.m.) venom allows the characterization of two fractions G₁ and G₂. The G₂ fraction consists of low molecular weight proteins (< 14 kDa) ; it accounts for 100% of its toxic potency, but represents only 24% of venom proteins. This fraction was used for horse immunization instead of crude venom, which resulted in an increase of the anti-venom specificity and potency. It was also confirmed, by *in vivo* neutralization tests in mice, that this anti-venom possesses a significant protective action against *Buthus occitanus* venom, another scorpion of medical importance found in Morocco.

Keywords : Moroccan scorpion, venom, anti-venom.

Introduction

Les envenimations scorpioniques constituent par leur fréquence et leur gravité un problème majeur de santé publique au Maroc (Ghalim *et al.*, 2000 ; Toulon *et al.*, 2001). Elles représentent 30 à 50% de l'ensemble des cas déclarés au Centre Anti-poison du Maroc (Soulaymani *et al.*, 2003). Une étude rétrospective réalisée dans ce pays a montré que les piqûres de scorpion sont dues dans 68% des cas au scorpion noir *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (A.m.m.) et que la plupart des décès surviennent chez les enfants de moins de 15 ans (Ghalim *et al.*, 2000). Cette morbidité est la première motivation qui justifie l'étude des éléments responsables de la toxicité de ce venin. La petite quantité de venin inoculée par le scorpion peut provoquer de nombreux symptômes : sudation, hypertension, tachycardie, diarrhées et, dans des cas extrêmes, un arrêt cardiaque (Bawaskar *et al.*, 1994 ; Ismail *et al.*, 1995). Ces effets sont dus à l'action combinée des différents constituants du venin, et principalement à celle des neurotoxines qui perturbent

la conduction de l'influx nerveux (Delori *et al.*, 1981 ; Amaral *et al.*, 1993 ; Gueron *et al.*, 1993).

Un certain nombre de drogues peuvent être utilisées pour corriger les manifestations secondaires attribuées à la libération massive de neurotransmetteurs qui apparaissent plus tardivement au cours de l'envenimation (Gueron *et al.*, 1993). Cependant, la sérothérapie est le seul traitement étiologique des envenimations scorpioniques (Dehesa-Davila *et al.*, 1994 ; De Rezende *et al.*, 1995 ; Krifi *et al.*, 2001). Elle repose sur l'administration d'anticorps spécifiques IgG, Fab ou F(ab')₂ à des doses suffisamment élevées pour neutraliser *in vivo* la totalité des toxines injectées par le scorpion (De Rezende *et al.*, 1996 ; Revelo *et al.*, 1996 ; Krifi *et al.*, 2001). Au Maroc, après un usage inconditionnel de l'immunothérapie antivenimeuse au cours des trente dernières années, celle-ci s'est heurtée à des controverses liées au manque d'études contrôlées définissant clairement sur quels critères cliniques elle devait être pratiquée et à quelle dose.

Dans ce travail, nous montrons que l'action létale du venin d'A.m.m. est due principalement à des toxines de faible poids moléculaire (< 14 kDa), isolées par filtration sur gel Sephadex G₅₀. Nous avons ensuite utilisé cette fraction toxique du venin pour immuniser des mulets et préparer des immunoglobulines spécifiques. Leur pouvoir neutralisant, déterminé *in vivo* chez la souris, est élevé ; il est efficace, non seulement contre le venin d'A.m.m., mais aussi contre celui de *Buthus occitanus* (B.o.), le second scorpion responsable d'envenimations graves au Maroc.

Matériel et méthodes

Venin

Le venin est obtenu par stimulation manuelle du métasome des scorpions gardés en captivité au « scorpionarium » de Tit Mellil de l'unité animalière de l'Institut Pasteur du Maroc. Le venin collecté à partir d'un grand nombre de scorpions est centrifugé à 13.000 g pendant 20 min pour éliminer les débris cellulaires. Les protéines du surnageant sont dosées par la méthode de Lowry.

Toxicité du venin

Les expérimentations sur animaux sont conformes au *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published (NIH, 1996). L'activité biologique du venin est suivie par la mesure de sa toxicité, estimée par la dose qui tue 50% (DL₅₀) d'une population homogène de souris C57/BL6 mâles de 18 à 20 g (6 souris sont utilisées pour chaque dose). Les lots de souris reçoivent par voie intraveineuse (i.v.) des solutions croissantes du venin encadrant au mieux la DL₅₀ présumée. Trois séries de tests sont effectuées. La mortalité est enregistrée après 48 heures d'observation et la DL₅₀ est calculée selon la formule de Spearman-Kärber :

$$\text{Log DL}_{50} = - (x_0 - d/2 + d \sum r/n)$$

où x_0 est le Log de l'inverse de la plus faible dose ayant provoqué la mort de tous les animaux, d est le Log du facteur de progression entre deux doses, r est le nombre de morts par dose et n est le nombre d'animaux par dose.

Obtention des fractions purifiées

Le venin est soumis à un fractionnement par chromatographie sur gel filtration en utilisant comme phase stationnaire du Sephadex G₅₀ et comme phase mobile du tampon acétate d'ammonium 0,1 M à pH 8. La densité optique des fractions éluées est déterminée par spectrophotométrie d'absorption à 280 nm. La pureté des fractions obtenues est contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15%) dans des conditions dénaturantes en présence de SDS.

Evaluation de la toxicité des fractions purifiées

Les fractions sont injectées par voie intrapéritonéale (i.p.) à des souris (lots de 8 souris C57/BL6 de 18 à 20 g). Leur toxicité est évaluée après 48 heures.

Immunisation des mulets par la fraction toxique G₂

L'anti-venin anti-A.m.m. a été produit chez des mulets en injectant des doses croissantes de la fraction G₂ par voie sous-cutanée, sur des sites multiples près du système lymphatique de l'animal. L'adjuvant complet de Freund n'a été employé que pour l'immunisation primaire et nous avons utilisé l'adjuvant incomplet pour l'immunisation

secondaire. Les injections de rappel ont été effectuées en solution physiologique (NaCl 0,85%). L'hyperimmunisation a été faite à des intervalles de deux semaines. La production des anticorps a été suivie par la méthode ELISA jusqu'à ce que le titre des anticorps atteigne un niveau élevé.

Des saignées de collecte sont alors effectuées : le sang est récupéré sur un anticoagulant et les anticorps sont purifiés à partir du plasma par une première précipitation au sulfate d'ammonium à 29%. Une deuxième étape de purification comprend une précipitation par le sulfate d'ammonium à 11,3%, couplée à une thermocoagulation et un traitement enzymatique par la pepsine pour obtenir des F(ab')₂ ; le fragment Fc et les produits de dégradation sont éliminés par une troisième précipitation au sulfate d'ammonium à 17,6%. La désalinisation et la concentration de 10% de volume initial de plasma ont été faites par la filtration tangentielle avec des membranes de 30 kDa pour la désalinisation et 10 kDa pour la concentration.

Détermination du pouvoir protecteur et de l'activité de l'anti-venin anti-A.m.m.

Deux paramètres de l'anti-venin ont été déterminés : son pouvoir protecteur et son titre (*i.e.* son activité de neutralisation du venin).

Le pouvoir protecteur de l'anti-venin est estimé par sa dose protectrice (DP₅₀) chez la souris. Il s'agit du volume de sérum protégeant 50% des souris d'un lot homogène d'animaux. Des doses croissantes de sérum sont mélangées avec une dose fixe de venin, appelée dose d'épreuve (DE). Nous avons fixé la dose d'épreuve à 5 DL₅₀. Le mélange est incubé pendant 30 min à 37°C, avant d'être injecté à 7 lots de 6 souris C57/BL6 mâles de 18 à 20 g. La DP₅₀ est calculée selon la formule de Spearman-Kärber :

$$\text{Log DP}_{50} = - (x_0 - d/2 + d \sum r/n)$$

où x_0 est le Log de l'inverse du plus petit volume de l'anti-venin pour lequel tous les animaux survivent, d est le Log du facteur de progression entre deux doses, r est le nombre de survivants par dose et n est le nombre d'animaux par dose.

L'activité de l'anti-venin (séroneutralisation *in vivo*) exprime le nombre de DL₅₀ de venin neutralisé par 1 mL d'anti-venin.

Résultats

Purification et caractérisation de la fraction toxique du venin d'A.m.m.

Toxicité du venin

La concentration en protéine et la DL₅₀ chez la souris ont été déterminées pour trois lots de venin d'A.m.m. (Tableau 1). En moyenne, 1 mL de venin du scorpion A.m.m. contient 1000 ± 50 DL₅₀.

Tableau 1. Estimation de la DL₅₀ du venin d'A.m.m. chez la souris.

Table 1. Evaluation of DL₅₀ of A.m.m. venom in mice.

Lot	Concentration en protéines (mg / mL)	DL ₅₀ (mL)	DL ₅₀ (mg)
1	14,8	1,04	15,4
2	15,2	0,98	14,9
3	15,1	0,95	14,345

Fractionnement et caractérisation du venin

La Figure 1 représente la chromatographie du venin d'A.m.m. sur une colonne de Sephadex G₅₀. L'élution montre 2 pics protéiques : G₁ et G₂. Le rendement de purification est de 98%. La fraction G₁ représente 76% des protéines du venin et la fraction G₂, 24%.

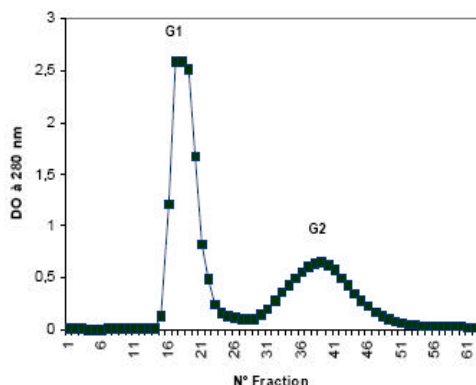


Fig. 1. Profil d'élution des protéines lors de la chromatographie par filtration sur gel de Sephadex G₅₀.

Fig. 1. Elution profile of venom proteins during Sephadex G₅₀ gel filtration.

L'électrophorégramme (Figure 2) montre que les protéines contenues dans la fraction G₁ possèdent un poids moléculaire supérieur ou égal à 67 kDa, tandis que celles contenues dans la fraction G₂ ont une masse moléculaire beaucoup plus faible (< 14 kDa).

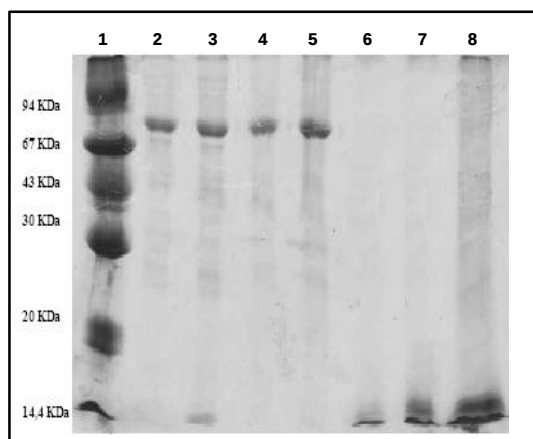


Fig. 2. Electrophorégramme sur gel de polyacrylamide en présence de SDS du venin brut d'A.m.m. et des fractions G₁ et G₂. **1/** marqueurs de poids moléculaire, **2/** venin brut d'A.m.m. (5 µg), **3/** venin brut d'A.m.m. (10 µg), **4/** fraction G₁ (5 µg), **5/** fraction G₁ (10 µg), **6/** fraction G₂ (5 µg), **7/** fraction G₂ (10 µg), **8/** fraction G₂ (20 µg).

Fig. 2. Electrophoretic profile of A.m.m. venom and of fractions G₁ and G₂ on polyacrylamide gel in the presence of SDS. **1/** molecular mass markers, **2/** crude A.m.m. venom (5 mg), **3/** crude A.m.m. venom (10 mg), **4/** G₁ fraction (5 mg), **5/** G₁ fraction (10 mg), **6/** G₂ fraction (5 mg), **7/** G₂ fraction (10 mg), **8/** G₂ fraction (20 mg).

La toxicité des deux fractions G₁ et G₂ est comparée à celle de 100 µg de venin brut. Nous avons constaté que le venin brut produit la mort des souris dans 8 cas sur 8, en moins de 5 min. L'injection de 20 µg de la fraction G₂

entraîne la mort immédiate des souris (8/8). La fraction G₁ n'est pas létale (aucune souris morte sur 8, après 48 heures), même lorsqu'elle est injectée à une dose 25 fois (500 µg) supérieure à celle utilisée pour la fraction G₂. Ainsi, des deux fractions séparées par filtration moléculaire sur une colonne de Sephadex G₅₀, la fraction G₂ est toxique et la fraction G₁ ne l'est pas. C'est la fraction G₂ que nous avons utilisée dans un programme d'immunisation pour produire un anti-venin anti-scorpionique à but thérapeutique.

Après immunisation des muets avec la fraction toxique G₂, la concentration plasmatique en protéines est de 90,3 mg/mL. Après purification et concentration des fragments F(ab')₂, la concentration finale de la solution d'anti-venin obtenue est de 70,1 mg d'immunoglobulines par mL.

Détermination de la dose protectrice 50 (DP₅₀) et de l'activité de l'anti-venin

L'injection de doses croissantes d'anti-venin (entre 19 et 57 µL par souris) montre que la dose minimale de la solution d'immunoglobulines assurant la survie de 100% d'animaux est de 48 µL (soit 3.365 µg de protéines) alors que les doses inférieures ou égales à 23 µL ne protègent pas. La DP₅₀ de l'anti-venin calculée sur les 5 tests est de 32 ± 1 µL (soit 2.243,2 ± 70,1 µg). La valeur de l'activité de l'anti-venin anti-A.m.m., calculée pour 5 tests, est de 96 ± 10,5 DL₅₀ / mL.

Détermination de la DP₅₀ et de l'activité de l'anti-venin anti-A.m.m. vis-à-vis du venin de B.o.

Nous avons souhaité savoir si les immunoglobulines fabriquées contre la fraction G₅₀ du venin A.m.m. avaient le pouvoir d'inhiber d'autres venins de scorpions potentiellement dangereux au Maroc. A cette fin, nous avons effectué des tests *in vivo*.

Nous avons utilisé une solution d'immunoglobulines anti-A.m.m. qui neutralise 97 DL₅₀/mL de venin d'A.m.m., et un mélange des venins issus de plusieurs centaines de scorpions B.o. Nous avons injecté un mélange d'une dose constante d'épreuve de venin de B.o. et d'un volume croissant d'anti-venin anti-A.m.m. (de 19 à 57 µL par souris) à différents lots de 6 souris. Aucun animal n'a survécu à des volumes de sérum inférieurs à 28 µL (soit 1.963 µg). Une protection de 100% des souris est observée avec 57 µL (soit 3.996 µg). La DP₅₀ est de 34 µL (soit 2.351 µg) de l'anti-venin anti-A.m.m. vis-à-vis du venin de B.o. L'activité de l'anti-venin anti-A.m.m., vis-à-vis du venin de B.o. est de 92 DL₅₀ / mL.

Nos résultats confirment les observations précédentes (Delori *et al.*, 1981) montrant que le venin de B.o. était reconnu par le sérum anti-venin d'A.m.m. L'activité des immunoglobulines vis-à-vis des deux venins est comparable (97 DL₅₀ de venin d'A.m.m. et 92 DL₅₀ de venin B.o. sont neutralisées par 1 mL de sérum).

Discussion

Dans ce travail, nous montrons essentiellement que l'action létale du venin d'A.m.m. est due principalement à des toxines de faible poids moléculaire. Après fractionnement du venin d'A.m.m. par filtration sur gel Sephadex G₅₀, la fraction toxique G₂ ne présente que 24% des protéines totales, mais elle possède la totalité du pouvoir létal du venin pour la souris. Elle contient des protéines de faible poids moléculaire (< 14 kDa) caractéristiques des neurotoxines du venin de scorpion. Cette fraction toxique a été utilisée pour la préparation

d'un anti-venin ayant un pouvoir protecteur élevé. En effet, l'immunisation à l'aide du venin complet entraîne la production d'anticorps dirigés contre des molécules non toxiques au détriment des neurotoxines, ce qui limite l'efficacité des anti-venins obtenus et, par conséquent, leur pouvoir protecteur. La sévérité de l'envenimation est liée à la concentration des toxines du venin dans le plasma du patient (Ismail *et al.*, 1995 ; De Rezende *et al.*, 1996 ; Krifi *et al.*, 2001), ainsi, un anti-venin dirigé spécifiquement contre les toxines du venin se montrera plus efficace qu'un autre préparé contre un venin brut. Par ailleurs, nous avons purifié les anticorps obtenus dans le sérum et séparé la fraction F(ab')₂. La concentration d'immunoglobulines ainsi obtenue dans la solution finale est de 70 µg/mL.

Il est aussi important d'utiliser une dose suffisante d'anticorps pour obtenir une neutralisation immédiate, complète et définitive du venin dans le compartiment vasculaire et neutraliser les toxines qui reviennent dans ce compartiment vasculaire (où sont confinés les F(ab')₂) lors de la redistribution des toxines présentes dans les compartiments extravasculaires (où elles agissent). La plus faible dose d'anti-venin qui permet d'obtenir ces résultats est appelée la "dose minimale efficace". Cette dose augmente avec la sévérité de l'envenimation. Elle dépend aussi de la qualité (pouvoir neutralisant) et de la nature de l'anti-venin (Freire Maia *et al.*, 1994 ; Revelo *et al.*, 1996 ; Santanas *et al.*, 1996 ; Kalapothakis et Chavez-Olortegui, 1997).

Nous avons aussi montré que les immunoglobulines, préparées contre la fraction toxique (G₂) du venin d'A.m.m., reconnaissent et neutralisent de manière croisée les toxines du venin de la seconde espèce de scorpion présente au Maroc (B.o.). Ce nouvel anti-venin présente donc un intérêt thérapeutique important pour améliorer le traitement des envenimations scorpioniques au Maroc.

Références bibliographiques

- Amaral C.F., De Rezende N.A., Freire-Maia L. (1993) Acute pulmonary edema after *Tityus serrulatus* scorpion sting in children. *Am. J. Cardiol.* 71:242-5.
- Bawaskar H.S., Bawaskar P.H. (1994) Vasodilators: scorpion envenoming and the heart (an Indian experience). *Toxicon* 32:1031-40.
- Dehesa-Davila M., Possani L.D. (1994) Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon* 32:1015-8.
- Delori P., Van Rietschoten J., Rochat H. (1981) Scorpion venoms and neurotoxins: an immunological study. *Toxicon* 19:393-407.
- De Rezende N.A., Chavez-Olortegui C., Amaral C.F.S. (1996) Is the severity of *Tityus serrulatus* scorpion envenoming related to plasma venom concentration? *Toxicon* 34:820-3.
- De Rezende N.A., Dias M.B., Compolina D., Chavez-Olortegui C., Diniz C.R., Santo Amaral C.F.S. (1995) Efficacy of antivenom therapy for neutralizing circulating venom antigens in patients stung by *Tityus serrulatus* scorpion. *J. Am. Trop. Med. Hyg.* 52:277-80.
- Freire-Maia L., Campos J.A., Amaral C.F.S. (1994) Approaches to the treatment of scorpion envenoming. *Toxicon* 32:1009-14.
- Ghalim N., El Hafny B., Sebti F., Heikel J., Lazar N., Moustani R., Benslimane A. (2000) Scorpion envenomation and serotherapy in Morocco. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62:277-83.
- Gueron M., Margulis G., Ilias R., Sofer S. (1993) The management of scorpion envenomation. *Toxicon* 31:1071-6.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published (NIH, 1996) by the US National Institute of Health (NIH, No 85-23, revised 1996).
- Ismail M. (1995) The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon* 33:825-58.
- Kalapothakis E., Chavez-Olortegui C. (1997) Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. *Toxicon* 35:1523-9.
- Krifi M.N., Miled K., Abderrazek M., El-Ayeb M. (2001) Effects of antivenom on *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion venom pharmacokinetics: towards an optimization of antivenom immunotherapy in a rabbit model. *Toxicon* 39:1317-26.
- Revelo M.P., Bambirra E.A., Ferreira A.P., Diniz C.R., Chavez-Olortegui C. (1996) Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon* 34:1119-25.
- Santanas G.C., Freire A.C.T., Ferreira A.P.L., Chavez-Olortegui C., Diniz C.R., Freire-Maia L. (1996) Pharmacokinetics of *Tityus serrulatus* scorpion venom determined by enzyme-linked immunosorbent assay in the rat. *Toxicon* 34:1063-6.
- Soulaymani B.R., Faraj Z., Semlali I., Ouammi L., Badri M. (2003) Stratégie nationale de lutte contre les piqures et envenimations scorpioniques. Application et évaluation. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 96:317-9.
- Touloun O., Sliman T., Boumezzough A. (2001) Epidemiological survey of scorpion envenomation in southwestern Morocco. *Venom. Anim. Toxins J.* 7:199-218.

Reprotoxicité des venins d'invertébrés

Françoise GOUDEY-PERRIERE^{1*}, Nicole PAGES^{1,2}, Claude PERRIERE¹

¹ Laboratoire de Biologie animale appliquée, Faculté de Pharmacie, 3 rue Jean-Baptiste Clément, 92350 Châtenay-Malabry ; ² Laboratoire de toxicologie, Faculté de Pharmacie Université de Strasbourg, 67400 Illkirch, France.

* Auteur correspondant ; Fax : 33 (01) 46 83 55 47 ; Courriel : fgoudey@noos.fr

Résumé

Les envenimations par des invertébrés sont, sauf exception, le plus souvent négligées par la population : la plupart en effet sont peu douloureuses, et en dehors de quelques espèces reconnues, leur venin n'est pas mortel pour l'Homme. Bien peu d'observations se sont intéressées au devenir de l'être humain en formation, reconnu pour être plus sensible que les adultes. Dans certains cas cependant, les femmes enceintes ont fait l'objet d'une attention particulière, surtout en fin de grossesse où lorsqu'un sérum antivenimeux leur avait été injecté. Mais rares sont les cas d'envenimation signalées au début de la gestation, et très peu d'études se sont attachées à démontrer l'innocuité des venins sur l'embryon. Des accidents graves et quelques études effectuées sur des animaux ont pourtant montré l'intérêt de cette interrogation.

Invertebrate venom reprotoxicity

Envenomations from invertebrates are generally neglected by the patients : most of them are moderately painful and, with exception of some well recognized species, their venoms are not lethal for humans. Informations concerning the developing foetuses who are more at risk than adults are very limited. Only some data are disposable for pregnant women in either their 3rd trimester of gestation or after antivenom treatment. In contrast, early envenomations and venom teratological effects are quite unknown. However, it appears in view of some severe human envenomation cases and animal studies as well that appropriate reprotoxic studies are actually needed.

Keywords : Reprotoxicity, embryotoxicity, gestation, envenomation, invertebrates.

Introduction

Les effets des venins d'invertébrés sur la reproduction ont été peu étudiés. Cela tient sans doute à la complexité du problème puisque les effets toxiques des venins peuvent différer au cours des différentes étapes de la reproduction. Le venin peut, en effet :

- affecter des facteurs physiologiques qui conditionnent à plus ou moins long terme le comportement sexuel ou maternel ;
- induire des modifications vasculaires ou hémodynamiques maternelles qui peuvent influencer l'implantation de l'embryon, ou sa survie dans l'utérus ;
- franchir la barrière foeto-placentaire et agir directement sur l'embryon, exerçant un effet embryotoxique ou tératogène ;
- posséder des propriétés foetotoxiques susceptibles d'affecter le développement des différents organes et leur maturation, avant ou après la naissance.

Le but de cette étude a été de réunir les données disponibles, tant cliniques qu'expérimentales, sur ce thème. Les conséquences d'envenimations graves ne sont en général signalées dans la littérature scientifique que lorsque les mères sont soignées en milieu hospitalier, souvent au cours de leur troisième trimestre de grossesse. Un grand nombre de cas échappent donc à l'observation. Par ailleurs, les répercussions fœtales d'un traitement antivenimeux de la mère donnent lieu, encore aujourd'hui, à discussion. Les études réalisées

sur l'animal de laboratoire sont rares pour des raisons éthiques évidentes. Ce sont finalement les études sur utérus isolé qui sont le plus abondantes, mais elles sont assez peu utiles au clinicien.

Venins de Cnidaire

Une envenimation grave par *Chironex fleckeri* a été signalée chez une femme de 20 ans, au cours de la 34^{ème} semaine de grossesse. Neuf semaines plus tard, elle a donné naissance par césarienne à un bébé en bonne santé. Une infirmière enceinte (37^{ème} semaine de gestation) qui lui avait donné des soins a été affectée par les cnidocytes ; aucune information n'a été donnée sur les conséquences de cette envenimation secondaire, si ce n'est qu'elle a accouché normalement deux semaines plus tard. C'est surtout la mention de l'innocuité du traitement antivenimeux par le sérum anti-chironex qui a été soulignée (Williamson *et al.*, 1980).

Les venins de Cnidaire affectent de nombreuses fonctions physiologiques (Winkel *et al.*, 2003) car ils possèdent plusieurs fractions actives sur les canaux ioniques, en particulier les canaux sodium et potassium (pour revues, voir Norton, 1991 ; Honma et Shiomi, 2005 ; Hanck et Sheets, 2007). Ainsi, de nombreuses toxines de Cnidaire affectent les canaux sodium Nav 1.1-1.6 : ATX-II purifiée à partir du venin de *Anemonia sulcata*, AFT-II isolé du venin d'*Anthopleura fuscoviridis* ou encore Bc-III du venin de *Bunodosoma caissarum*, par exemple (Oliveira *et al.*, 2004).

Cela est d'autant plus préoccupant que les courants ioniques dépendants du potentiel de membrane varient pendant l'embryogenèse et le développement embryonnaire (Dietzel, 1995 ; Pineda *et al.*, 2005 ; Cuomo *et al.*, 2006 ; Novak *et al.*, 2006). Par ailleurs, dans le placenta humain à terme, le blocage des canaux calcium ou sodium dépendants du potentiel diminue l'amplitude de la contraction des vaisseaux du cordon ombilical (Huidobro-Toro *et al.*, 2001).

Nous n'avons pas trouvé d'études de la reprotoxicité de ces venins.

Venins de Mollusques

Les conotoxines sont actives sur de nombreux canaux ioniques, et l' ω -conotoxine de *Conus geographus* (ω -Cg-toxine) agit sur le muscle utérin en augmentant la réponse contractile à l'acétylcholine et au potassium (Ishida *et al.*, 1988). Chez le Rat, les toxines de cônes agissent sur la maturation du système nerveux central, (Boukhaddaoui *et al.*, 2000) et perturbent les propriétés contractiles du diaphragme au moment de la naissance (Martin-Caraballo *et al.*, 2000).

A notre connaissance, aucun effet clinique ou expérimental n'a été signalé sur la reproduction.

Venins d'Arthropodes

Venins de scorpions

Les venins de scorpion sont considérés comme abortifs chez la femme enceinte (Osman *et al.*, 1972) bien que peu d'observations circonstanciées soient disponibles. Ainsi, Ismail *et al.* (1994), travaillant sur le venin d'*Androctonus crassicauda* ont surtout évalué les répercussions maternelles et fœtales du sérum antivenimeux. Kakonkar *et al.* (1998) ont noté que parmi les victimes adultes, ce sont surtout les femmes enceintes qui meurent après avoir été piquées par *Mesobuthus tamulus* dans la région de Konkan (Indes), et ont surtout cherché à démontrer l'efficacité d'un sérum antivenimeux pour assurer la survie des victimes. Dans sa récente revue, Langley (2004) signale que l'on sait finalement peu de choses sur l'effet des venins de scorpion chez la femme enceinte : les venins contiennent de la sérotonine (Merei et Ibrahim, 1979 ; Basu *et al.*, 1990) qui peut induire des contractions utérines, surtout au cours du premier trimestre de grossesse. C'est la raison pour laquelle Merei et Ibrahim (1979) préconisent d'administrer un antagoniste de la 5-HT après une piqûre de *Leiurus quinquestriatus*. Par ailleurs les venins de *Leiurus quinquestriatus*, *Pandinus exitialis*, *Androctonus amoreuxi* sont capables de provoquer des contractions utérines par libération de kinines, de prostaglandines ou de substances à action lente (Osman *et al.*, 1972 ; Ismail *et al.*, 1974, 1983 ; Meki *et al.*, 1995 ; Abdel Raheim *et al.*, 1997). Des neurotoxines, dont l'action peut s'exercer au niveau du muscle utérin, ont aussi été impliquées. C'est le cas de la toxine T1 de *Tityus serrulatus*, qui pourrait agir par libération d'acétylcholine et stimulation des récepteurs muscariniques (Mendonça *et al.*, 1995) ; enfin, les venins de *Buthus occitanus tunetanus*, *Androctonus australis* et *Androctonus aeneas* contiennent des neurotoxines provoquant des contractions dans les utérus de femelles non gravides (Mendonça *et al.*, 1995 ; Merei et Ibrahim, 1979 ; Nassar *et al.*, 1990 ; Osman *et al.*, 1972). Au contraire, le venin d'*Androctonus amoreuxi* provoque une relaxation de l'utérus de rat par stimulation des récepteurs

β -adrénergiques (Ghazal *et al.*, 1975).

Dans une étude récente et un peu plus détaillée effectuée en Tunisie, Ben Nasr *et al.* (2007a) dénombrent 12 femmes enceintes parmi les 167 personnes (soit 7%) envenimées entre 1990 et 2004 et soignées à l'hôpital Habib Bourguiba. Des douleurs pelviennes intenses, évoquant des symptômes de pré-éclampsie, pourraient être dues à des contractions utérines anormales.

Les données expérimentales sont rares. L'injection quotidienne à des ratte gravides, pendant des périodes variées de la gestation, de 200 ou 400 μ g/kg de venin d'*Androctonus amoreuxi* a provoqué une mortalité fœtale élevée, une baisse de la croissance corporelle et de nombreuses anomalies. Les données expérimentales sont résumées dans le Tableau 1 (Ismail *et al.*, 1983).

Tableau 1. Effet reprotoxique du venin d'*Androctonus amoreuxi* chez le rat.

Table 1. Reprotoxic effect of *Androctonus amoreuxi* venom in rat.

J20 de gestation	Témoins	Série 1	Série 2	Série 3
Mortalité fœtale	2/63 3,2%	29/50 58%	42/45 93,3%	43/43 100%
Poids (g $\pm$ SEM)	4,5 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,1	-
Anomalies	0	21/21	0/3	-

Série 1 : 1 injection de 200 μ g/kg, entre J8 et J12 de gestation ; **série 2 :** 2 injections de 200 μ g/kg à J9 et J10 + 1 injection à J11 ; **série 3 :** 1 injection de 200 μ g/kg, entre J7 et J14. La nidation se produit à J6 chez la ratte.

Les fœtus de la série 1 ont tous présenté des anomalies osseuses (défauts d'ossification des carpes et des tarses, absence de queue, côtes déformées, raccourcies ou absentes). Aucune anomalie n'a été décelée sur les 3 fœtus survivants de la série 2. Ceux de la série 3 ont tous été résorbés. Toutes les femelles gestantes traitées ont présenté une congestion importante au niveau des vaisseaux pelviens (hématomes au niveau des artères iliaque, hypogastrique et utérine). L'injection de venin radiomarké a montré qu'une très faible fraction passait au niveau placentaire ou fœtal, suggérant que la tératogénicité du venin était plutôt liée aux perturbations métaboliques induites chez la mère (inhibition de la libération d'histamine, déséquilibres électrolytiques, diminution du taux de phosphatase alcaline plasmatique, hypokaliémie) qu'à un effet direct sur le fœtus. Une hypoxie utérine, associée à une acidose respiratoire démontrée chez le lapin, est également possible (Ismail *et al.*, 1983).

Il serait intéressant d'effectuer ce type d'étude pour d'autres scorpions, car *A. amoreuxi* n'est pas le venin le plus actif au niveau de l'utérus notamment ; tous n'ont pas le même effet reprotoxique : celui d'*Androctonus crassicauda* est moins puissant que ceux de *Leiurus quinquestriatus*, *Buthus minax*, *Pandinus exitialis*, *Parabuthus gravimanus* et *Androctonus amoreuxi* (Ismail *et al.*, 1994).

Une autre étude récente sur ratte gravide recevant par voie IP 500 μ g de venin de *Buthus occitanus tunetanus* /kg, le 22^{ème} jour de la gestation (échéance estimée pour la mise bas) a montré que, en comparaison avec des femelles témoin, le venin augmentait le temps de travail pour chaque naissance

(38,9 ± 51 min vs 23 ± 3 min) et la durée totale de la mise bas pour un nombre de fœtus équivalent (20,5 ± 6,4 vs 7,9 ± 0,8 h). Ce ralentissement n'est pas dû à un défaut de contractilité de l'utérus, qui est au contraire hypercontractile chez les femelles envenimées en raison en particulier de la diminution des périodes de quiescence. En revanche, cette activité myométriale pourrait conduire à des hémorragies observées chez deux des rattes de l'expérience (Ben Nasr *et al.*, 2007b). Le venin peut donc induire un état dystocique chez les femelles en fin de gestation, alors qu'une envenimation sévère en début de gestation peut provoquer des avortements, comme cela a été observé chez la femme au cours du premier trimestre de gestation (Merei et Ibrahim, 1979).

Venins d'araignées

Peu de cas de morsures de *Latrodectus* ont été signalés chez des femmes enceintes. C'est en raison de crampes importantes dans les jambes, les hanches et le bas du dos qu'une femme enceinte de 22 semaines est entrée à l'hôpital ; un traitement symptomatique lui a été administré, suivi d'une injection de 2,5 mL d'antivenin. Elle est sortie de l'hôpital le lendemain, les suites n'ont pas été notées (Handel *et al.*, 1994). Un autre cas concerne une femme à 37,5 semaines de grossesse : elle a continué à présenter des symptômes sévères après administration de 6 mg de morphine et 4 mg de valium, puis 10 mL de gluconate de calcium à 10% et 2 mg de midazolam IV, conformément au protocole du Centre Antipoison local. Finalement, après transport en unité d'obstétrique en raison de contractions utérines et d'un début de travail (dilatation du col utérin), de l'antivenin lui a été injecté ; le travail a cessé. Elle a donné naissance un enfant en bonne santé une semaine plus tard. Deux autres cas ont été signalés, concernant des femmes à 16 et 30 semaines de gestation (Russell *et al.*, 1979 ; Scalzone et Wells, 1994) ; la première a reçu de l'antivenin, mais pas la seconde. Dans les deux cas, les enfants sont nés à terme et en bonne santé. Le problème du diagnostic différentiel se pose. En effet, l'envenimation ne doit pas être confondue avec une pré-eclampsie : dans le cas de l'envenimation, le calcium est préconisé, alors que son taux doit être diminué par administration de magnésium en cas d'éclampsie (Sherman *et al.*, 2000). L' α -latrotoxine, dont la taille élevée (130 kDa) rend improbable le franchissement de la barrière foeto-placentaire (Handel *et al.*, 1994), pourrait cependant être en cause, en induisant une dépolarisation neuronale et la libération d'acétylcholine à la jonction neuromusculaire (Russell *et al.*, 1979). Pour Russell *et al.* (1979), le risque d'avortement serait lié à une augmentation des contractions utérines. Selon les données actuelles, le traitement par sérum anti-venimeux ne serait pas contre-indiqué (Sherman *et al.*, 2000).

Par ailleurs, sur les 5 cas signalés de morsure de *Loxosceles*, entre 5,5 et 8 mois de gestation, aucun effet dramatique n'a été enregistré, ni pour la mère, ni pour l'enfant ; aucun traitement antivenimeux n'a été administré (Anderson, 1991).

Venin d'Hyménoptères

Chez l'Homme

La première observation de l'action tératogène d'un venin a été faite en France, sur un nouveau-né dont la mère avait été piquée par une trentaine d'abeilles (*Apis mellifera*) au cours du 3^{ème} mois de grossesse. Les

malformations présentes à la naissance étaient nombreuses et très graves :

- cœur hypertrophié occupant tout l'hémithorax gauche, agénésie du cœur gauche ;
- communication des deux oreillettes, estomac en *situs inversus* ;
- hernie de la ligne blanche (éventration importante) ;
- aplasie de la colonne lombaire, absence de sacrum ;
- hypoplasie des membres inférieurs avec, au niveau distal, disparition des masses musculaires par atrophie neurogène des parties molles ;
- ankylose presque complète des genoux et des hanches ;
- *pterygium colli* bilatéral ;
- faciès mongoloïde ;
- atrophie des organes génitaux.

L'enfant n'a pas survécu (Schneegans *et al.*, 1961).

Les observations cliniques répertoriées sont rares, et la plupart correspondent à un choc anaphylactique, comme ce cas signalé en Grande-Bretagne : après avoir été piquée par une abeille au cours de la 30^{ème} semaine de gestation, une femme a présenté un choc anaphylactique qui l'a laissée inconsciente pendant plusieurs heures. Les battements cardiaques du fœtus sont devenus inaudibles 4 jours après la piqûre, et ses mouvements ont cessé. Elle a accouché spontanément 34 jours près la piqûre d'un enfant cyanosé, présentant une hyperlaxité des genoux, une luxation de la hanche, une hypotonie des membres supérieurs et une hypertonie des membres inférieurs. Il a vécu 64 heures. L'autopsie a mis en évidence une cavitation kystique de la substance blanche et une perte de neurones dans différentes aires cérébrales. L'hypoxie subie durant la période d'hypotension maternelle pourrait expliquer l'œdème cérébral et les atteintes neuronales, tandis que l'absence de mouvements à 4 jours pourrait avoir induit les pathologies du névraxe et les anomalies des membres (Erasmus *et al.*, 1982). Une naissance prématurée a également été signalée en Croatie après de multiples piqûres de la mère par des abeilles (Rosenzweig, 1975).

La guêpe peut aussi être dangereuse : ainsi, en Croatie, une femme, après avoir été piquée par *Paravespula germanica* durant la 27^{ème} semaine de sa grossesse, a développé une réaction anaphylactique entraînant deux jours plus tard des douleurs utérines et des contractions. Un cerclage cervical a été nécessaire. La naissance s'est produite au cours de la 35^{ème} semaine, et l'enfant a eu un développement normal (Habeck *et al.*, 2000).

Certaines fourmis sont également redoutables. Le venin de la fourmi *Pachycondyla senaarensis*, lorsqu'il est administré de façon répétée, peut induire un choc anaphylactique gravissime : un cas a été décrit en Arabie chez une femme enceinte au cours de sa 40^{ème} semaine de grossesse. L'anaphylaxie a été traitée et l'état de la patiente a été stabilisé en une heure. 16 heures plus tard, des signes d'une atteinte utérine et l'absence des battements du cœur fœtal ont conduit au déclenchement de l'accouchement ; le nouveau-né était mort. Un caillot rétroplacentaire de 500 mL s'était formé, et l'histologie a révélé l'infiltration de vaisseaux déciduaux par des lymphocytes et des monocytes (Rizk *et al.*, 1998). Les envenimations par la fourmi « tucandeira » (*Paraponera clacata*) sont fréquentes en Amazonie. Une femme enceinte en serait morte (Pierini *et al.*, 1996).

La désensibilisation au venin d'Hyménoptères est maintenant très fortement déconseillée durant la grossesse. Une jeune femme de 28 ans a conçu un bébé alors qu'elle était en traitement de désensibilisation ; le traitement s'est poursuivi pendant la gestation, et une naissance prématurée est intervenue (Mock *et al.*, 2000). Une étude antérieure n'avait pourtant pas retenu de notion de risque. En effet, Schwartz et ses collaborateurs ont utilisé un questionnaire du *Committee on Insects of the American Academy of Allergy and Immunology, Milwaukee, Wis.* (1990) pour surveiller 26 femmes allergiques au venin d'abeille qui ont reçu un traitement de désensibilisation au cours des 43 grossesses qu'elles ont totalisé. Ils ont observé : 5 avortements spontanés [3 au cours du 1^{er} trimestre (7%) et 2 au cours du second (4,6%), dont un chez une femme qui venait de commencer le traitement de désensibilisation] ; 36 naissances normales, mais deux femmes ont donné naissance l'une à un enfant mort-né (1/43 soit 2,3%), et l'autre à un enfant vivant, mais présentant de multiples malformations cardiovasculaires (2,3%). Les auteurs ont considéré que ces données ne différaient pas significativement de celles rencontrées dans la population générale. Toutefois, un enfant mort-né ne se rencontre en principe que dans 0,5% des naissances, et les malformations importantes dans 0,15 à 0,57%. Le principe de précaution mériterait d'être appliqué, et de fait, une désensibilisation devrait être déconseillée aux femmes enceintes, dans ce cas précis en particulier.

L'anaphylaxie due aux venins d'Hyménoptères a été mise en cause dans le déclenchement d'une naissance prématurée en raison notamment des risques de compression aorto-cave et de décollements placentaires. De ce fait, dans le cas d'une réaction anaphylactique au venin d'Hyménoptères une césarienne peut devoir être pratiquée en extrême urgence (Dewachter *et al.*, 2007). En revanche, l'anaphylaxie n'explique pas les malformations observées chez certains fœtus.

Chez l'animal

L'expérimentation réalisée sur 195 embryons de poulet traités a mis en évidence un effet de l'apivene (venin d'abeille commercialisé, « préparé de telle sorte que les substances actives sont conservées tout en éliminant les substances choquantes. C'est une substance extrêmement diffusible »). Injecté dans l'oeuf (0,02 à 0,4 mL d'apivene), entre le 1^{er} et le 8^{ème} jour d'incubation, le venin induit 42% de mortalité. Parmi les poussins survivants, 44% présentent des malformations souvent multiples et très graves. Il s'agit surtout de coelosomies (9,3%), d'hypoplasies du train postérieur (9,3%), d'atteintes squelettiques (26%) ou du tube neural [exencéphalies (2,9%), anencéphalies (2,9%), spina bifida (3,4%)], de malformations du bec (9,3%). L'ossification des membres postérieurs et de la colonne lombo-sacrée, étudiée chez un quart des embryons, est retardée. Les auteurs ont noté une grande similitude entre ces observations et celles décrites chez les fœtus humains (coelosomie, atteinte du tube neural, hypoplasie des membres postérieurs et du squelette, absence de calcification de la partie inférieure de la colonne vertébrale) (Schneegans *et al.*, 1961).

Une autre expérience a porté sur 1030 œufs de poule injectés par 0,4 mL d'apivene avant l'incubation, ou aux 2^{ème} ou 3^{ème} jours d'incubation et autopsiés vers le 11^{ème} jour. Le Tableau 2 récapitule les observations (Ruch *et al.*, 1961).

L'action létale et tératogène est d'autant plus élevée que l'injection est précoce. Les malformations graves, le plus souvent associées, portent sur la formation :

- du système nerveux central : 16 exencéphalies, 1 anencéphalie, 4 spina bifida ;
- de la paroi abdominale (26) ;
- du bec (25) ou du cou (4) ;
- des membres postérieurs chez pratiquement tous les fœtus malformés. Par ailleurs un grand nombre d'embryons vivants présentent en plus une atrophie isolée des membres postérieurs.

Tableau 2. Anomalies liées à l'injection de 0,4 mL d'apivene (V) par œuf, ou de solution témoin (T) (d'après Ruch *et al.*, 1961).

Table 2. Anomalies induced by apivene (V, 0.4 mL) or control (T) in hen eggs (from Ruch *et al.*, 1961).

Injection	Mortalité	Malformations graves
Avant incubation	V 220/296 (74%)	12/76 (15,8%)
	T 36/101 (36%)	0
2 ^{ème} jour	V 113/242 (46%)	9/129 (7%)
	T 7/56 (12,5%)	0
3 ^{ème} jour	V 76/492 (15%)	20/416 (4,8%)
	T 7/56 (12,5%)	0

Une expérience réalisée chez le rat montre que l'administration d'une dose de venin correspondant au 1/5 de la DL50 ou des fractions de bas ou de haut poids moléculaire, entre le 6^{ème} et le 14^{ème} jour de la gestation, exerce un effet embryotoxique, caractérisé par une lyse embryonnaire et une mortalité élevée des fœtus *in utero*. La foetotoxicité se traduit par une diminution du poids corporel et une diminution d'activités enzymatiques hépatiques (lactate déshydrogénase et isocitrate déshydrogénase). Aucun effet tératogène n'a été noté pour cette dose ; les composants de bas poids moléculaires du venin seraient les plus actifs (Shkenderov et Todorov, 1979).

Venins de Lépidoptères

Chez l'Homme

Une seule observation d'envenimation par un Lépidoptère chez la femme enceinte a été rapportée au Brésil : il s'agit d'une femme qui a eu un contact avec des chenilles de *Lononia obliqua* au cours de la 37^{ème} semaine de grossesse. Elle a présenté un syndrome hémorragique avec saignements gingival et génital. Le travail a commencé (possible abruptio-placentae) et elle a donné naissance à un enfant vivant, légèrement hypoxique. Après l'accouchement, la mère a fait une hémorragie et à présenté des problèmes rénaux aigus qui ont nécessité une hémodialyse (Fan *et al.*, 1998).

Les chenilles de *Lononia* sont recouvertes de soies urticantes contenant un venin stocké dans une cavité bordée de cellules endothéliales. Ce venin a des propriétés anticoagulante, procoagulante et antithrombotique (Carrijo-Carvalho et Chudzinski-Tavassi, 2007).

Chez l'animal

Au printemps 2001, une curieuse épidémie s'est produite dans le centre du Kentucky. Dénommée MRLS (*Mare Reproductive Loss Syndrome*), elle est caractérisée par l'avortement de 433 juments, la plupart en fin de gestation (LTA, pour *Last Term*

Abortion), et ses symptômes n'avaient jamais été observés. Les faits cliniques les plus marquants sont des lésions pulmonaires microscopiques au niveau des alvéoles, avec ou sans infiltration de cellules inflammatoires (neutrophiles, macrophages ou monocytes). Une inflammation du placenta ou du cordon a été observée chez 44% des fœtus. Un *Streptococcus* non- β -hémolytique (52% des fœtus) et un *Actinobacillus* sp (19% des fœtus) ont été mis en évidence dans les tissus foetaux (Cohen *et al.*, 2003a). Des enquêtes épidémiologiques réalisées auprès des 43 fermes ont conclu que des températures printanières anormalement élevées avaient permis une augmentation importante de la densité des populations des chenilles ETC (pour *Eastern tent caterpillars*) dans les pâtures concernées et leurs alentours (Cohen *et al.*, 2003b ; Dwyer *et al.*, 2003). Des analyses ont permis de calculer que durant le mois d'avril 2001, l'exposition aux ETC était équivalente à environ 5 g/jour et avait augmenté jusqu'à 30 g/jour au moment où l'atteinte pathologique avait été la plus grave. Sebastian *et al.*, (2003) en ont conclu que le MLRS pouvait être dû à l'ingestion d'ETC. L'exposition des juments au pâturage durant le printemps avait favorisé le MLRS-LTA (Cohen *et al.*, 2003c).

Les chenilles de cette espèce (*Malacosoma americanum*) se nourrissent souvent de feuilles de *Prunus serotina*, très cyanogènes. Une première hypothèse avait mis en cause l'effet du cyanure dans l'intestin des juments (Fitzgerald *et al.*, 2002). Cette hypothèse n'a pu être démontrée. Par contre, Tobin *et al.* (2004) ont constaté la présence de soies barbelées au niveau des sensilles venimeuses ; ces soies pourraient pénétrer dans l'intestin des juments, passer dans le sang et atteindre des tissus distants en entraînant avec elles des bactéries. Des microgranulomes intestinaux ont effectivement été observés. Expérimentalement, l'exposition de juments gravides à des chenilles broyées a entraîné des avortements précoces ou tardifs ; le premier avortement était d'autant plus précoce et le taux d'avortement d'autant plus élevé que la dose de chenilles ingérée augmentait (Sebastian *et al.*, 2003). Le gavage de juments gravides (sans accès à la pâture) avec des chenilles à jeun, a induit l'avortement de 4 juments sur 5 (2 après 8 jours, 1 après les 10ème et 13ème jours de gavage). L'ingestion d'excreta de chenilles est sans effet (Bernard *et al.*, 2004). Le mécanisme exact conduisant à l'avortement n'a pas encore été identifié.

Venins d'Echinodermes

Les Holothuries (ou concombres de mer) contiennent de nombreuses fractions toxiques, dont certaines inhibent le début de l'embryogenèse chez l'oursin. Le cucumarioside C de *Cucumaria fraudatrix*, jusqu'à 2 μ g/mL de milieu, diminue la synthèse d'ADN et le taux de division de l'œuf de l'oursin *Strongylocentrotus nudus*. Des concentrations supérieures sont toxiques (blocage de la division de l'œuf et lyse des blastomères). Lorsqu'il est administré au stade gastrula, le cucumarioside C bloque complètement le développement de l'embryon (Anisimov *et al.*, 1974). Chez les Mammifères, le cucumarioside utilisé à long terme n'a pas d'effet sur la fonction reproductrice des rats, la condition des femelles gravides ou le développement post-natal des jeunes. Il n'exerce aucun effet tératogène. Par contre, l'utilisation de la toxine avant ou pendant l'implantation exerce un effet contraceptif (Sharova *et al.*, 1991). Les holotoxines A1

et B1, provenant de *Stichopus japonicus* et l'holothurine A de *Holothuria atra* suppriment l'ovulation et stimulent l'activité contractile de l'utérus (Mats *et al.*, 1990).

Les étoiles de mer du groupe des *Acanthaster* peuvent être dangereuses pour l'Homme, mais aucun cas d'envenimation n'a été signalé chez les femmes enceintes (Schwartz et Meinking, 1997). Le venin de *A. planci* a été bien étudié : l'une des fractions qu'il contient provoque des contractions utérines chez la ratte et augmente la perméabilité vasculaire chez la lapine (Karasudani *et al.*, 1996). Elle pourrait avoir un effet délétère sur la reproduction.

Conclusion

Les observations cliniques sont peu nombreuses et surtout éparses. L'effet des envenimations varie en fonction des venins et de leur mécanisme d'action. Par ailleurs, même si des données cliniques étaient plus souvent rapportées, il serait difficile d'obtenir des statistiques fiables. Des études telles que celles effectuées par Ben Nasr *et al.* (2007a) devraient se multiplier.

Des études expérimentales *in vivo* n'ont été réalisées que dans le cas des venins de scorpions ou d'abeille, chez l'embryon de poulet ou chez le rat. Dans le premier cas, l'embryotoxicité et la tératogénicité ont été évaluées, par injection directe de venin dans l'œuf. Dans le cas du rat, l'effet du venin peut se traduire par des effets directs sur la mère alors que ceux exercés sur le fœtus peuvent être à la fois directs ou médiés par l'organisme maternel.

Cependant, les effets cliniques recensés et les études expérimentales, bien que très rares, suggèrent qu'une évaluation sérieuse des risques des envenimations par les invertébrés devrait être réalisée chez les femmes gestantes, afin de mieux cerner en première approche les risques encourus par une femme enceinte.

Références bibliographiques

- Abdel Raheim Ma., Meki M., Hossam El Din M. O (1997) A bradykinin potentiating fraction isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus* induced prostaglandin biosynthesis in female guinea pig. *Comp. Biochem. Physiol.* 116C:183-9.
- Anderson P.C. (1991) Loxoscelism threatening pregnancy : five cases. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165:1454-6.
- Anisimov M.M., Shcheglov V.V., Stonik V.A., Fronert E.B., Elyakov G.B. (1974) The toxic effect of cucumarioside C from *Cucumaria fraudatrix* on early embryogenesis of the sea urchin. *Toxicon* 12:327-9.
- Basu A., Gomes A., Gomes A., Dasgupta S.C., Lahiri S.C. (1990) Histamine, 5-HT and hyaluronidase in the venom of the scorpion *Lychas laevifrons* (Pock). *Indian J. Med. Res.* 92:371-3.
- Ben Nasr H., Hammami T. S., Sahnoun Z., Rebai T., Bouaziz M., Kassis M., Zeghal K. M. (2007a) Scorpion envenomation symptoms in pregnant women. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 13:94-102.
- Ben Nasr H., Hammami S., Mion G., Sahnoun Z., Chouaiekh F., Rebai T., Kassis M., Goyffon M., Zeghal K. (2007b) Effets de l'envenimation par *Buthus occitanus tunetanus* sur un modèle expérimental murin de gestation. *C. R. Biol.* 330:890-6.
- Bernard W.V., LeBlanc M.M., Webb B.A., Stromberg A.J. (2004) Evaluation of early fetal loss induced by gavage with eastern tent caterpillars in pregnant mares. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225:717-21.

- Boukhaddaoui H., Sieso V., Scamps F., Vigues S., Roig A., Valmier J. (2000) Q- and L-type calcium channels control the development of calbindin phenotype in hippocampal pyramidal neurons *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.* 12:2068-78.
- Carrijo-Carvalho L.C., Chudzinski-Tavassi A.M. (2007) The venom of the *Lonomia* caterpillar: an overview. *Toxicon* 49:741-57.
- Cohen N.D., Carey V.J., Donahue J.G., Seahorn J.L., Harrison L.R. (2003a) Descriptive epidemiology of late-term abortions associated with the mare reproductive loss syndrome in central Kentucky. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15:295-7.
- Cohen N.D., Donahue J.G., Carey V.J., Seahorn J.L., Piercy D., Donahue J.K., Williams D.M., Brown S.E. 2nd, Riddle T.W. (2003b) Case-control study of early-term abortions (early fetal losses) associated with mare reproductive loss syndrome in central Kentucky. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222:210-7.
- Cohen N.D., Carey V.J., Donahue J.G., Seahorn J.L., Donahue J.K., Williams D.M., Harrison L.R. (2003c) Case-control study of late-term abortions associated with mare reproductive loss syndrome in central Kentucky. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222:199-209.
- Cuomo A., Silvestre F., De Santis R., Tosti E. (2006) Ca²⁺ and Na⁺ current patterns during oocyte maturation, fertilization, and early developmental stages of *Ciona intestinalis*. *Mol. Reprod. Dev.* 73:501-1.
- Dewachter P., Mouton-Faivre C., Nace L., Longrois D., Mertes P.M. (2007) Traitement de la réaction anaphylactique en pré-hôpital et en salle d'urgence : revue de la littérature. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 26:218-28.
- Dietzel I.D. (1995) Voltage-gated ion currents in embryogenesis. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 2:293-308.
- Dwyer R.M., Garber L.P., Traub-Dargatz J.L., Meade B.J., Powell D., Pavlick M.P., Kane A.J. (2003) Case-control study of factors associated with excessive proportions of early fetal losses associated with mare reproductive loss syndrome in central Kentucky during 2001. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222:613-9.
- Erasmus C., Blackwood W., Wilson J. (1982) Infantile multicystic encephalomalacia after maternal bee sting anaphylaxis during pregnancy. *Arch. Dis. Child.* 57:785-787.
- Fan H.W., Cardoso J.L., Olmos R.D., Almeida F.J., Viana R.P., Martinez A.P. (1998) Hemorrhagic syndrome and acute renal failure in a pregnant woman after contact with *Lonomia* caterpillars: a case report. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 40:119-20.
- Fitzgerald T.D., Jeffers P.M., Mantella D. (2002) Depletion of host-derived cyanide in the gut of the eastern tent caterpillar, *Malacosoma americanum*. *J. Chem. Ecol.* 28:257-68.
- Ghazal A., Ismail M., Abdel-Rahman A.A., El-Asmar M.F. (1975) Pharmacological studies of scorpion (*Androctonus amoreuxi* Aud. & Sav.) venom. *Toxicon* 13(4):253-9.
- Habek D., Cerkez-Habek J., Jalsovec D. (2000) Anaphylactic shock in response to wasp sting in pregnancy. *Zentralbl. Gynakol.* 122:393-4.
- Hanck D.A., Sheets M.F. (2007) Site-3 toxins and cardiac sodium channels. *Toxicon* 49:181-93.
- Handel C.C., Izquierdo L.A., Cuet L.B. (1994) Black widow spider (*Ladrodectus mactans*) bite during pregnancy. *West J. Med.* 160:261-2.
- Huidobro-Toro J.P., González R., Varas J.A., Rahmer A., González R. (2001) [Spontaneous rhythmic contractions of human placental vessels: is it an evidence for a physiological pacemaker in blood vessels?] *Rev. Med. Chil.* 129:1105-12.
- Honma T., Shiomi K. (2006) Peptide toxins in sea anemones : structural and functional aspects. *Mar. Biotechnol.* (NY) 8:1-10.
- Ichida S., Oka H., Masada A., Fujisue T., Hata T., Matsuda N. (1988) Effects of synthetic omega-conotoxin on the contractile responses of segments of rat ileum, stomach fundus and uterus and guinea pig taenia coli. *Jpn J. Pharmacol.* 48:395-405.
- Ismail M., Abd-Elsalam M.A., Al-Ahaidib M.S. (1994) *Androctonus crassicauda* (Olivier), a dangerous and unduly neglected scorpion, 1: pharmacological and clinical studies. *Toxicon* 32 : 1599-618.
- Ismail M., Ellison A.C., Tilmisany A.K. (1983) Teratogenicity in the rat of the venom from the scorpion *Androctonus amoreuxi* (Aud. & Sav.). *Toxicon* 21:177-89.
- Ismail M., Osman O.H., Gumaa K.A., Karrar M.A. (1974) Some pharmacological studies with scorpion (*Pandinus exitialis*) venom. *Toxicon* 12:75-82.
- Kankonkar R.C., Kulkarni D.G., Hulikavi C.B. (1998) Preparation of a potent anti-scorpion-venom-serum against the venom of red scorpion (*Buthus tamalus*). *J. Postgrad. Med.* 44:85-92.
- Karasudani I., Omija M., Aniya Y. (1996) Smooth muscle contractile action of the venom from the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci*. *J. Toxicol. Sci.* 21:11-7.
- Langley R.L. (2004) A review of venomous animal bites and stings in pregnant patients. *Wilderness Environ. Med.* 15:207-15.
- Martin-Carballo M., Campagnaro P.A., Gao Y., Greer J.J. (2000) Contractile and fatigue properties of the rat diaphragm musculature during the perinatal period. *J. Appl. Physiol.* 88: 573-80.
- Mats M.N., Korkhov V.V., Stepanov V.R., Kupera E.V., Oleinikova G.K., Anisimov M.M. (1990) [The contractive activity of triterpenes glycosides-the total sum of holotoxins A1 and B1 and holothurin A in an experiment] (en russe, résumé anglais). *Farmakol. Toksikol.* 53:45-7.
- Meki A.R., Nassar A.Y., Rochat H. (1995) A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. *Peptides* 16:1359-65.
- Mendonça M., Da Luz M.M., Freire-Maia L., Cunha-Melo J.R. (1995) Effect of scorpion toxin from *Tityus serrulatus* on the contraction of the isolated rat uterus. *Toxicon* 33:355-61.
- Merei Z.A., Ibrahim S.A. (1979) Stimulation of the rat uterus by the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon* 13: 251-8.
- Mock B.A., Peiker G., Markert U.R., Jäger L. (2000) [Specific immunotherapy (hyposensitization) with insect venom in pregnancy] [Article en allemand]. *Z. Geburtshilfe Neonatol.* 204:117-9.
- Nassar Y., Abu Sinna G., Rahim S.A. (1990) Effect of a bradykinin-potentiating fraction, from the venom of the Egyptian scorpion *Buthus occitanus*, on the ovaries and endothelium of mice. *Toxicon* 28:524-34.
- Norton R.S. (1991) Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel. *Toxicon* 29:1051-84.
- Novak A.E., Taylor A.D., Pineda R.H., Lasda E.L., Wright M.A., Ribera A.B. (2006) Embryonic and larval expression of zebrafish voltage-gated sodium channel α -subunit genes. *Dev Dyn.* 235:1962-73.
- Oliveira J.S., Redaelli E., Zaharenko A.J., Cassulini R.R., Konno K., Pimenta D.C., Freitas J.C., Clare J.J., Wanke E. (2004) Binding specificity of sea anemone toxins to Nav 1.1-1.6 sodium channels: unexpected contributions from differences in the IV/S3-S4 outer loop. *J. Biol. Chem.* 279:33323-35. Erratum in: *J. Biol. Chem.* 2004, 279:44229.
- Osman O.H., Ismail M., El-Asmar M.F., Ibrahim S.A. (1972) Effect on the rat uterus of the venom from the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon* 10:363-6.
- Pierini S.V., Warrell D.A., de Paulo A., Theakston R.D. (1996) High incidence of bites and stings by snakes and other animals among rubber tappers and Amazonian Indians of the Jurua Valley, Acre State, Brazil. *Toxicon* 34:225-36.
- Pineda R.H., Heiser R.A., Ribera A.B. (2005) Developmental, molecular, and genetic dissection of INa *in vivo* in embryonic zebrafish sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 93:3582-93.
- Rizk D.E.E., Mensah-Brown E., M. Lukic (1998) Placental abruption and intrauterine death following an ant sting. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 63:71-72.
- Rosenzweig E. (1975) [Premature labor caused by multiple honeybee stings. (Are provoked labor and following premature birth really caused by multiple honeybee stings?)] [Article en croate]. *Rad Med Fak Zagreb.* 23:109-15.
- Ruch J.V., Kremer O., Schneegans E., Rohmer A. (1961) Effet de

- l'apivène sur la réalisation de la forme du corps de l'embryon de poulet. *C. R. Soc. Biol.* 155:1109-12.
- Russell F.E., Marcus P., Streng J.A. (1979) Black widow spider envenomation during pregnancy. *Toxicon* 17:188-9.
- Scalzone J.M., Wells S.L. (1994) *Latrodectus mactans* (black widow spider) envenomation : an unusual cause of abdominal pain in pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 83:830-1.
- Schneegans E., Keller R., Rohmer A., Ruch J.V. (1961) Mort néonatale par malformations multiples graves à la suite de l'action du poison d'abeilles. Etude expérimentale de l'apivène. *Ann. Pediatr. (Paris)* 37:376-9.
- Schwartz H.J., Golden D.B., Lockey R.F. (1990) Venom immunotherapy in the hymenoptera-allergic pregnant patient. *J. Allergy Clin. Immunol.* 85:709-12.
- Schwartz S., Meinking T. (1997) Venomous marine animals of Florida: morphology, behavior, health hazards. *J. Fla. Med. Assoc.* 84:433-40.
- Sebastian M., Gantz M.G., Tobin T., Harkins J.D., Bosken J.M., Hughes C., Harrison L.R., Bernard W.V., Richter D.L., Fitzgerald T.D. (2003) The mare reproductive loss syndrome and the eastern tent caterpillar: a toxicokinetic/statistical analysis with clinical, epidemiologic, and mechanistic implications. *Vet. Ther.* 4:324-39.
- Sharova L.V., Sedov A.M., Stonik V.A. (1991) [A preclinical study of the embryotoxic properties of cucumarioside and its effect on adult generative function] (Article en Russe, résumé anglais). *Farmakol. Toksikol.* 54:60-1.
- Sherman R.P., Groll J.M., Gonzalez D.I., Aerts M.A., (2000) Black widow spider (*Latrodectus mactans*) envenomation in a term pregnancy. *Curr. Surg.* 57:346-8.
- Shkenderov S., Todorov S. (1979) [Effect of bee venom and its low- and high-molecular fractions on embryogenesis in rats] [Article en bulgare]. *Eksp. Med. Morfol.* 18:160-165. Cité par Langley, 2004.
- Tobin T., Harkins J.D., Van Meter P.W., Fuller T.A. (2004) The Mare Reproductive Loss Syndrome and the Eastern Tent Caterpillar II: A Toxicokinetic/Clinical Evaluation and A Proposed Pathogenesis: Septic Penetrating Setae. *Intern. J. App. Res. Vet. Med.* 2: 142-58.
- Williamson J.A., Callanan V.I., Hartwick R.F. (1980) Serious envenomation by the Northern Australian box-jellyfish (*Chironex fleckeri*). *Med. J. Aust.* 1:13-6.
- Winkel K.D., Hawdon G.M., Fenner P.J., Gershwin L.A., Collins A.G., Tibballs J. (2003) Jellyfish Antivenoms: Past, Present, and Future. *J. Toxicol., Toxin Reviews* 22:115-27.
-

Reprotoxicité des venins de Vertébrés

Nicole PAGES^{1,2*}, Françoise GOUDEY-PERRIERE², Claude PERRIERE²

¹ Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, 74 Route du Rhin, 67400 Illkirch Graffenstaden ; ² Laboratoire de Biologie animale appliquée, Faculté de Pharmacie, 3 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

* Auteur correspondant ; Fax : 33 (0)1 60 19 01 31 ; Courriel : nicole.pages4@hotmail.fr

Résumé

En dehors de celle des serpents, la reprotoxicité des venins de Vertébrés est mal connue car le nombre d'accidents survenant chez la femme enceinte est faible et les recherches effectuées chez l'animal ou in vitro sont rares. Une morsure de serpent n'est jamais anodine, en particulier en cours de grossesse ; elle peut induire des symptômes systémiques sévères, des avortements ou des morts in utero chez la mère et de graves malformations chez le fœtus, en fonction de divers paramètres (nature et quantité de venin injecté, site de la morsure, état général et trimestre de gestation de la femme ...). Le traitement est toujours symptomatique, si besoin complété par un antivenin dont l'innocuité sur la gestation est discutée. Cette lacune devrait donner lieu à expérimentation mais il est vrai que pour sauver le fœtus, il faut d'abord que la mère vive. Les informations sont encore plus rares pour les poissons. Un travail récent fait état de la toxicité de la petite vive chez la souris piquée avant ou pendant la gestation, avec une perturbation de la fertilité et du comportement maternels, des résorptions et des morts in utero, des malformations fœtales (queue, pattes), et une perturbation de la croissance corporelle des petits après sevrage. Enfin, in vitro, le venin d'ornithorynque relaxe l'utérus de cobaye.

Vertebrate venom reprotoxicity

With exception of snake envenomation, vertebrate venom reprotoxicity is poorly known because the number of accidents occurring in pregnant women is low and the animal or in vitro experiments are scarce. A snake bite is never harmless, mainly during pregnancy ; it may induce maternal severe systemic effects, abortions or deaths in utero and huge malformations in foetuses, according to various parameters (venom type and amount, bite site, general state and pregnancy trimester of dams...). Treatment is always symptomatic and sometimes uses antivenom, the reprotoxicity of which is discussed. This gap would give rise to experimentation, but it is true that "who wants to save the foetus must first save the mother". Data are still more limited in fishes. A recent work on venom from the weaverfish in mice, injected before or during gestation, showed maternal fertility and behaviour alterations, abortions or death in utero, foetal malformations (tail, limbs), together with a slow body weight gain of the young mice after weaning. Finally, in vitro, venom from the platypus was shown to relax the guinea pig uterus.

Keywords : *Venom, reprotoxicity, embryotoxicity, antivenom, snake, fish, mammal.*

Introduction

Tout stress violent intervenant au cours de la gestation peut avoir des conséquences sévères chez les femmes enceintes. C'est le cas d'une morsure de serpent qui inspire généralement une terreur majeure à sa victime ou d'une piquûre, souvent très douloureuse, de poisson. En outre, le venin en lui-même peut être redoutable pour la mère (effet local ou systémique pouvant aboutir à la mort) ou le fœtus (effet direct, quand le venin franchit la barrière fœto-placentaire, ou effet indirect lié aux perturbations de l'homéostasie maternelle et pouvant provoquer la mort du fœtus ou l'apparition de malformations majeures souvent incompatibles avec la vie). Lorsque l'intoxication est sévère, le recours à un antivenin est la règle, alors que des envenimations peu sévères sont traitées symptomatiquement en service hospitalier. En effet, si la survie du fœtus est conditionnée à celle de sa mère, et justifie donc l'emploi de l'antivenin, il semblerait que certains antivenins au moins soient eux-mêmes responsables de

toxicité fœtale. Tous les auteurs ne sont pas d'accord sur ce point, ce qui complique encore l'interprétation des rares données disponibles sur le sujet. Les études de reprotoxicité des venins de serpents sont les plus nombreuses mais très hétérogènes et nous avons essayé d'en faire une synthèse la plus complète possible. Nous rapportons aussi un travail personnel réalisé sur la petite vive, un poisson commun de nos côtes, qui est extrêmement dangereux chez la souris gestante, y compris à long terme. Ceci nous conduit à regretter que le suivi de femmes piquées pendant leur grossesse n'ait pas été réalisé. Enfin, nous avons trouvé un travail réalisé sur le venin d'ornithorynque *in vitro* sur utérus isolé.

Venins de poissons

Nous avons récemment rapporté qu'une seule dose, non létale, de venin dorsal ou operculaire de petite vive (*Echiichthys vipera*), administré avant ou pendant la gestation, pouvait avoir de graves conséquences pour la

mère et ses petits (Goudey-Perrière *et al.*, 2007). Ainsi, l'injection, avant l'accouplement, d'une seule dose de venin d'*E. vipera* lyophilisé à 154 souris femelles a provoqué :

- Chez la mère, une baisse significative des accouplements (65% après 3 semaines, 86% après 60 jours) au lieu de 100% chez les témoins après 8 jours. En outre, les femelles ont souvent présenté, après la mise-bas, un comportement anormal avec de fréquents rejets des petits hors du nid et un cannibalisme important.
- Chez les petits, une *embryo-foetotoxicité* et une *tératogénicité* portant essentiellement sur la queue et les pattes. Beaucoup (46%) sont morts dans le mois suivant leur naissance. La croissance pondérale des souriceaux a été ralentie, après sevrage, par le venin operculaire qui avait été injecté à la mère. Cet effet tardif pourrait être dû à une altération de leur comportement alimentaire lié à une *atteinte neurologique*, acquise au cours du développement et se manifestant tardivement.

Ces effets ne semblent pas liés à la fraction létale, l'échichtine, très dégradée par la lyophilisation.

Le même type d'observations a été réalisé après injection, dans les conditions précédentes, de venin fraîchement prélevé : près de 50% des femelles ne se sont pas accouplées et sur les 72 petits dont les mères avaient reçu du venin operculaire, 4 présentaient une anourie (5,5%) et 8 des nécroses de la queue (11%).

L'extrapolation à l'espèce humaine n'est, bien sûr, pas possible, mais il serait intéressant de suivre le devenir de femmes enceintes ou susceptibles de l'être, lorsqu'elles sont piquées par un poisson.

Venins de serpents

Les serpents venimeux appartiennent à trois familles (Tableau 1). Leur venin est un mélange complexe d'enzymes (hyaluronidase, phospholipases, protéinases, cholinestérases, phosphatases), de toxines polypeptidiques de faible poids moléculaire et de substances non toxiques variées (métaux, glucides, lipides,

aminoacides libres, nucléotides et amines biogènes) (Pantanovitz et Guidozi, 1996 ; Nasu *et al.*, 2004). La proportion relative de chaque composant du venin conditionne le tableau clinique (Russell, 1967 ; Tableau 1). De plus, les symptômes et la sévérité de l'envenimation peuvent être aggravés par des substances libérées par la victime, comme l'histamine (Russell, 1973). Enfin, les symptômes peuvent varier d'une espèce à l'autre, à l'intérieur d'une même famille :

- Les venins cytotoxiques se fixent au niveau de la morsure et provoquent un oedème local important et des dommages tissulaires.
- Les venins neurotoxiques altèrent la conduction nerveuse et bloquent les jonctions neuromusculaires. Les signes initiaux associent somnolence, hypersalivation, sudation, spasmes musculaires et paresthésies faciales ; les symptômes plus spécifiques d'une atteinte des nerfs crâniens leur succèdent, telle la dramatique paralysie progressive des muscles respiratoires.
- Les anomalies hématologiques sont attribuées à différents anticoagulants, procoagulants, fibrinolytiques, hémolysines, etc... (Lakier et Fritz, 1969 ; Hutton et Warrell, 1993). Les saignements externes, muqueux et internes peuvent évoluer progressivement vers une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), pouvant conduire à une insuffisance circulatoire et rénale (Lakier et Fritz, 1969). Les médecins doivent savoir que par suite d'une fibrinolyse réduite, la coagulation augmente au cours de la grossesse, rendant les femmes enceintes particulièrement sensibles à la CIVD. L'hypercoagulation peut aussi entraîner un hématome rétroplacentaire (*abruptio placentae*) (Zugaib *et al.*, 1985). La rupture du placenta serait liée à des dépôts de fibrine et à la formation de microthrombi au niveau de l'endomètre (Zugaib *et al.*, 1985). Si une coagulopathie apparaît après morsure de serpent, il ne suffit pas de remplacer les composants du sang (Reid *et al.*, 1963) : il faut administrer un antivenin approprié (Dumavidhat *et al.*, 1989 ; Pantanowitz et Guidozi, 1996).

Tableau 1. Classification et toxicité des principaux serpents venimeux (d'après Pantanowitz et Guidozi, 1996 ; Ringwald, 2001 ; Chippaux, 2002 ; Nasu *et al.*, 2004).

Table 1. Classification and toxicity of the main venomous snakes.

Familles	Espèces	Principaux effets toxiques
Elapidae	<i>Naja</i> (cobras), <i>Dendroaspis</i> (mambas), serpents corail, <i>Bungarus</i> (bongares ou kraits), la plupart des serpents australiens. Hydrophidés (marins)	- Neurotoxicité → paralysie respiratoire - Toxicité cardio-vasculaire, hypotension - Altération des cellules, tissus et organes (reins, etc ...) - Nécroses - Myotoxité et néphrotoxicité des Hydrophidés
Viperidae Viperinae Causinae	<i>Vipera</i> , <i>Bitis</i> (<i>B. arietans</i> ; <i>B. gabonica</i>), <i>Cerastes</i> , <i>Echis</i> , <i>Causus</i>	- Hématotoxicité : action coagulante ou anticoagulante - Perméabilité accrue des vaisseaux sanguins provoquant l'extravasation des électrolytes, de l'albumine et des hématies dans le site envenimé (et dans les poumons, le myocarde, les reins, le péritoine et rarement le système nerveux central) ou une hémolyse - Œdèmes (provoquant une asphyxie si la morsure est faite sur le visage ou le cou) - Nécroses
Viperidae Crotalinae	<i>Crotalus</i> , <i>Bothrops</i> , <i>Lachesis</i> , <i>Agkistrodon</i> , <i>Calloselasma</i>	- Altération des vaisseaux sanguins provoquant des hémorragies - Nécroses - Inflammation - Hématotoxicité - Parfois, neurotoxicité (<i>Crotalus durissus</i>)
Colubridae	<i>Dispholidus typus</i> (boomslang) <i>Thelotornis</i>	- Paralysie du système respiratoire parfois signalée (<i>Malpolon</i> , <i>Boiga</i>). - Altération des vaisseaux sanguins provoquant des hémorragies - Toxicité cardio-vasculaire, hypotension - Salivation intense pouvant provoquer un étouffement

La présence d'un procoagulant dans les venins de serpents de la sous-famille des Crotalinae est responsable de 43% de morts fœtales et de 10% de mortalité maternelle (Dunniho et al., 1992).

Morsure de serpent chez la femme enceinte

Les conséquences d'une morsure de serpent chez la femme enceinte sont très mal connues car moins de 100 cas ont été rapportés dans la littérature (Tableau 2 ; Dunniho et al., 1992 ; Pantanowitz et Guidozzi, 1996 ; Langley, 2004). On sait cependant qu'elles peuvent provoquer la mort du fœtus et/ou celle de la mère. Le pronostic est d'autant moins bon que la grossesse est précoce, que la morsure est grave et que la mise en place d'un traitement adapté est tardive.

Plusieurs classifications ont été proposées pour apprécier la gravité de l'envenimation, telle celle de Downey et al. (1991) qui prend en compte la taille de l'œdème autour de la morsure et la présence ou non de signes systémiques ; elle permet d'établir 5 stades ou « grades » allant de 0 à 4 et de gravité croissante. Les grades 3 et surtout 4 sont ceux qui mettent le plus en cause le pronostic vital du fœtus. Globalement, ces grades dépendent de la nature du venin, de la localisation (les morsures de la face et du cou étant les plus graves), de la profondeur, du nombre de morsures, de la quantité de venin injectée et de la taille du serpent (les jeunes serpents seraient plus dangereux). Ils sont aussi fonction de la susceptibilité propre de la victime, de son état de santé ...

Le délai séparant la morsure de la mise en place d'un traitement est également critique. Il s'agit d'une urgence médicale qui doit tenir compte non seulement du site de la morsure mais aussi des multiples organes ou systèmes atteints (Gold et Wingert, 1994). L'évolution très imprévisible du syndrome d'envenimation nécessite un monitoring très suivi de la patiente et du fœtus et une prise en charge médicale adaptée, si possible par des spécialistes, réanimateurs et obstétriciens (Dart et McNally, 2001 ; Gold et al., 2002 ; Sebe et al., 2005). Le traitement, symptomatique, ne sera pas développé dans la présente revue. Disons simplement qu'il fait appel aux mesures classiques de réanimation et à une prophylaxie antitétanique. L'état de choc, en particulier, doit être rapidement traité afin d'assurer une bonne oxygénation des tissus maternels et fœtaux. L'utilisation de sérums antivenimeux est considérée par certains comme une règle car « pour sauver le fœtus, il faut d'abord sauver la mère » (James, 1985) mais elle est discutée et varie selon les pays (Chang et al., 2006). Elle impose mûre réflexion pour plusieurs raisons : (i) il n'est pas utile, dans la plupart des cas bénins ou modérés, d'avoir recours aux antivenins monovalents ou polyvalents, produits par le cheval, car ils peuvent déclencher des chocs anaphylactiques ou une maladie sérique (*serum sickness*) chez la mère, préjudiciables au fœtus. Cependant, la mise au point de fragments Fab, beaucoup moins allergisants permet d'obtenir une réversion relativement rapide des symptômes, y compris des contractions utérines, avec beaucoup moins d'effets secondaires (James, 1985 ; Clark et al., 2002 ; Chang et al., 2006 ; Kravitz et Gerardo, 2006) ; (ii) il a été observé un peu plus de morts *in utero* après utilisation d'antivenin que dans les traitements classiques (Dunniho et al., 1992 ; Pantanowitz et Guidozzi, 1996). Mais comme l'utilisation d'antivenin se fait souvent lors d'envenimations sévères, les parts respectives attribuables à la gravité de l'envenimation et à l'antivenin sont encore bien floues. Cette lacune est très regrettable et devrait être précisée sur l'animal de

laboratoire. En général, lorsque les patientes présentent des signes systémiques, l'utilisation d'antivenins s'impose. Cette attitude est justifiée car les atteintes fœtales (avortement spontané, mort intra-utérine ou malformations) sont directement liées à la gravité de l'envenimation maternelle (Malz, 1967) ; (iii) le thimerosol, un organo-mercuriel utilisé comme agent conservateur dans les antivenins présenterait des risques de complications nerveuses (Chang et al., 2006) ; il est cependant plutôt présent dans les vaccins, la plupart des antivenins contenant du crésol et du phénol dont la toxicité est moindre, même aux doses élevées d'antivenin parfois utilisées (Chippaux, communication personnelle).

- La mort de la mère est généralement attribuée à un syndrome d'hypotension en décubitus dorsal (*supine hypotension syndrome*) (Sutherland et al., 1982 ; Dunniho et al., 1992) ou à un hématome rétroplacentaire (*abruptio placentae* ; Zugaib et al., 1985).
- Les avortements spontanés sont fréquents et concernent environ 43% des femmes enceintes envenimées (Dunniho et al., 1992) ; ils s'accompagnent de pertes de sang modérées (Reid et al., 1963). Les mécanismes en cause incluraient l'anoxie consécutive à l'état de choc, les contractions utérines et les saignements du placenta ou de la paroi utérine provoqués par le venin (Osman et Gumaa, 1974 ; Gold et Wingert, 1994 ; Pantanowitz et Guidozzi, 1996). L'hyperthermie, probablement liée aux dommages tissulaires, pourrait également y participer. On ignore si l'administration d'agents tocolytiques pourrait éviter l'avortement (Gold et Wingert, 1994).
- L'avortement ou la mort du fœtus *in utero* sont particulièrement fréquents lorsque la mère est mordue au cours du premier trimestre de grossesse (Parrish et Khan, 1996) et jusqu'à la vingtième semaine (Dunniho et al., 1992 ; Pantanowitz et Guidozzi, 1996 ; Seneviratne et al., 2002) et qu'elle a présenté en plus de signes loco-régionaux (douleur et œdème au point d'injection s'étendant à tout le membre atteint et lymphoedème hémorragique), des signes systémiques (hypotension, bradycardie, syncopes ou vertiges, fièvre, ganglions, nausées et vomissements, et plus rarement CIVD, atteintes rénale ou sanguine, œdème généralisé, convulsions).
- En plus des effets abortifs, le venin peut aussi traverser le placenta et causer une intoxication systémique du fœtus, se traduisant par un ralentissement des mouvements fœtaux et une disparition progressive des battements cardiaques, alors que la mère ne présente pas de signes d'envenimation (James, 1985). Il peut aussi provoquer des retards de croissance ou des effets tératogènes allant de malformations plus ou moins sévères à la mort du fœtus ou du nouveau-né (Pantanowitz et Guidozzi, 1996 ; Gold et al., 2002). Il existe quelques exemples de fœtus parvenus à terme malgré une envenimation grave de la mère, mais leurs anomalies étaient telles (hydrocéphalie et multiples autres malformations) que la mort est intervenue peu de temps après la naissance (Tableau 2).

Le venin peut agir directement sur le fœtus ou par l'intermédiaire des altérations biologiques maternelles. La présence de désintégrines dans les venins de serpents a été mise en évidence il y a une vingtaine d'années (Gould et al., 1990 ; Scarborough et al., 1993 ; Weskamp et Blobel, 1994) : ces petits peptides se lient avec une très grande affinité aux intégrines,

exprimées à la surface des cellules et nécessaires aux communications inter-cellulaires, à leur adhésion et à la signalisation cellulaire (Hynes, 1987 ; Ruoslahti, 1991). Les intégrines sont de ce fait très impliquées dans un développement embryonnaire et fœtal harmonieux (Yamada, 1991). Leur inhibition par les venins altère donc le développement embryonnaire (Musial *et al.*, 1990 ; Rucinski *et al.*, 1990 ; Soszka *et al.*, 1991 ; Galan *et al.*, 2005). Cependant diverses atteintes maternelles peuvent aussi concourir plus ou moins directement à la mort du fœtus : le stress majeur de la

mère lors de la morsure, une hypotension qui peut entraîner un déséquilibre acido-basique préjudiciable au fœtus ainsi qu'une mauvaise irrigation foeto-placentaire, des troubles sanguins (hyper- ou hypo-coagulation) pouvant aboutir à un hématome rétroplacentaire, un choc anaphylactique à l'antivenin ou encore une insuffisance rénale aiguë. Les données du *Tableau 2* ont été analysées dans les *Tableaux 3, 4 et 5* (influence du trimestre de grossesse et de l'usage d'antivenin sur la gestation, dangerosité des différentes familles de serpents).

Tableau 2. Devenir de la mère et du fœtus après morsure par différents serpents. Le trimestre de grossesse, la présence de signes systémiques et l'utilisation d'antivenin sont précisés lorsqu'ils ont pu être retrouvés.

Table 2. Maternal and foetal outcomes after various snake bites. The pregnancy trimester, existence of systemic symptoms and use of antivenom were indicated when available.

Serpent	Nombr e de cas	Trimestre concerné	Signes systémiques	Antivenin	Mort de la mère	Devenir du fœtus	Référence
Viperinae							
<i>Echis carinatus</i>	1	2	Oui	?	Oui	Mort	Singh, 1925
	3	?	Oui	°°	non	2 avortements 1 mort <i>in utero</i>	Bhat, 1974
Vipère (non précisé)	1	1	Oui	*	Non	Graves malforma- tions, mort à J4	Malz, 1967
	1	1	Oui	***	Non	Avortement	
	1	1	Oui	**	Non	Vivant	
	1	1	Oui	Non	Non	Vivant	
<i>Vipera palestinesis</i>	1	3	Non	*	Non	Vivant	Malz, 1967
Vipère (non précisé)	1	3	?	?	Oui	Mort (<i>abruptio placentae</i>)	Chugh <i>et al.</i> , 1983
Vipère (non précisé)	1	?	Oui	**	Oui (NB)	1 mort <i>in utero</i>	James, 1985
	1	3	Oui	**	Non	Vivant	
Adder non identifié	1	3	Discrets	Non	Non	Prématuré	McNally et Reitz, 1987
<i>Vipera lebetina obtusa</i>	1	3	Oui	**	Non	Prématuré	Sebe <i>et al.</i> , 2005
	1	3	Oui	***	Non	Vivant	
<i>Vipera ammodytes meridionalis</i>	1	2	Oui	***	Non	Vivant	
Probables Vipéridés (dont 2 identifiés)	4	2-3	Oui	Non	4 Oui	4 morts	Bambara <i>et al.</i> , 2006
	3	2-3	Oui	Non	Non	1 mort <i>in utero</i> 2 morts nés	
	3	2-3	Oui	Non	Non	1 prématuré; 2 vivants	
	1	2-3	Oui	Oui	Non	Vivant	
	4	2-3	?	Non	Non (Perdues de vue)	4 inconnus	
<i>Daboia russelli russelli</i>	2	1	Oui	****	Non	2 avortements	Seneviratne <i>et al.</i> , 2002
	4	2	Oui	***	Non	2 avortements, 1 malformé, 1 vivant	
	2	2	Non	Non	Non	2 vivants	
	1	3	Oui	***	Non	Vivant	
Crotalinae							
<i>Bothrops jararaca</i>	1	3	Oui	****	Non	Mort (<i>abruptio placentae</i>)	Zugaib <i>et al.</i> , 1985
<i>Bothrops asper</i>	1	3	Oui	** tardif	Non	Mort (<i>abruptio placentae</i>)	Otero <i>et al.</i> , 2002
<i>Bothrops sp.</i>	3	1	Non	?	Non	3 vivants	Pardal <i>et al.</i> , 1997
	1	2	Non	?	Non	Vivant	
	2	1	Oui	?	Non	2 vivants	
	1	2	Oui	?	Non	Mort <i>in utero</i> (<i>abruptio placentae</i>)	
<i>Calloselasma rhodostoma</i> (Malaisie)	5	?	Oui	?	Non	1 avorté, 4 vivants	Reid <i>et al.</i> , 1963
<i>Trimeresurus sp.</i>	1	1	Oui	****	Non	Vivant	Dumavidhat <i>et al.</i> , 1989
<i>Crotalus sp.</i>	1	2	Oui		Non	Vivant	Parrish et Khan, 1966
<i>Agkistrodon contortrix</i>	1	3	Non	*	Non	Vivant	
	1	2	Oui	**	Non	Vivant	
<i>Agkistrodon contortrix</i>	1	3	Oui	*	Non (choc anaphylactique)	Faible score à l'APGAR, hémorragie cérébrale, malfor- mation cardiaque, mort à J4	Entman et Moise, 1984

<i>Agkistrodon contortrix</i>	1	3	Non	Non	Oui	Vivant	Dunnihoo <i>et al.</i> , 1992
<i>Agkistrodon contortrix</i> (probable)	1	2	Non	Non	Oui	Vivant	
<i>Agkistrodon contortrix</i>	1	3	Oui	Oui	Non	Vivant	Kravitz et Gerardo, 2006
<i>Agkistrodon halys</i> <i>blomhoffii</i>	1	1	Oui	Non	Non	Mort <i>in utero</i>	Nasu <i>et al.</i> , 2004
<i>Hypnale hypnale</i> (Sri Lanka)	1	1	Oui	Non	Non	Avortement	Seneviratne <i>et al.</i> , 2002
	2	1	Non	Non	Non	2 vivants	
	7	2	Non	Non	Non	7 vivants	
	2	3	Oui	Non	Non	2 vivants	
2	3	Non	Non	Non	2 vivants		
<i>Elapidae</i>							
<i>Pseudonaja textilis</i>	1	3	Oui	?	Oui (<i>supine hypotension syndrome</i>)	Mort	Sutherland <i>et al.</i> , 1982
<i>Naja sp.</i>	2	3	Oui	**	Non	Vivants	James, 1985
<i>Bungarus ceylonicus</i>	1	1	Oui	***	Non	Avortement	Seneviratne <i>et al.</i> , 2002
	1	3	Oui	***	Non	Vivant	
<i>Non identifiés</i>							
	1	1	Oui (saignements)	Oui	Non	Avortement	Parrish et Khan, 1966
	1	1	Oui	**	Non	Avortement	Malz, 1967
	1	1	Non	**	Non	Vivant	
	1	1	Non	Non	Non	Prématuré	
	1	1	Non	Non	Non	Vivant	
	1	2	Non	*	Non	Vivant	
	2	2	Non	Non	Non	2 vivants	
	1	3	Oui	**	Non	Vivant	
	1	3	Non	Non	Non	Vivant	
	3	?	?	?	Oui	3 morts	Fauveau et Blanchet, 1989
	7	?	?	?	Non	?	Dao <i>et al.</i> , 1997
	1	?	?	?	Oui	Avortement	
	2	?	?	?	Non	2 morts <i>in utero</i>	Seneviratne <i>et al.</i> , 2002
	5	1	Oui	** - ***	Non	5 avortements	
	2	1	Non	Non	Non	Vivants	
	2	2	Oui	*	Non	Vivants	
	2	2	Non	Non	Non	Vivants	
1	3	Oui	**	Non	Vivant		
2	3	Non	Non	Non	Vivants		

Administration de sérum antivenimeux : * peu (2-10 mL) ; ** (20-60 mL) ; *** (80-120 mL) ; ****(300 mL) ; °° quantité inconnue.

NB : mort attribuée à une prise en charge médicale trop tardive.

Tableau 3. Répartition des intoxications graves, des traitements antivenimeux, et des morts maternelle et fœtales.

Table 3. Repartition of severe envenomations, antivenom therapy, and maternal or foetal deaths.

Trimestre	1	2	3
Nombre de grossesses	28	27	24
Signes systémiques	20 (75%)	18 (66%)	15 (62%)
Antivenin	20 (75%)	14 (52%) ; 4 ?	15 (62%) ; 2 ?
Mort de la mère	0 (0%)	1 (4%)	2 (8%)
Mort des petits	13 (46%) ; 1 prématuré	6 (22%) ; 2 malformés	5 (21%) ; 2 prématurés

Tableau 4. Familles de serpents impliquées dans les envenimations sévères.

Table 4. Snake families involved in severe envenomation.

Espèces en cause dans les envenimations graves	Mort de la mère	Mort fœtale
Elapidae	1/5 (20%)	2/5 (40%)
Viperidae, Viperinae	7/40 (18%)	18 / 40 (45%)
Viperidae, Crotalinae	2/37 (5%)	4/37 (11%)

Injection de venin chez l'animal de laboratoire

Vipéridés, Viperinae

L'administration sous-cutanée (SC) de la DL₅₀ de venin de *Vipera aspis* (200 µg) à des souris gravides entraîne

diverses malformations fœtales majeures dont la gravité varie en fonction du jour de l'envenimation (test pratiqué chronologiquement de J4 à J15 de la gestation). Les anomalies suivantes ont été observées le jour du sacrifice:

- Augmentation très importante du nombre de résorptions, souvent même de la portée entière : c'est le cas chez deux tiers des femelles traitées jusqu'à J7, la moitié de celles traitées entre J8 et J9, moins d'un quart de celles envenimées après J10. Un traitement en fin de gestation (à partir de J15) provoque toujours une mise bas prématurée.
- Diminution significative du nombre de petits par portée, en particulier chez les femelles envenimées à J7 et J8.
- Diminution du poids moyen de l'ensemble des fœtus (-40% à J7 et J8 ; -30% entre J9 et J11 ; -20% entre J12 et J15).
- Microcéphalie (liée à un développement insuffisant des hémisphères cérébraux) chez tous les embryons

(-40% à J7 et J8 ; -30% entre J9 et J11 ; -20% entre J12 et J15). Le poids relatif des cerveaux (rapporté au poids corporel) est également significativement réduit (-24% à J7 et J8 ; -13,8% entre J9 et J11 ; -7% entre J12 et J15) (Clavert et Gabriel-Robez, 1973).

- Malformations majeures de la face : l'envenimation à J7 et J8 provoque respectivement 3 et 14% d'anencéphalies et 2,3 et 11,4% d'arrhinencéphalies (absence de bulbe olfactif). Presque tous les types de malformations faciales sont observés, mais à des fréquences moins élevées. L'action du toxique pendant cette période perturbe donc la neurulation (fermeture du neuropore) et provoque de graves malformations morphogénétiques de l'extrémité céphalique (Clavert et Gabriel-Robez, 1971).

Tableau 5. Influence de la thérapie antivenimeuse sur la survie fœtale.

Table 5. Influence of antivenom therapy on foetal survey.

Antivenin dans les cas graves (74 fœtus en tout)	Utilisé		Non utilisé	
	Survie	Mort	Survie	Mort
	21 (28,3%)	18 (24,3 %)	31 (41,9%)	4 (5,4 %)
Trimestre 1	5	11	6	2
Trimestre 2	4	4	14	0
Trimestre 3	12	3	9	0
Sur 4 cas graves			2	2

NB : est considéré mort, tout fœtus non parvenu à la vie (avortement, mort *in utero*, mort né et mort postnatale).

La morsure d'une vipère (sans plus de précision) au cours du premier trimestre de grossesse a conduit à des malformations majeures, en particulier une hydrocéphalie, incompatibles avec la vie (Malz, 1967) ; celle d'une vipère de Russell au deuxième trimestre a également donné lieu à une hydrocéphalie et une polydactylie (Seneviratne *et al.*, 2002) ; celle d'un *Crotalinae* (*Agkistrodon contortrix*) au cours du troisième trimestre a tellement altéré le cœur et le cerveau que le bébé est mort peu après sa naissance. Les trois cas d'hématome rétroplacentaire (*abruptio placentae*) dont l'un a tué la mère, concernent des femmes mordues au deuxième (1 cas) et troisième (2 cas) trimestres. Le seul syndrome d'hypotension en décubitus dorsal (*supine hypotension syndrome*) qui a tué la mère a été observé après morsure au troisième trimestre (Tableau 2). Par ailleurs, il apparaît que la gravité des envenimations qui justifie l'emploi d'antivenin est à peu près la même quel que soit le trimestre de grossesse concerné, que les mères semblent survivre plus facilement lorsqu'elles sont mordues au premier trimestre mais qu'en revanche leurs fœtus meurent en beaucoup plus grand nombre (nombreux avortements) (Tableau 3). Ce résultat est en accord avec les travaux de Malz (1967) ou Nasu *et al.* (2004), par exemple. On note aussi la forte mortalité de fœtus dont les mères ont été mordues par des vipéridés, dont les venins sont hématotoxiques (Tableau 4). Enfin, le Tableau 5 souligne l'ambiguïté de l'emploi des antivenins (tout type d'antivenins confondus). Sur 74 femmes envenimées, 39 ont reçu un antivenin et 18 (46,1%) d'entre elles ont perdu leur fœtus. A trois exceptions près, toutes présentaient des signes d'atteinte systémique. En l'absence d'antivenin (35 cas), la mortalité est très faible (5,7%) mais correspond à des envenimations sans signes systémiques à l'exception de 4 mères gravement envenimées dont deux ont perdu leur bébé. Compte tenu des rares cas décrits, il est très regrettable de ne pas pouvoir utiliser toutes les observations disponibles (parmi lesquelles il apparaît beaucoup de mortalité fœtale) mais les imprécisions concernant le trimestre de la grossesse et l'emploi ou non d'antivenin nous y ont contraints.

- A partir de J11, le nombre de fentes palatines augmente significativement.
- Quelle que soit la date de l'envenimation, le venin provoque aussi, chez 3% (J7) à 14% (J14) des fœtus, des hémorragies conduisant à des hématomes dans de nombreux organes et tissus. Les hémorragies portant sur les pattes sont tellement sévères qu'elles provoquent des amputations chez 2 à 3 % des petits dont la mère a été envenimée entre J11 et J14. Les hémorragies internes graves peuvent entraîner la mort des fœtus quand elles se produisent dans des organes vitaux (système nerveux, cœur). Ces effets, observés pendant toute la durée de la gestation, et imputables aux effets du venin sur la coagulation, suggèrent un effet direct du venin sur le fœtus.
- Des anomalies cardiaques sont observées seulement quand la mère a été traitée à J7 et surtout à J8 (Clavert et Gabriel-Robez, 1974 ; Gabriel-Robez et Clavert 1980).

Vipéridés, *Crotalinae*

L'injection à J8 de 0,24 mg de venin de *Bothrops jararaca* à des souris gestantes, augmente la fréquence

des résorptions et perturbe, chez la mère, le tissu décidual et la coagulation (Spadacci-Morena *et al.*, 2006).

L'administration à des lapines gestantes d'Arwin® (fraction active défibrinante du venin du crotale *Calloselasma rhodostoma*), au début de l'organogénèse provoque de nombreuses résorptions et morts *in utero*. Administré à la souris gestante de J11 à J15 de la gestation, l'Arwin® induit également de nombreuses morts fœtales (Penn *et al.*, 1971, cité par Langley, 2004).

Elapidés

L'injection intramusculaire (IM) de venin de *Naja nigricollis* (3 injections de 0,3 µg à J12, J14 et J16) à des souris gravides est particulièrement dangereuse dans les premiers jours de la gestation et provoque de graves atteintes fœtales (Mohamed *et al.*, 1974 ; 1975). En revanche, une envenimation plus tardive peut provoquer une atteinte directe des tissus fœtaux en cours de développement (atteintes hépatiques et myocardiques, congestion des vaisseaux pulmonaires, extravasation de sang dans la lumière intestinale)

(Mohamed *et al.*, 1974). Comme le système nerveux central (SNC) est très sensible à l'hypoxie et à l'acidose métabolique qui en découle, il n'est pas étonnant que les mouvements fœtaux cessent dans ces conditions (Nawar, 1980).

Administrée à la souris gestante au moment de la fermeture du tube neural, une faible dose (0,15 µg, 1/65 DL₅₀) de venin de *Naja haje* induit une atrophie généralisée (épaisseur diminuée et augmentation de la taille des ventricules) (Nawar, 1980).

L'injection de 2 µg de venin de *Naja* à des oeufs de poule embryonnés est embryotoxique et tératogène. La mortalité augmente au cours du temps pour atteindre 69% à J11. En revanche, le pourcentage de fœtus malformés diminue passant de 22% à J7 à 10% à J11. Certaines anomalies (ectopie cardiaque, anouries) sont observées surtout jusqu'à J7, ce qui suggère la mort des fœtus atteints, alors que d'autres anomalies augmentent au cours du temps (coelosomie, exencéphalie, anophtalmie) (Ruch et Gabriel-Robez-Kremer, 1962). Souvent, plusieurs anomalies sont présentes chez le même fœtus. Le venin de *Naja* s'est révélé particulièrement redoutable pour la morphogenèse cardiaque (graves altérations de la forme et du cloisonnement du cœur) (Ruch et Gabriel-Robez-Kremer, 1963). Des doses encore plus faibles (0,07 µg) perturbent le développement du SNC : administré à des embryons de poulet explantés, le venin de *Naja* provoque après 24 h la non-fermeture du tube neural (attribuée à une prolifération anormale de fibroblastes dans la lumière du tube neural), l'absence de formation des vésicules optiques dans le cerveau et la suppression des somites (Ahmed *et al.*, 1974).

Effet des venins de serpents *in vitro*

Les venins peuvent agir sur le muscle utérin soit directement soit en libérant ou en potentialisant l'action de bradykinines (Langley, 2004). Ils peuvent ainsi provoquer un travail prématuré en induisant des contractions. C'est le cas des venins de la vipère heurtante, *Bitis arietans* (Osman et Gumaa, 1974), *Crotalus viridis viridis* (Komori *et al.*, 1988), *Crotalus ruber ruber* (Mori et Sugihara, 1988), *Dendroaspis angusticeps* (Wangai *et al.*, 1981), *Bothrops jararacussu* (Andriao-Escarso *et al.*, 1999) et *Ophiophagus hannah* (Gomes *et al.*, 2001). Par ailleurs des fractions du venin de *Naja nigricollis* peuvent aussi, en altérant directement la structure du placenta, perturber la gestation (Nawar *et al.*, 1989).

Venin de Mammifères

Les Mammifères sont rarement venimeux. Mais l'ornithorynque (*Ornithorhynchus anatinus*) est un Mammifère particulier puisqu'il pond des œufs et que le mâle porte sur ses pattes postérieures un éperon creux relié à une glande à venin qui n'est active que pendant la période des amours. Leurs soigneurs sont parfois piqués. Ce venin exerce une activité myorelaxante sur l'utérus de ratte préalablement contracté par 5 mM de KCl (Plater *et al.*, 1995). Cette relaxation est inhibée par l'apamine, ce qui pourrait indiquer que le venin active un canal K(Ca).

Conclusion

Cette revue fait apparaître combien la reprotoxicité des venins de Vertébrés et celle des antivenins correspondants est mal connue, ce qui justifierait des

recherches sur l'animal et un effort collectif de recueil de données chez les femmes enceintes envenimées, à travers le Monde.

Références bibliographiques

- Ahmed Y.Y., Noor-El-Din M., Mohamed A.H., Moustafa F.A. (1974) Effect of cobra venom on the chick embryo. *Toxicon* 12:325-6.
- Andriao-Escarso S.H., Soares A.M., Rodrigues V.M., Angulo Y., Díaz C., Lomonte B., Gutiérrez J.M., Giglio J.R. (1999) Isolation and characterization of an arginine ester hydrolase from *Bothrops jararacussu* venom which induces contractions of the isolated rat uterus. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47:699-706.
- Bambara M., Rouamba A., Dao B., Bonkougou P., Ouattara H., Lankoande J., Kone B. (2006) Morsure de serpents et grossesse. A propos de quinze cas à la maternité du centre hospitalier national Sanou Souro de Bobo-Dioulasso (Burkina faso). *Louvain Med.* 125:45-50.
- Bhat R.N. (1974) Viperine snakebite poisoning in Jammu. *J. Indian Med. Assoc.* 63:383-92.
- Chang C.G., Jaynes C., Fernandez M.C., Hougen S.T. (2006) Pit viper envenomation in pregnancy: a case report and literature review. *J. Emerg. Med.* 30:167-9.
- Chippaux J.P. (2002) Venins de serpents et envenimations. IRD éditions, collection Didactiques, Paris, 288p.
- Chugh K.S., Singhal P.C., Kher V.K., Gupta V.K., Malik G.H., Narayan G., Datta B.N. (1983) Spectrum of acute cortical necrosis in Indian patients. *Am. J. Med. Sci.* 286:10-20.
- Clark R.F., McKinney P.E., Chase P.B., Walter, F.G. (2002) Immediate and delayed allergic reactions to Crotalidae polyvalent immune Fab (ovine) antivenom. *Ann. Emergency Med.* 39:671-6.
- Clavert J., Gabriel-Robez O. (1971) Anomalies de la face déterminées chez l'embryon de souris par l'injection de venin de vipère (*Vipera aspis*) à la femelle gestante. *Bull. Assoc. Anat. Paris* 151:298-302.
- Clavert J., Gabriel-Robez O. (1973) Anomalies de l'encéphale déterminées chez l'embryon de souris par l'injection de venin de vipère (*Vipera aspis*) à la femelle gestante. *Bull. Assoc. Anat. Paris* 157:213-217.
- Clavert J., Gabriel-Robez O. (1974) The effects on mouse gestation and embryo development of an injection of viper venom (*Vipera aspis*). *Acta Anat.* 88:11-21.
- Dao B., Da E., Koalaga A.P., Bambara M., Bazie A.J. (1997) snake bite during pregnancy. *Med. Trop. (mars)*, 57:100-1.
- Dart R.C., McNally J. (2001) Efficacy, safety, and use of snake antivenoms in the United States. *Ann. Emerg. Med.* 37:181-8.
- Downey D.J., Omer G.E., Moneim M.S. (1991) New Mexico rattlesnake bites; demographic review and guidelines for treatment. *J. Trauma.* 31:1380-6.
- Dumavidhat B., Visudhiphan S., Malasit P. (1989) Severe cases of Green Pit Viper snake venom poisoning. *J. Med. Assoc. Thailand* 72:593-6.
- Dunniho D.R., Rush B.M., Wise R.B., Brooks G.G., Otterson W.N. (1992) Snakebite poisoning in pregnancy. A review of the literature. *J. Reprod. Med.* 37:653-8.
- Entman S.S., Moise J.J. (1984) Anaphylaxis in pregnancy. *South Med J.* 77:402.
- Fauveau V., Blanchet T. (1989) Death from injuries and induced abortion among rural Bangladeshi women. *Soc. Sci. Med.* 29:1121-7.
- Gabriel-Robez O., Clavert J. (1980) Teratogenic and lethal properties of the various fractions of venom of the viper, *Vipera aspis*. *Acta Anat. (Basel)* 108:226-9.
- Galan J.A., Sanchez E.E., Bashir S., Perez J.C. (2005) Characterization and identification of disintegrins in *Crotalus horridus* venom by liquid chromatography and tandem matrix-assisted laser desorption ionization - quadrupole ion trap time-of-flight (MALDI-QIT-TOF) mass spectrometry. *Can. J. Chem.* 83:1124-31.

- Gold B.S., Dart R.C., Barish R.A. (2002) Bites of venomous snakes. *N. Engl. J. Med.* 347:347-56.
- Gold B.S., Wingert W.A. (1994) Snake venom poisoning in the United States: a review of therapeutic practice. *South Med. J.* 87:579-89.
- Gomes A., De P., Dasgupta S.C. (2001) Occurrence of a unique protein toxin from the Indian King Cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. *Toxicon* 39:363-70.
- Goudey-Perrière F., Pagès N., Perrière C. (2007) Reprotoxicité du venin de petite vive, *Echiichthys vipera* (Trachinidae). In *Toxines émergentes: nouveaux risques*, Lavoisier ed., 179-84.
- Gould R.J., Polokoff M.A., Friedman P.A. et al. (1990) Disintegrins: A family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 195:168-71.
- Hutton R.A., Warrell D.A. (1993) Action of snake venom components on the hemostatic system. *Blood Rev.* 7:176-89.
- Hynes R.O. (1987) Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-54.
- James R.F. (1985) Snakebite in pregnancy. *Lancet* 2:731.
- Komori Y., Nikai T., Sugihara H. (1988) Biochemical and physiological studies on a kallikrein-like enzyme from the venom of *Crotalus viridis viridis* (prairie rattlesnake). *Biochim. Biophys. Acta* 967:92-102.
- Kravitz J., Gerardo C.J. (2006) Copperhead snakebite treated with crotalidae polyvalent immune Fab (ovine) antivenom in third trimester pregnancy. *Clin. Toxicol. (Phila)* 44:353-4.
- Lakier J.B., Fritz V.U. (1969) Consumptive coagulopathy caused by a boomslang bite. *S. Afr. Med. J.* 43:1052-5.
- Langley L.R. (2004) A review of venomous animal bites and stings in pregnant patients. *Wilderness Environ. Med.* 15:207-15.
- Malz S. (1967) Snake-bite in pregnancy. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth.* 74:935-7.
- McNally S.L., Reitz C.J. (1987) Victims of snakebite. A 5-year study at Shongwe Hospital, Kangwane, 1978-1982. *S. Afr. Med. J.* 72:855-60.
- Mohamed A.H., Nawar N.N.Y., Hanna M.M. (1974) Some effects of *Naja nigricollis* envenomation on developing fetal tissue. *Toxicon* 12:477-80.
- Mohamed A.H., Nawar N.N.Y. (1975) Dysmelia in mice after maternal *Naja nigricollis* envenomation: A case report. *Toxicon* 13:475-7.
- Mori N., Sugihara H. (1988) Kallekrein-like enzyme from *Crotalus ruber ruber* (red rattlesnake) venom. *Int. J. Biochem.* 20:1425-33.
- Musial J., Niewiarowski S., Rucinski B., Stewart G.J., Cook J.J., Williams J.A., Edmunds L.H. Jr. (1990) Inhibition of platelet adhesion to surfaces of extracorporeal circuits by disintegrins. RGD-containing peptides from viper venoms. *Circulation* 82:261-73.
- Nasu K., Ueda T., Miyakawa I. (2004) Intrauterine fetal death caused by pit viper venom poisoning in early pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest.* 57:114-6.
- Nawar N.N. (1980) The effect of maternal envenomation by *Naja haje* (Egyptian cobra) snake on the developing central nervous system. *Singapore Med. J.* 21:528-30.
- Nawar N.N., Mohamed A., Adieb N., Emad M. (1989) The effect of maternal *Naja nigricollis* envenomation on the placenta. An experimental study. *Biol. Struct. Morphog.* 2:13-7.
- Osman O.H., Gumaa K.A. (1974) Pharmacological studies of snake (*Bitis arietans*) venom. *Toxicon* 12:569-75.
- Otero R., Gutierrez J., Mesa M.B., Duque E., et al (2002) Complications of *Bothrops*, *Porthidium* and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon* 40:1107-14.
- Pantanovitz L., Guidozzi F. (1996) Management of snake and spider in pregnancy. *Obst. Gynecol. Survey* 51:615-20.
- Pardal P.P.O., Mazzeo T., Pinheiro A.C.L. (1997) Snakebite in pregnancy: a preliminary study. *J. Venom. Anim. Toxins* 3:280-6.
- Parrish H.M., Khan M.S. (1996) Snakebite during pregnancy. Report of four cases. *Obstet. Gynecol.* 27:468-71.
- Penn G.B., Ross J.W., Ashford A. (1971) The effects of arvin on pregnancy in the mouse and the rabbit. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 20:460-73.
- Plater G., Martin R.L., Milburn P.J. (1995) A pharmacological and biochemical investigation of the venom from the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*). *Toxicon* 33:157-69.
- Reid H.A., Chan K.E., Thean P.C. (1963) Prolonged coagulation defect (defibrination syndrome) in *Malayan viper* bite. *Lancet* 1:621.
- Ringwald J.C. (2001) Les serpents venimeux. Le jeu en vaut-il la chandelle ? <http://www.aquarium32.com/FR/Articles/Terrario/serpentsvenimeux.htm>
- Ruch J.V., Gabriel-Robez-Kremer O. (1962) Action tératogène du venin de *Naja* sur l'embryon de poulet. *C. R. Soc. Biol.* 8-9:1508-9.
- Ruch J.V., Gabriel-Robez-Kremer O. (1963) Etude des malformations cardiaques provoquées par le venin de *Naja*. *C. R. Soc. Biol.*, 157:2291-3.
- Rucinski B., Niewiarowski S., Holt J.C., Soszka T., Knudsen K.A. (1990) Batroxostatin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide from *Bothrops atrox*, is a potent inhibitor of platelet aggregation and cell interaction with fibronectin. *Biochem. Biophys. Acta* 1054:257-62.
- Ruoslahti E. (1991) Integrins. *J. Clin. Invest.* 87:1-5.
- Russell F.E. (1967) Pharmacology of animal venoms. *Clin. Pharmacol. Ther.* 8:849-73.
- Russell F.E. (1973) Venomous animal injuries. *Curr. Probl. Paediatr.* 3:2-47.
- Scarborough R.M., Rose J.W., Naughton M.A., Phillips D.R., Nannizzi L., Arfsten A., Campbell A.M., Charo I.F. (1993) Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. *J. Biol. Chem.* 268:1058-65.
- Sebe A., Satar S., Acikalin A. (2005) Snakebite during pregnancy. *Hum. Exp. Toxicol.* 24:341-5.
- Seneviratne S.L., de Silva C.E., Fonseka M.M.D., Pathmeswaran A., Gunatilake S.B., de Silva H.J. (2002) Envenoming due to snakebite during pregnancy. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96:272-4.
- Singh CSAS (1925) A fatal case of snake bite (*Echis carinatus*) during pregnancy. *Ind. Med. Gaz.* 60:471.
- Soszka T., Knudsen K.A., Beviglia L., Rossi C., Poggi A., Niewiarowski S. (1991) Inhibition of murine melanoma cell-matrix adhesion and experimental metastasis by albolabrin, an RGD-containing peptide isolated from the venom of *Trimeresurus albolabris*. *Exp. Cell. Res.* 196:6-12.
- Spadacci-Morena D.D., de Tomy S.C., Sano-Martins I.S., Katz S.G. (2006) The effect of experimental *Bothrops jararaca* envenomation on pregnant mice. *Toxicon* 47:196-207.
- Sutherland S.K., Duncan A.W., Tibballs J. (1982) Death from a snakebite associated with the supine hypotensive syndrome of pregnancy. *Med. J. Aust.* 2:238-9.
- Wangai J., Thairu K., Telang B.V. (1981). Skeletal neuromuscular and smooth muscle effects of whole venom of the green mamba, *Dendroaspis angusticeps*-I. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 25:176-9.
- Weskamp G., Blobel C.P. (1994) A family of cellular proteins related to snake venom disintegrins. *Proc. Natl Acad. Sci.* 91:2748-51.
- Yamada K.M. (1991) Adhesive recognition sequences. *J. Biol. Chem.* 266:12809-12.
- Zugaib M., de Barros A.C., Bittar R.E., Burdmann E.A., Neme B. (1985) *Abruptio placentae* following snake bite. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 151:754-5.

Action of the *Crotalus durissus cascavella* venom on arterial blood pressure

Janaina S.A.M. EVANGELISTA^{1,4}, Alice M.C. MARTINS^{2*}, João J.F. EVANGELISTA¹, Nilberto F. NASCIMENTO^{3,4}, Antonia S. GOMES¹, Glaycianne B. de MORAIS⁴, João A. M. SILVEIRA⁴, Paula P.C. COSTA⁴, Marcellus H.L.P. de SOUZA¹, Diva M. BORGES-NOJOSA⁵, Dalgimar B. de MENEZES⁶, Maria Elisabete A. MORAES¹, Helena S. A. MONTEIRO¹

¹ Department of Physiology and Pharmacology, Institute of Biomedicine and Clinical Research Unit, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil ; ² Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil ; ³ Institute of Biomedicine, UECE, Fortaleza, Ceara, Brazil ; ⁴ Veterinary Faculty, State University of Ceara, UECE, Fortaleza, Ceara, Brazil ; ⁵ Ophiology Regional Nucleus of Ceara, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil ; ⁶ Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil.

* Corresponding author ; Tel : +55 85 33668269 ; Fax : +55 85 33668292 ;
E-mail : martinsalice@gmail.com/hsazul@gmail.com

Abstract

The present study aimed at investigating the effects of the *Crotalus durissus cascavella* venom on the arterial blood pressure. The venom was injected through a canula into the jugular vein, twice with increasing doses (100 mg/kg ; 300 mg/kg) ; saline was injected to control rats. Nitrite concentration was determined by an arterial blood pressure assay. Systolic and diastolic arterial pressures, as well as mean arterial pressure, decreased in a dose-dependent way after injection of the venom. Increase in blood nitrite concentration has been noted.

Action du venin de *Crotalus durissus cascavella* sur la tension artérielle

Cette étude a examiné les effets du venin de *Crotalus durissus cascavella* (100 mg/kg ; 300 mg/kg) sur la tension artérielle du rat. Le venin a été injecté dans la veine jugulaire par une canule. L'essai sur la tension artérielle a permis de mesurer la concentration de nitrite. Les tensions systolique et diastolique, ainsi que la pression artérielle moyenne, ont été diminuées en fonction de la dose après la perfusion du venin. On a également observé une augmentation de la concentration de nitrite.

Keywords : *Crotalus durissus cascavella* venom, mean arterial pressure, hypotensive effect.

Introduction

In Brazil, *Crotalus* genus is responsible for more than 1500 cases of snake bites annually (Santoro *et al.*, 1999 ; Martins *et al.*, 2003). *Crotalus durissus cascavella* (*Cdcasca*) is usually found in scrublands of the Brazilian Northeast. Snake venoms are recognized as useful sources of bioactive substances with wide pharmacological activity. The crotalic venom presents neurotoxic, myotoxic (Beghini *et al.*, 2004), renal (Martins *et al.*, 1998) antithrombotic and analgesic effects (Zhang *et al.*, 2006), as well as platelet aggregating activity. Snake venom components affect the vascular system (Yamazaki and Morita, 2007). De Mesquita *et al.* (1991) have demonstrated a hypotensive activity of *Crotalus atrox* venom. Martins *et al.* (1998) have reported the effects of *Cdcasca* venom in isolated rat kidney, as an increase in urinary flow and glomerular filtration rate. Previously, Martins *et al.* (2003) showed the renal effects of the supernatant of macrophages activated by *Cdcasca* venom. Envenoming by *Cdcasca* leads to systemic alterations, eventually responsible for primary cause of death after the snake bite.

Objective

The aim of this study is to evaluate the vascular

potential of *Cdcasca* venom on arterial blood pressure.

Material and methods

Male Wistar rats (250-300 g ; n = 6 for each experimental group) were anesthetized with 50 mg/kg pentobarbital and, thereafter, the right carotid artery was cannulated with a polyethylene tube (PE50), and the systemic blood pressure was recorded directly through a pressure transducer connected to a 4 channel-polygraph. The mean arterial blood pressure was recorded continuously and, after a 30 min equilibration period, the venom was injected through a canula implanted into the jugular vein. *Cdcasca* venom (100 and 300 µg/kg) was injected at 15 min interval and compared with isovolumetric injection of saline. Nitrite (NO₂) concentration was determined, after injection of *Cdcasca* venom, from blood pressure assay. 50 µL of non-diluted samples were incubated with the same volume of Griess reagent (1% sulphanilamide, 0.1% naphthylethylene-diamine dihydrochloride in 5% phosphoric acid). A standard nitrite curve was obtained by incubating sodium nitrite (10 to 200 µM) with the reductase buffer. Absorbance at 550 nm was determined using a multi-well plate reader (ELx 800 Universal Multiplate). The results are reported as micromoles (µM) of NO₂, comparing the optical density

in samples with the standard curve. The data were analysed using Student's *t* test after an analysis of variance (ANOVA). The level of significance was set at $p < 0.05$ (*).

The study protocol was approved by Committees of Ethics from Federal University of Ceara, in Fortaleza, Brazil (n° 107/07).

Results and discussion

There was a significant dose-dependent decrease of the

mean arterial pressure and increase in the concentration of nitrite in rats treated with the *Cdcasca* venom. Cardiac and respiratory frequency also decreased significantly after the venom injection (Table 1). After injection of venom, an increase in production of nitrite was observed (control_{30min} = 50 μ mol ; *Cdcasca*_{30min} = 135 μ mol). Although the mechanism of action of the venom is not clear, the effects are likely due to an important component that has not yet been isolated, suggesting the involvement of nitric oxide in the hypotensive effect.

Table 1. Effects of the *Crotalus durissus cascavella* venom on arterial pressure (n = 6 for each experimental group).

Tableau 1. Effets du venin de *Crotalus durissus cascavella* sur la pression artérielle de rats (n = 6 pour chaque série expérimentale).

	Control	0.1 mg / mL	0.3 mg / mL
Systolic arterial pressure	126.78 mmHg	91.56 mmHg	88.31mmHg
Diastolic arterial pressure	83.88 mmHg	75.97 mmHg	65.62 mmHg
Mean arterial pressure	100 mmHg	70 mmHg	55 mmHg
Respiratory frequency	40 mL/min	25 mL/min	15 mL/min
Cardiac frequency	150 beats/min	100 beats/min	50 beats/min

Ferreira (1970), studying the venom of *Bothrops jararaca*, noted the existence of a bradykinin potentiating factor, which was identified as an inhibitor of inactivating enzymes of bradykinin. Subsequently, an enzyme that converts angiotensin I into angiotensin II was identified (Ferreira, 1994). These discoveries were essential for the development of captopril, a drug used to treat human hypertension (Ferreira, 1994). Analyzing the results related to the experiments with the model of blood pressure, a significant dose-dependent decrease of the mean arterial pressure was noted in rats treated with *Cdcasca*. The cardiac and respiratory frequency also decreased significantly after the venom injection.

Conclusion

The *Crotalus durissus cascavella* venom was shown to disclose a hypotensive effect, likely to be linked to the increase in nitrite concentration.

This suggests that this venom contains pharmacological tools with therapeutical potential.

References

- Beghini D.G., Rodrigues-Simioni L., Toyama M.H., Novello J.C., da Cruz-Höfling M.A., Marangoni S. (2004) Neurotoxic and myotoxic actions of crotoxin-like and *Crotalus durissus cascavella* whole venom in the chick biventer cervicis preparation. *Toxicon* 43:255-61.
- de Mesquita L.C., Selistre H.S., Giglio J.R. (1991) The hypotensive activity of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) venom: identification of its origin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44:345-53.
- Ferreira S.H. (1994) University Discoveries And Intellectual Property Rights: From *Bothrops Jararaca* Bradykinin Potentiating Peptides to Angiotensin Convertin Enzyme Inhibitors. *Br. J. Med. Biol. Res.* 27:1693-8.
- Ferreira S.H., Bartelt D.C., Greene L.J. (1970) Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 9:2583-93.
- Martins A.M.C., Guedes E.O., Menezes D.B., Monteiro H.S.A., Fonteles M.C. (1998) Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. *Toxicon* 36:1441-50.
- Martins A.M.C., Lima A.A.M., Toyama M.H., Marangoni S., Fonteles M.C., Monteiro H.S.A. (2003) Renal effects of supernatant from macrophages activated by *Crotalus durissus cascavella* venom: the role of phospholipase A₂ and cyclooxygenase. *Pharmacol. Toxicol.* 92:14-20.
- Santoro M.L., Sousa-e-Silva M.C., Gonçalves L.R., Almeida-Santos S.M., Cardoso D.F., Laporta-Ferreira I.L., Saiki M., Peres C.A., Sano-Martins I.S. (1999) Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Comp. Biochem. Physiol., Part C, Pharmacol., toxicol. & endocrinol.* 122:61-73.
- Yamazaki Y., Morita T. (2007) Snake venom components affecting blood coagulation and the vascular system: structural similarities and marked diversity. *Review Curr. Pharm. Des.* 13:2872-86.
- Zhang H.L., Han R., Chen Z.X., Chen B.W., Gu Z.L., Reid P.F., Raymond L.N., Qin Z.H. (2006) Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 48:175-82.

Caractérisation d'une fraction coagulante isolée du venin de *Cerastes cerastes*

Fatah CHERIFI, Fatima LARABA-DJEBARI*

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences Biologiques, USTHB Bab Ezzouar ;
Laboratoire de Recherche et Développement sur les Venins, Institut Pasteur d'Algérie, Alger, Algérie.

* Auteur correspondant ; Tél : 00 213 21 91 74 27 ; Fax : 00 213 21 91 72 21 ; Courriel : flaraba@hotmail.com

Résumé

Dans cette étude, nous caractérisons dans le venin de la vipère *Cerastes cerastes* une nouvelle fraction de type thrombine capable d'agréger les plaquettes de plasma humain. Cette enzyme présente pour principale cible la chaîne B β du fibrinogène comme le montre l'analyse par HPLC en phase inverse. Par ailleurs, une diminution significative du fibrinogène et de l'hémoglobine est observée dans le plasma d'animaux traités avec cette fraction β fibrinogénase, confirmant ainsi ses propriétés protéolytiques et fibrinogénolytiques.

Characterization of a coagulant fraction from *Cerastes cerastes* venom

A novel fraction with a coagulant activity has been found in the venom of the viper *Cerastes cerastes*. This fraction displays thrombin-like activity with high platelet aggregative effect. It acts as a proteinase and cleaves the B β chain of fibrinogen leading to the release of fibrinopeptide B as monitored by reverse phase-HPLC. A significant decrease of fibrinogen and haemoglobin was observed in the plasma of animals treated by the β fibrinogenase.

Keywords : β fibrinogenase, *Cerastes cerastes*, coagulation, platelet aggregation.

Introduction

Les morsures par les vipères constituent un vrai problème de santé publique dans le monde. En Algérie, les espèces les plus dangereuses sont *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*. Le venin de *C. cerastes* est constitué d'un mélange complexe de protéines à activités biologiques diverses. Ces protéines provoquent chez les personnes envenimées de graves perturbations tissulaires et métaboliques qui sont à l'origine de plusieurs effets physiopathologiques, principalement des troubles coagulopathiques. L'hémorragie, l'œdème et la nécrose considérés comme les principaux symptômes caractéristiques des morsures par les vipères ont été également observés lors d'une envenimation expérimentale avec ce venin.

Le venin de *C. cerastes* possède des propriétés hémolytiques, hémorragiques, coagulantes et anti-coagulantes (Laraba-Djebari et al., 1995) qui conduisent à la mort chez l'Homme lorsque les morsures ne sont pas immédiatement soignées. Parmi les molécules qui sont responsables de telles coagulopathies lors d'une envenimation ophidienne, on trouve les sérine protéinases de type thrombine qui sont fortement impliquées dans le contrôle de plusieurs processus physiologiques, notamment l'hémostase (Laraba-Djebari et al., 1992). L'étude du venin de cette espèce a permis de caractériser quatre molécules ou fractions (PLA2, RP-34, Afaâcytine et Cc2) appartenant toutes à la classe des hydrolases, et ayant des spécificités d'action différentes (Laraba-Djebari et al., 1990, 1992, 1995 ; Chérifi et Laraba-Djebari, 2007). Le but de la présente étude est de caractériser la fraction C1, une nouvelle fraction coagulante de type thrombine isolée de ce même venin.

Purification et caractérisation de la fraction C1

Une filtration moléculaire du venin de *C. cerastes* (1 g) sur Sephadex G-75 (0,1 M acétate d'ammonium, pH 8,5) suivie par un échange d'anions sur DEAE-Sephadex A-50 (gradient d'acétate d'ammonium 0,1 à 2 M ; pH 5,5) a permis de mettre en évidence une fraction, C1, portant une forte activité coagulante. Cette fraction a également des activités protéolytique, arginine-estéasique et amidolytique sur la caséine, le N-Benzoyl-L-Arginine-ethyl-ester hydrochloride (BAEE) et le N-CBZ-P-arginine-niroanilide hydrochloride (CBZ), respectivement. Son activité protéolytique étant abolie par le PMSF, alors que l'EDTA n'a aucun effet (Tableau 1), la fraction C1 contiendrait une sérine-protéase de type thrombine.

La fraction C1 induit la coagulation rapide du plasma humain (2 s, contre 16 s avec le venin) et contribue à l'aggrégation des plaquettes humaines. Elle présente une activité fibrinogénolytique plus importante que celles de la thrombine et du venin, comme l'atteste la mesure du diamètre de l'anneau de fibrine (5 mm, 2,5 et 2 mm, respectivement ; Tableau 2).

Activité fibrinogénolytique *in vitro* de la fraction C1

L'activité fibrinogénolytique de la protéase C1 *in vitro* a été étudiée par HPLC en phase inverse (RP-HPLC). La comparaison du chromatogramme avec celui obtenu après hydrolyse du substrat par la thrombine a montré que la fraction C1 dégrade préférentiellement la chaîne B β du fibrinogène (libération du fibrinopeptide

B ; *Tableau 2*). Chez les rats traités avec cette β fibrinogénase (1 mg par kg d'animal) la concentration

du fibrinogène plasmatique diminue de façon significative (2 g/L, contre 4 g/L pour les témoins).

Tableau 1. Effets des inhibiteurs sur les activités enzymatiques de la fraction coagulante C1.

Table 1. Inhibitor effects on enzymatic activities of coagulant fraction C1.

Activités enzymatiques	Fraction coagulante C1		
	Sans inhibiteur	En présence d'EDTA	En présence de PMSF
Activité protéolytique sur caséine (Absorbance à 280 nm pour 50 μ g d'échantillon)	0,169 $\pm$ 0,023 UA	0,181 $\pm$ 0,034 UA	0 UA
Activité ester-hydrolase sur BAEE (Absorbance à 405 nm pour 50 μ g d'échantillon)	1,182 $\pm$ 0,045 UA	1,100 $\pm$ 0,148 UA	0,521 $\pm$ 0,03 UA
Activité amide-hydrolase sur CBZ (Absorbance à 253 nm pour 50 μ g d'échantillon)	0,064 $\pm$ 0,017 UA	0,059 $\pm$ 0,029 UA	0,021 $\pm$ 0,003 UA

Tableau 2. Comparaison des activités biologiques de la fraction coagulante C1 et de la thrombine.

Table 2. Comparison of the biological activities of the coagulant fraction C1 and of thrombin.

Activités biologiques	Thrombine	Fraction coagulante C1
Activité coagulante (Temps pour 50 μ g d'échantillon)	6 $\pm$ 1 s	2 $\pm$ 0 s
Activité fibrinogénolytique (Diamètre de l'anneau de fibrine pour 50 μ g d'échantillon)	2,5 mm	5 mm
Agrégation plaquettaire (Fraction pour 50 μ g d'échantillon / mL)	55%	70%
Type de fibrinopeptide libéré après fibrinogénolyse	Fibrinopeptide A puis B	Fibrinopeptide B seul

Activités biologiques *in vivo* de la fraction C1

L'administration de la fraction C1 à des rats Wistar (1 mg par kg d'animal, voie intrapéritonéale) induit la modification de certains paramètres hémostatiques et métaboliques après 24 h :

- augmentation de la glycémie (1,28 g/L, contre 0,51 g/L pour les témoins),
- augmentation de la cholestérolémie (1,02 g/L, contre 0,78 g/L pour les témoins),
- diminution de la concentration en hémoglobine (7,1 g/L, contre 11,2 g/L pour les témoins).

Conclusion

Cette étude a permis de caractériser une nouvelle fraction coagulante de type thrombine à partir du venin de *Cerastes cerastes* ayant des activités protéolytique, fibrinolytique et agrégante. L'agrégation plaquettaire est déclenchée par la fixation de la chaîne γ du fibrinogène sur ses récepteurs au niveau des plaquettes sanguines. Le pouvoir agrégant de la fraction C1 pourrait dériver de son action préférentielle pour la chaîne β du fibrinogène.

L'ensemble des résultats permet de considérer la contribution de cette fraction C1 dans les perturbations hémostatique et hémolitique induites par le venin de cette vipère.

Références bibliographiques

- Chérifi F., Laraba-Djebari F. (2007) Purification et caractérisation d'une fraction anticoagulante et protéolytique du venin de *Cerastes cerastes*. In: Goudey-Perrière F., Benoit E., Marchot P., Popoff M.R. (Eds.). *Toxines émergentes: nouveaux risques*. Coll. Rencontres en Toxinologie, Lavoisier, pp. 372-3.
- Laraba-Djebari F., Martin-Eauclaire M-F. (1990) Purification and characterization of a phospholipase A2 from *Cerastes cerastes* (horn viper) snake venom. *Toxicon* 34:145-6.
- Laraba-Djebari F., Martin-Eauclaire M.F., Marchot P. (1992) A fibrinogen-clotting serine proteinase from *Cerastes cerastes* (Horned viper) with arginine-esterase and amidase activities, purification, characterization and kinetic parameter determination. *Toxicon* 30:1399-410.
- Laraba-Djebari F., Martin-Eauclaire M.F., Mauco G., Marchot P. (1995) Afaacytin, an α , β -fibrinogenase from *Cerastes cerastes* (Horned viper) venom, activates purified factor X and induces serotonin release from human blood platelet. *Eur. J. Biochem.* 233:756-65.

Caractéristiques structurales et fonctionnelles de deux *b*-neurotoxines : l'ammodytoxine et la crotoxine

Grazyna FAURE*, Frederick SAUL

Unité d'Immunologie Structurale, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France.

* Auteur correspondant ; Tél : 01 45 68 86 86 ; Fax : 01 40 61 30 57 ; Courriel : grazyna.faure-kuzminska@pasteur.fr

Résumé

L'ammodytoxine et la crotoxine sont de puissantes *b*-neurotoxines des venins des serpents *Vipera ammodytes ammodytes* et *Crotalus durissus terrificus* (Faure et Bon, 1988 ; Bon et al., 1994). Ces phospholipases A_2 (PLA₂) bloquent principalement la libération de l'acétylcholine au niveau présynaptique et provoquent une paralysie des muscles squelettiques (Hawgood et Bon, 1991). Pour exercer leurs effets neurotoxiques, ces toxines interagissent avec des protéines extra- et intracellulaires, spécifiques de chaque neurotoxine (identifiées ou en cours d'identification) dans le cortex cérébral et dans l'organe électrique de *Torpedo marmorata* (Krizaj et al., 1997 ; Hseu et al., 1999 ; Faure, 2002 ; Faure et al., 2003 ; Pungercar et Krizaj, 2007). Nous avons montré que l'ammodytoxine et la sous-unité basique (CB) de la crotoxine sont capables d'inhiber la coagulation sanguine par une liaison directe au récepteur soluble de sang humain, le facteur de coagulation sanguine Xa (FXa) (Priatelj et al., 2006 ; Faure et al., 2007). Récemment, nous avons déterminé par diffraction des rayons X les structures tridimensionnelles de deux isoformes de l'ammodytoxine, AtxA et AtxC (Saul et al., 2008). L'ensemble des résultats obtenus par diverses approches incluant (i) l'étude de l'affinité de liaison PLA₂-cible protéique par résonance plasmonique de surface (SPR) ; (ii) une approche bioinformatique (modélisation et « docking » moléculaires) basée sur les résultats de mutagenèse dirigée et (iii) l'analyse cristallographique, a permis de caractériser des résidus critiques, impliqués dans la neurotoxicité et dans l'activité anticoagulante de ces deux *b*-neurotoxines (Priatelj et al., 2006 ; Faure et al., 2007 ; Saul et al., 2008).

Structural and functional characterization of ammodytoxin and crotoxin

Ammodytoxin and crotoxin are potent *b*-neurotoxins from the venoms of the snakes *Vipera ammodytes ammodytes* and *Crotalus durissus terrificus*. These two toxins act presynaptically and induce complete failure of neuromuscular transmission (Faure and Bon, 1988 ; Hawgood and Bon, 1991 ; Bon et al., 1994). To exert their neurotoxicity, these monomeric and heterodimeric phospholipases A_2 (secreted group IIA PLA₂) interact with several soluble and membrane-bound protein targets (Faure, 2002 ; Pungercar and Krizaj, 2007). Some of these targets have been identified in the porcine cerebral cortex and *Torpedo marmorata* electric organ, others are still under investigation (Krizaj et al., 1997 ; Hseu et al., 1999 ; Faure, 2002 ; Faure et al., 2003 ; Pungercar and Krizaj, 2007). Ammodytoxin and the CB subunit of crotoxin also exhibit strong anticoagulant effects and bind to the human coagulation factor Xa, inhibiting coagulation through a non-enzymatic pathway (Priatelj et al., 2006 ; Faure et al., 2007). We have been interested in identifying the functional sites of these two neurotoxic and anticoagulant PLA₂s. Recently, we have determined the crystal structures of two ammodytoxin isoforms, AtxA and AtxC (Saul et al., 2008). This structural information, together with previous biochemical studies using site-directed mutagenesis, surface plasmon resonance and molecular docking, allows us to identify amino-acid residues implicated in the neurotoxicity and anticoagulant activity of these enzymes (Priatelj et al., 2006 ; Faure et al., 2007 ; Saul et al., 2008). Precise characterisation of the binding of PLA₂s with their protein targets should be useful in the elaboration of new anticoagulant or antineurotoxic agents.

Keywords : Ammodytoxin, anticoagulant phospholipases A_2 , crotoxin, presynaptic neurotoxins.

Introduction

Pour comprendre les mécanismes d'action des PLA₂ neurotoxiques et anticoagulantes, de nombreux laboratoires de recherche focalisent leurs études sur une caractérisation précise des sites de liaison aux récepteurs protéiques des PLA₂. L'identification des sites fonctionnels de ces PLA₂ pourra servir de base à l'élaboration de nouveaux médicaments anti-toxiques ou anti-thrombotiques. Nous-mêmes avons focalisé nos

études sur deux PLA₂ de venin de serpent : l'ammodytoxine et la crotoxine. L'isoforme AtxA de l'ammodytoxine interagit avec un récepteur neuronal de PLA₂ de type M, avec la calmoduline (CaM), avec la protéine disulfide isomérase et les isoformes γ et ϵ de la protéine 14-3-3 (Pungercar et Krizaj, 2007). La crotoxine se lie avec une affinité nanomolaire au récepteur CAPT de *Torpedo marmorata*, au récepteur neuronal de crocalbine et à la CaM (Krizaj et al., 1997 ; Hseu et al., 1999 ; Sribar et al., 2001 ; Faure et al.,

2003). La fonction anticoagulante de ces deux PLA₂ neurotoxiques est également très étudiée à l'échelle moléculaire. Nous avons montré que l'ammodytotoxine et la sous-unité basique (CB) de la crotoxine inhibent la coagulation sanguine par une liaison directe sur le facteur Xa (FXa) et formation d'un complexe moléculaire PLA₂-FXa (Priatelj *et al.*, 2006 ; Faure *et al.*, 2007).

Des études très récentes ont conduit à la résolution des structures tridimensionnelles de deux isoformes naturelles de l'ammodytotoxine (Saul *et al.*, 2008) et de la sous-unité basique de la crotoxine (mélange de deux isoformes de CB ; Marchi-Salvador *et al.*, 2008).

Des technologies complémentaires comme la résonance plasmonique de surface, la mutagenèse dirigée, la modélisation et « docking » moléculaires, et la cristallographie ont été utilisées pour caractériser des motifs structuraux importants pour la neurotoxicité et les propriétés anticoagulantes des PLA₂.

Cet article décrit brièvement l'ensemble des résultats obtenus par diverses approches qui ont permis de caractériser des résidus critiques impliqués dans la neurotoxicité et dans l'activité anticoagulante de ces β -neurotoxines (Priatelj *et al.*, 2006 ; Faure *et al.*, 2007 ; Saul *et al.*, 2008).

Etudes biochimique et structurale de l'ammodytotoxine et la crotoxine

L'ammodytotoxine et la crotoxine sont de puissantes β -neurotoxines de venins de serpents *Viperidae* qui présentent des structures quaternaires distinctes (Bon, 1997 ; Faure, 1999).

L'ammodytotoxine, du venin de la vipère d'Europe centrale, est une toxine monocaténaire de 122 acides aminés, dont 14 cystéines, de point isoélectrique de 9,5 à 10,2 et de masse moléculaire proche de 14 kDa (Gubensek et Krizaj, 1997). A partir du venin, trois isoformes naturelles de l'ammodytotoxine : AtxA, AtxB et AtxC, ont été purifiées par FPLC sur échangeur cationique (MonoS) et par HPLC en phase inverse (C4, 300 Å) (Gubensek *et al.*, 1980). Ces isoformes diffèrent par leurs propriétés structurales et fonctionnelles (toxicité, affinité vis-à-vis des récepteurs neuronaux et du FXa) (Faure 2002 ; Pungercar et Krizaj, 2007 ; Priatelj *et al.*, 2006). AtxB et AtxC diffèrent de AtxA par trois mutations (Tyr115His, Arg118Met, Asn119Tyr) et deux mutations (Phe124Ile, Lys128Glu) respectivement, toutes situées dans la partie C-terminale de la molécule (numérotation selon Renetseder *et al.*, 1985). La toxicité (DL₅₀) des trois isoformes, déterminée par injection *i.v.* chez la souris, est de 0,021 mg/kg pour AtxA, 0,58 mg/kg pour AtxB et 0,36 mg/kg pour AtxC (Thouin *et al.*, 1982 ; Lee *et al.*, 1984). Ces valeurs suggèrent l'importance de la partie C-terminale de l'ammodytotoxine pour exprimer sa neurotoxicité présynaptique.

Récemment, nous avons déterminé la structure tridimensionnelle des deux isoformes AtxA et AtxC de l'ammodytotoxine par diffraction des rayons X (Saul *et al.*, 2008). Ces isoformes, purifiées à homogénéité, ont donné lieu à des cristaux diffractant à 1,7 Å et 1,35 Å, respectivement (Saul *et al.*, 2008). Ces structures montrent que, de façon similaire à d'autres PLA₂ du groupe IIA, AtxA et AtxC possèdent sept ponts disulfure parfaitement conservés, trois hélices- α principales et un feuillet- β formé de deux courtes

chaînes antiparallèles organisées en un motif du type « β -wing » (Figure 1).

La crotoxine (CACB), du venin d'un crotale sud-américain, est en fait un complexe hétérodimérique de point isoélectrique de 4,9 à 5,2 et de masse moléculaire de 24 kDa (Faure et Bon, 1988). Ses deux sous-unités constitutives, CA (acide) dépourvue d'activité enzymatique, et CB (basique) portant l'activité PLA₂, sont associées de façon non covalente en un complexe équimolaire (Hendon et Fraenkel-Conrat, 1971). La sous-unité CA, non toxique, est constituée de trois chaînes polypeptidiques α, β, γ reliées par sept ponts disulfure (Breithaupt *et al.*, 1974 ; Aird *et al.*, 1986). Ces trois chaînes correspondent aux trois régions du précurseur pro-CA (homologue aux PLA₂) dont le cDNA a été cloné (Bouchier *et al.*, 1991 ; Faure *et al.*, 1991). La sous-unité CB, 10 fois moins toxique que le complexe crotoxine, est formée d'une chaîne polypeptidique de 122 acides aminés qui porte l'activité catalytique (Fraenkel-Conrat *et al.*, 1980 ; Aird *et al.*, 1986). Il existe plusieurs isoformes de crotoxine issues de l'association de plusieurs variants de chacune des sous-unités CA et CB (Faure et Bon, 1987, 1988).

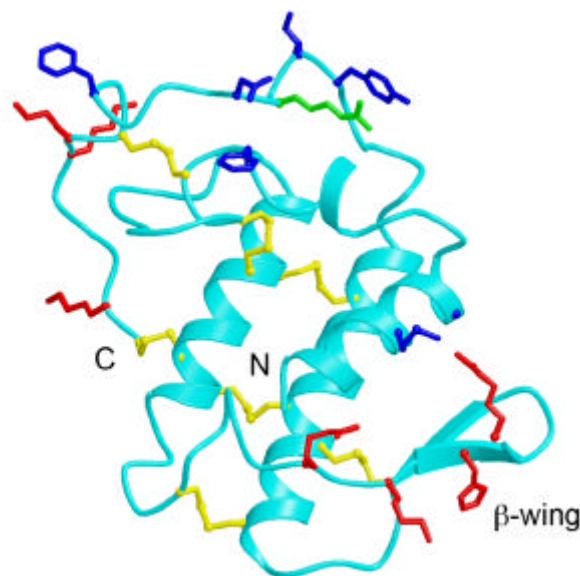


Fig. 1. Structure tridimensionnelle de l'isoforme AtxA de l'ammodytotoxine. Les chaînes latérales des résidus impliqués dans l'activité anticoagulante, déterminés par mutagenèse dirigée (Priatelj *et al.*, 2006) sont montrées en rouge. Celles des résidus impliqués dans l'activité neurotoxique sont montrées en bleu (Priatelj *et al.*, 2008). Le résidu important pour les deux activités est montré en vert clair. Les sept ponts disulfure, très conservés, sont montrés en jaune. Les terminaisons N- et C-terminales de la chaîne polypeptidique et le motif β -wing sont également indiqués.

Fig. 1. Three-dimensional structure of ammodytotoxin isoform AtxA. The side chains of residues involved in the anticoagulant activity, as determined by mutagenesis studies (Priatelj *et al.*, 2006), are shown in red. Those of residues involved in the neurotoxic activity (Priatelj *et al.*, 2008) are shown in blue. The seven conserved disulfide bonds are shown in yellow. The residue important for both activities is in green. The N- and C-termini of the polypeptide chain and the β -wing motif are indicated.

Nous avons déterminé les séquences des 4 isoformes de la sous-unité CA (CA1, CA2, CA3 et CA4) et montré qu'elles peuvent être synthétisées par un même serpent (Faure et Bon, 1987 ; Faure *et al.*, 1991, 1994). Une comparaison de leurs séquences avec celle

du précurseur pro-CA montre que les quatre isoformes matures résultent de modifications post-traductionnelles : (i) les clivages protéolytiques du pro-CA en des sites proches mais distincts, conduisant à l'élimination de trois peptides, dont le peptide N-terminal de la chaîne α , identifié comme nécessaire à la liaison de PLA₂ aux phospholipides (expliquant pourquoi la sous-unité CA mature est dépourvue d'activité enzymatique) ; (ii) l'absence ou la présence de pyroglutamylation sur les résidus N-terminaux libérés au niveau des chaînes peptidiques β et γ (Faure *et al.*, 1991).

Les quatre isoformes de la sous-unité CB (CBA₂, CBb, CBc et CBD), très basiques et hydrophobes, ont été purifiées à partir du pool de venins sur échangeur cationique (MonoS) avec un double gradient de NaCl et d'urée (Faure et Bon, 1988 ; Faure *et al.*, 1994 ; Faure et Choumet, 1992). Leur l'homogénéité a été vérifiée par HPLC en phase inverse (Vydac C4, 300 Å) (Faure, résultats non publiés). Leurs masses moléculaires déterminées par ESMS (± 1 Da) sont 14245 Da (CBA₂), 14152 Da (CBb), 14245 Da (CBc) et 14234 Da (CBD) (Faure *et al.*, 1994 ; Bieber *et al.*, 1997).

Les séquences de CBA₂ et CBc ont été établies grâce au clonage d'ARNm isolé de la glande à venin d'un seul serpent (Bouchier *et al.*, 1991 ; Faure *et al.*, 1994). Ces deux isoformes appelées CB1 et CB2 (dont les cDNA ont été clonés) correspondent respectivement aux formes matures CBc et CBA₂ du pool de venins et diffèrent par huit amino acides (His1Ser, Ile18Val, Arg34Glu, Pro74Arg, Glu92Lys, Tyr115Asn, Gly116Glu, Gly128Glu ; numérotation selon Renetseder *et al.*, 1985). Ces différences sont très importantes car responsables de la formation de deux classes de complexes crotoxine (Faure et Bon 1988 ; Faure *et al.*, 1993).

En effet, les propriétés enzymatiques et pharmacologiques de 16 complexes crotoxine, formés par l'association de quatre isoformes de CA avec quatre isoformes de CB, ont permis de définir deux classes de complexes : la classe I des « complexes toxiques », formée des isoformes CA1, CA2, CA3 ou CA4, et CBb, CBc, CBD (DL₅₀ = 93 $\pm$ 20 μ g/kg par injection *i.v.* chez la souris) et la classe II des « complexes moins toxiques », formée de CA1, CA2, CA3 ou CA4 et CBA₂ (DL₅₀ = 435 $\pm$ 65 μ g/kg par injection *i.v.* chez la souris ; Faure *et al.*, 1993).

Nous avons démontré par fluorescence (en suivant le changement d'intensité de fluorescence de CB après association avec CA) et par SPR (en mesurant les cinétiques d'interaction de CA avec CB) que la stabilité des complexes composés de différentes isoformes joue un rôle important dans la toxicité de la crotoxine (Faure *et al.*, 1993 ; Faure et Fourier, 2006).

L'affinité entre CA et CB est caractérisée par une valeur de Kd de l'ordre du nanomolaire. La vitesse de dissociation déterminée par SPR pour le complexe de la classe II est associée à une constante cinétique, k_{off} , cinq fois supérieure à celle des complexes de la classe I. Cela implique que les complexes crotoxine les plus toxiques (classe I) sont beaucoup plus stables que les complexes crotoxine les moins toxiques (classe II) (Faure *et al.*, 1993 ; Faure et Fourier, 2006). La différence de stabilité des complexes crotoxine est due uniquement à la nature de la sous-unité CB (Faure *et al.*, 1993).

La structure cristallographique de la sous-unité CB

de la crotoxine a été récemment établie par une équipe brésilienne (Marchi-Salvador *et al.*, 2008). Cette structure, résolue à partir d'un mélange d'isoformes de CB, montre l'association tétramérique de deux hétérodimères de CB composés de 2 isoformes CB1 et CB2. Chaque venin individuel de crotale pouvant contenir des quantités variables d'isoformes (Faure et Bon, 1987), on trouve une grande diversité d'isoformes d'un lot de venin à l'autre. Les séquences de deux isoformes de CB (CB1 et CB2) présentes dans le cristal correspondent aux isoformes CBA₂ et CBc dont les séquences et les propriétés biochimiques avaient été établies précédemment (Faure *et al.*, 1993, 1994). Fontes *et al.* ont proposé que la structure quaternaire de CB observée dans le cristal ait une signification biologique (Marchi-Salvador *et al.*, 2008). Pourtant, l'existence du complexe tétramérique composé d'hétérodimères de CB n'a pas été démontrée dans le venin de serpent. En revanche, il a été montré que les isoformes CBA₂ et CBc ont des propriétés biochimiques bien différentes (elles se lient au FXa avec des affinités différentes (Tableau 1) et forment deux classes de complexes crotoxine (Faure *et al.*, 1993). Ces observations soulignent l'importance biologique de chacune des isoformes de CB. Par ailleurs, il a été montré que la sous-unité CA de la crotoxine empêche la formation de homodimère de CB (Radvanyi et Bon, 1982).

Etudes fonctionnelles de la crotoxine et de l'ammodytoxine afin d'identifier leurs sites neurotoxiques et anticoagulants

Nous avons montré que la crotoxine se lie spécifiquement et avec une affinité (Kd) nanomolaire sur une protéine de 48 kDa associée aux membranes présynaptiques de l'organe électrique de torpille (Krizaj *et al.*, 1997 ; Faure *et al.*, 2003). Cette protéine a été solubilisée et partiellement purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de crotoxine immobilisée (Faure *et al.*, 2003).

L'activité enzymatique de la crotoxine est indispensable à son activité pharmacologique et sa toxicité, mais elle n'est pas indispensable à l'étape de liaison de la sous-unité PLA₂ au récepteur protéique membranaire, qui fait intervenir les deux sous-unités de la crotoxine. Le complexe CACB de la crotoxine est 10 fois plus toxique que la sous-unité CB seule (Faure *et al.*, 1993). La sous-unité CA, non catalytique et non toxique joue un triple rôle : (i) CA augmente la toxicité de la sous-unité CB (Hawgood et Bon, 1991) en la dirigeant vers le récepteur spécifique de la crotoxine (Krizaj *et al.*, 1997) ; (ii) CA participe à la liaison de CB sur le récepteur formant un complexe ternaire transitoire (Faure *et al.*, 2003) ; (iii) CA empêche la formation du dimère réactif de CB (Radvanyi et Bon, 1982). Le mécanisme d'action de la crotoxine est donc très particulier. A l'équilibre, au contact de son récepteur présynaptique, le complexe CACB se dissocie et seule la sous-unité CB participe à la liaison et reste attachée aux membranes présynaptiques (Bon *et al.*, 1994), mais en temps réel, la sous-unité CA en présence de CB et du récepteur forme un complexe ternaire transitoire (Faure *et al.*, 2003). Ce complexe ternaire a été mis en évidence par SPR grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques anti-CB et anti-CA (Faure *et al.*, 2003).

Des études de liaison et de pontage chimique (« cross-linking ») effectuées avec AtxC radioiodée, ont

montré que ^{125}I -AtxC se lie avec une haute affinité aux membranes présynaptiques de torpille et marque des protéines de 70, 57-39 et 20 kDa (Krizaj *et al.*, 1997). La crotoxine et l'ammodytotoxine ne sont pas mutuellement compétitives pour leurs sites de liaison de haute affinité, suggérant qu'elles reconnaissent des récepteurs différents (Krizaj *et al.*, 1997). En revanche, la sous-unité CB isolée inhibe très efficacement la liaison de haute affinité de ^{125}I -AtxC, mais pas celle de la ^{125}I -crotoxine. Ainsi les sites de haute affinité de la crotoxine et de la sous-unité CB sont différents, mais ceux de l'ammodytotoxine et CB sont très similaires (Krizaj *et al.*, 1997). AtxA interagit avec un récepteur neuronal de PLA₂ de type M, la calmoduline, la protéine disulfide isomérase et les isoformes γ et ϵ de la protéine 14-3-3 (Pungercar et Krizaj, 2007).

La localisation du site neurotoxique sur les PLA₂ est très recherchée mais encore très spéculative reflétant les rapports complexes existant entre la structure et la fonction de ces PLA₂ qui reconnaissent séquentiellement divers récepteurs protéiques (Kini, 2003 ; Pungercar et Krizaj, 2007). Une étude de l'ammodytotoxine et de ses isoformes naturelles et recombinantes au moyen des techniques de génétique moléculaire et de mutagenèse dirigée a permis d'identifier la partie C-terminale de AtxA comme son « site neurotoxique » et mettre en évidence la contribution des résidus Tyr115, Ile116, Arg118 et Asn119 ; numérotation selon Renetseder *et al.*, 1985 ; Ivanovski *et al.*, 2000). Les résidus aromatiques Phe24 (Petan *et al.*, 2002) et Phe124 (Pungercar *et al.*, 1999) ont été aussi identifiés comme très importants pour la neurotoxicité. La substitution de Phe24 par une sérine conduit à une diminution de la toxicité de 18 fois. Une étude plus récente suggère qu'une paire de résidus (Met77/Gly11) située dans la partie N-terminale joue aussi un rôle important mais de façon distincte, en étant impliquée dans une étape différente de la cascade d'événements conduisant à la neurotoxicité (Priatelj *et al.*, 2008). Ces résidus sont présentés en bleu sur la Figure 1.

La structure tridimensionnelle de l'ammodytotoxine (Saul *et al.*, 2008) montre que la région C-terminale est exposée à la surface de la molécule, présentant un arrangement favorable pour interagir avec le récepteur présynaptique et former le complexe moléculaire (Figure 1).

AtxA et la sous-unité CB de la crotoxine inhibent fortement la coagulation sanguine. Ces enzymes connues pour leurs propriétés neurotoxiques possèdent donc aussi des propriétés anticoagulantes, semblables à

celles de la sPLA₂ humaine du groupe IIA ou de la PLA₂ du venin du cobra *Naja nigricollis* (Mounier *et al.*, 1998 ; Stefansson *et al.*, 1990). L'effet anticoagulant de AtxA et de CB est dû à un mécanisme non-enzymatique et indépendant des phospholipides (Mounier *et al.*, 1998 ; Stefansson *et al.*, 1990). Il concerne l'étape clé de la coagulation sanguine, l'étape de thrombinoformation. En bref, l'activation de la prothrombine en thrombine est catalysée au niveau du complexe prothrombinase par le FXa (activé) et en présence de Ca²⁺ et de deux cofacteurs, le facteur Va et les phospholipides. Par SPR nous avons montré que AtxA et CB sont capables d'inhiber la formation du complexe prothrombinase et que cette inhibition est due à une liaison directe de ces PLA₂ sur FXa (Priatelj *et al.*, 2006, Faure *et al.*, 2007). Un complexe PLA₂-FXa a été mis en évidence en temps réel et les paramètres cinétiques de cette interaction ont été déterminés pour les isoformes naturelles de CB et de l'ammodytotoxine (CBa₂, CBc et AtxA, AtxB, AtxC) (Tableau 1) et différents mutants recombinant de AtxA (Priatelj *et al.*, 2006, Faure *et al.*, 2007). La diminution d'affinité pour le facteur FXa (mesurée par SPR pour certains mutants) en corrélation avec l'augmentation d'IC₅₀ (déterminée par un test physiologique d'inhibition d'activité prothrombinase), a permis d'identifier les résidus basiques du « site anticoagulant » de l'ammodytotoxine et de la PLA₂ humaine du groupe IIA (Priatelj *et al.*, 2006, Mounier *et al.*, 2000). Pour AtxA les parties C-terminales (résidus Arg118, Lys127, Lys128 et Lys132) et β -wing (résidus Arg72, Lys74, His76 et Arg77 ; numérotation selon Renetseder *et al.*, 1985) ont été identifiées (Priatelj *et al.*, 2006). Ces résidus sont présentés en rouge sur la Figure 1.

Pour la PLA₂ humaine du groupe IIA ce sont les parties C- et N-terminales qui ont été identifiées (Mounier *et al.*, 2000). Récemment cette étude a été élargie à d'autres PLA₂ anticoagulantes de venins de *Viperidae* et complétée par des approches de SPR et bioinformatique (Faure *et al.*, 2007). Les résidus consensus participant à la liaison au FXa et donc appartenant à la région anticoagulante identifiés par « docking » moléculaire sont : les parties exposées au solvant de l'hélice A (positions 2, 3, 7) et l'hélice B (positions 18, 19) ; les résidus en positions 16, 23 et 24 ; la boucle de fixation du Ca²⁺ (positions 31-34) ; une partie de la boucle située entre l'hélice C et le β -wing (positions 53, 59, 60, 69, 70) et le fragment C-terminal (positions 118, 119, 121-124, 129-131, 133 ; numérotation selon Renetseder *et al.*, 1985 ; Faure *et al.*, 2007).

Tableau 1. Constantes cinétiques de l'interaction des isoformes de CB et d'Atx avec le FXa et constantes d'inhibition de l'activité du complexe prothrombinase, pour les diverses PLA₂.

Table 1. Kinetic and equilibrium parameters for FXa-binding and prothrombinase activity by the various PLA₂.

PLA ₂ ¹	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	K _d ^{app} [nM] ²	IC ₅₀ [nM] ³
CBc	(3,2 ± 0,2) × 10 ⁵	(1,6 ± 0,4) × 10 ⁻⁴	0,5	0,7 ± 0,3
CBa₂	(2,9 ± 0,4) × 10 ⁵	(1,5 ± 0,2) × 10 ⁻²	52	41 ± 5
AtxA	(2,2 ± 0,2) × 10 ⁵	(7,0 ± 1,0) × 10 ⁻³	32	20 ± 5
AtxB	(8,0 ± 1,0) × 10 ⁴	(1,1 ± 0,2) × 10 ⁻²	138	82 ± 9
AtxC	(3,9 ± 0,1) × 10 ⁴	(1,4 ± 0,2) × 10 ⁻²	359	240 ± 40

¹ Références pour CBc, CBa₂ (Faure *et al.*, 2007) ; pour AtxA, B, C (Priatelj *et al.*, 2006). *References for CBc, CBa₂* (Faure *et al.*, 2007) ; *for AtxA, B, C* (Priatelj *et al.*, 2006).

² K_d^{app} = k_{off}/k_{on}.

³ IC₅₀ : valeur de demi inhibition de la formation de thrombine par les diverses PLA₂ en absence de phospholipides. *Defined as 50% inhibition of thrombin formation by the various PLA₂ in the absence of phospholipids.*

Parmi les huit mutations qui différencient CBc de CBA₂, deux mutations (Arg34Glu dans la boucle de fixation du Ca²⁺ et Gly128Glu dans la partie C-terminale) sont localisées dans la région d'interface PLA₂-FXa, que nous avons identifiée comme « site anticoagulant » en utilisant une approche bio-informatique basée sur les résultats de mutagenèse dirigée (Faure *et al.*, 2007). La position de Gly116Glu (tout au bord du fragment C-terminal) confirme que la disparition de la charge positive et l'apparition de deux charges négatives dans cette région sont responsables de la perte d'affinité de CBA₂ pour le FXa par rapport au CBc (Tableau 1 ; Faure *et al.*, 2007).

Conclusions

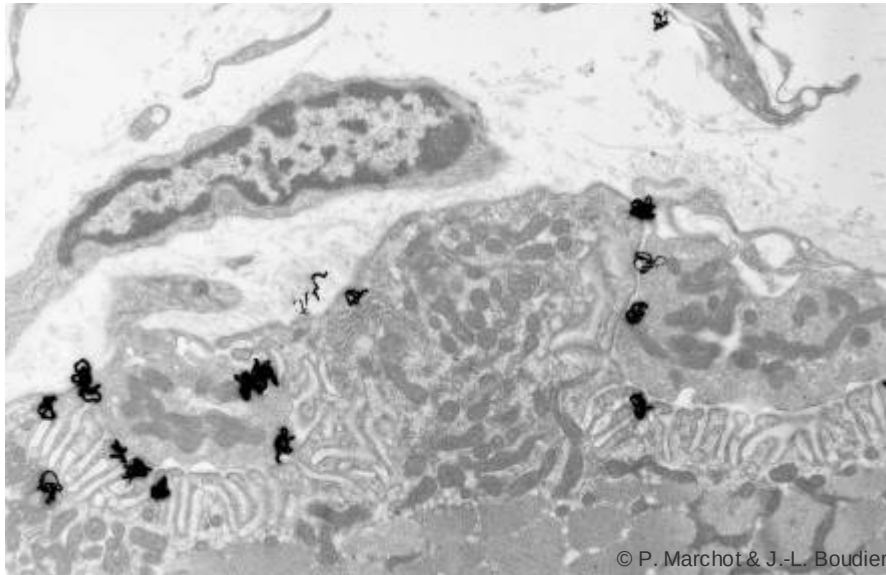
Il est de plus en plus évident que les PLA₂ de venins de serpents exercent leur effet neurotoxique et anticoagulant par interaction avec des récepteurs protéiques. Les PLA₂, qui sont des protéines multifonctionnelles, possèdent de multiples sites pharmacologiques distincts du site catalytique. Comme le montre la Figure 1, le site neurotoxique de l'ammodytoxine se superpose en partie avec son site anticoagulant (cf. le résidu montré en vert), mais les résidus impliqués dans les deux fonctions ne sont pas nécessairement identiques.

La superposition de sites pharmacologiques, responsables de différentes fonctions biologiques, peut s'expliquer par la petite taille des PLA₂ et le fait qu'elles exercent leurs différents effets dans des compartiments cellulaires différents. La caractérisation précise des sites de liaison des PLA₂ aux récepteurs protéiques pourra servir de base à la conception de nouveaux agents anti-toxiques ou anti-thrombotiques.

Références bibliographiques

- Aird S.D., Kaiser I.I., Lewis R.V., Kruggel W.G. (1986) A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:296-300.
- Aird S.D., Kaiser I.I., Lewis R.V., Kruggel W.G. (1986) Rattlesnake presynaptic neurotoxins: primary structure and evolutionary origin of the acidic subunit. *Biochemistry* 24:7054-8.
- Bieber A., Bon C., Faure G. (1997) Rattlesnake venom neurotoxins: crotoxin related proteins. In: Rappuoli R., Montecucco C (Eds.), *Guidebook to protein toxins and their use in cell biology*, Oxford University Press, pp. 221-4.
- Bon C. (1997) Multicomponent neurotoxic phospholipases A₂. In: Kini R.M. (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism*, Wiley, Chichester, pp. 269-85.
- Bon C., Choumet V., Faure G., Robbe-Vincent A., Saliou B. (1994) Different evolution of phospholipase A₂ neurotoxins (β-neurotoxins) from *Elapidae* and *Viperidae* snakes. In: Suput D., Zorec R. (Eds.), *Toxins and Exocytosis, Annals of the New-York Academy of Sciences*, New-York. Vol. 710, pp. 142-8.
- Bouchier C., Boulain J.-C., Bon C., Ménez A. (1991) Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A₂-like precursor. *Biochim. Biophys. Acta* 1088:401-8.
- Breithaupt H., Rubsamen K, Habermann E. (1974) Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. *Eur. J. Biochem.* 49:333-45.
- Faure G. (1999) Les phospholipases A₂ des venins de serpents. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 124:149-68.
- Faure G. (2002) Les différentes cibles protéiques des phospholipases A₂ de venins de serpents. In: Goudey-Perrière F., Bon C., Puiseux-Dao S., Sauviat M.P. (Eds.), *Toxines et recherches biomédicales*, Coll. Rencontres en toxicologie, Elsevier, Paris, pp. 305-13.
- Faure G., Bon C. (1987) Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American Rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus* *Toxicon* 25:229-34.
- Faure G., Bon C. (1988) Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from the South American Rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities *Biochemistry* 27:730-8.
- Faure G., Choumet V. (1992) Biochemical and immunochemical characteristics of crotoxin isoforms. In: Gopalakrishnakone P., Tan C.K. (Eds.), *Recent advances in toxicology research*, National University of Singapore pp. 449-63.
- Faure G., Choumet V., Bouchier C., Camoin L., Guillaume J.L., Monegier B., Vuilhorgne M. Bon C. (1994) The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Eur. J. Biochem.* 223:161-4.
- Faure G., Copic A., Le Porrier S., Gubensek F., Bon C., Krizaj I. (2003) Crotoxin acceptor protein isolated from *Torpedo electric organ*: binding properties to crotoxin by surface plasmon resonance. *Toxicon* 41:509-17.
- Faure G., Fourier A (2006) Etude du mécanisme d'action des phospholipases A₂ de venins de serpents par la résonance plasmonique de surface. In: Goudey-Perrière F., Benoit E., Goyffon M., Marchot P. (Eds.), *Toxines et cancer*, Coll. Rencontres en toxicologie, Elsevier, Paris, pp. 313-18.
- Faure G., Gowda V.T., Maroun R. (2007) Characterization of a human coagulation factor Xa-binding site on phospholipases A₂ from *Viperidae* snake venom by affinity binding studies and molecular bioinformatics. *BMC-Structural Biology* 7:82.
- Faure G., Guillaume J.L., Camoin L., Saliou B., Bon C. (1991) Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. *Biochemistry* 30:8074-83.
- Faure G., Harvey A.L., Thomson E., Saliou B., Radvanyi F. Bon C. (1993) Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. *Eur. J. Biochem.* 214:491-6.
- Fraenkel-Conrat H., Jeng T.W., Hsiang M. (1980) In: Eaker D., Wadstrom T. (Eds.), *Natural Toxins*, Pergamon, Oxford, pp. 561-7.
- Gubensek F., Krizaj I. (1997) Ammodytoxins (*Vipera ammodytes ammodytes*) In: Montecucco C., Rappuoli R. (Eds.), *Guidebook to Protein Toxins and their Use in Cell Biology*, Oxford University Press, pp. 224-6.
- Gubensek F., Ritonja A., Zupan J. Turk V. (1980) Basic proteins of *Vipera ammodytes venom*. Studies of structure and function. *Period. Biol.* 82:443-7.
- Hawgood B., Bon C. (1991) Snake venom presynaptic toxins. In: Tu A.T. (Ed.), *Handbook of Natural Toxins, Reptile and Amphibian Venoms*, Marcel Dekker, New York. Vol. 5, pp. 3-52.
- Hendon R.A., Fraenkel-Conrat H. (1971) Biological role of the two components of crotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68:1560-3.
- Hseu M.J., Yen C.-H., Tzeng M.-C. (1999) Crocalbin : a new calcium-binding protein that is also a binding protein for crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂. *FEBS Lett.* 445:440-4.
- Ivanovski G., Copic A., Križaj I., Gubenšek F., Pungercar J. (2000) The amino acid region 115-119 of ammodytoxins plays an important role in neurotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276:1229-34.
- Kini R.M. (2003) Excitement ahead: structure, fonction and mechanism of snake venom phospholipases A₂ enzymes. *Toxicon* 42:827-40.
- Krizaj I., Faure G., Gubensek F., Bon C. (1997) Neurotoxic phospholipases A₂ ammodytoxin and crotoxin bind to distinct high-affinity protein acceptors in *Torpedo marmorata electric organ*. *Biochemistry* 36: 2779-87.

- Lee C.Y., Tsai M.C., Chen Y.M., Ritonja A., Gubensek F. (1984) Mode of neuromuscular blocking action of phospholipases A₂ from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 268:313-24.
- Marchi-Salvador D.P., Correa L.C., Magro A.J., Oliveira C.Z., Soares A.M., Fontes M.R. (2008) Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A₂ formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Proteins* 72:883-91.
- Mounier C.M., Hackeng T.M., Schaeffer F., Faure G., Bon C., Griffin J.H. (1998) Inhibition of prothrombinase by human secretory phospholipase A₂ involves binding to factor Xa. *J. Biol. Chem.* 273:23764-72.
- Mounier C.M., Luchetta P., Lecut C., Koduri R.S., Faure G., Lambeau G., Valentin E., Singer A., Ghomashchi F., Béguin S., Gelb M.H., Bon C. (2000) Basic residues of human group IIA phospholipase A₂ are important for binding to factor Xa and prothrombinase inhibition. Comparison with other mammalian secreted phospholipases A₂. *Eur. J. Biochem.* 267:4960-9.
- Petan T., Krizaj I., Gubenšek F., Pungercar J. (2002) Phenylalanine-24 in the N-terminal region of ammodytoxins is important for both enzymic activity and presynaptic toxicity. *Biochem. J.* 363:353-8.
- Prijatelj P., Charnay M., Ivanovski G., Jenko Z., Pungercar J., Krizaj I., Faure G. (2006) The C-terminal and β -wing regions of ammodytoxin A, a neurotoxic phospholipase A₂ from *Vipera ammodytes ammodytes*, are critical for binding to factor Xa and for anticoagulant effect. *Biochimie* 88:69-76.
- Prijatelj P., Praznikar Z.J., Petan T., Krizaj I., Pungercar J. (2008) Mapping the structural determinants of presynaptic neurotoxicity of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* 51:1520-9.
- Pungercar J., Krizaj I. (2007) Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A₂. *Toxicon* 50:871-92.
- Pungercar J., Krizaj I., Liang N-S., Gubensek F. (1999) An aromatic, but not a basic residue is involved in the toxicity of group-II phospholipases A₂ neurotoxins. *Biochem. J.* 341:139-45.
- Radvanyi F., Bon C. (1982) Catalytic activity and reactivity with p-bromophenacyl bromide of the phospholipase subunit of crotoxin ; influence of dimerization and association with the noncatalytic subunit. *J. Biol. Chem.* 257: 12616-32.
- Renetseder R., Brunie S., Dijkstra B.W., Drenth J., Sigler P.B. (1985) A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom, *J. Biol. Chem.* 260 :11627-34.
- Saul F.A., Prijatelj P., Vuilliez-le Normand B., Villette B., Krizaj I., Raynal B., Faure G. (2008) Crystal structure of two isoforms of ammodytoxin, neurotoxic and anticoagulant phospholipases A₂ from *Vipera ammodytes ammodytes*. (Submitted).
- Stefansson S., Kini R.M., Evans. HJ. (1990) The basic phospholipase A₂ from *Naja nigricollis* venom inhibits the prothrombinase complex by a novel nonenzymatic mechanism. *Biochemistry* 29:7742-6.
- Thouin L.G., Ritonja A., Gubensek F., Russell F.E. (1982) Neuromuscular and lethal effects of phospholipase A from *Vipera ammodytes* venom. *Toxicon* 20:1051-8.



Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales

Depuis plus de cinquante ans, les études de la fonction cholinergique synaptique ont été tout à la fois ininterrompues et productives dans le monde entier, et singulièrement en France. Dans ces recherches, la pharmaco-toxicologie tient une place de premier rang. Comment identifier, parfois isoler, un récepteur sans disposer d'un ligand de haute affinité, souvent une toxine puissante ? Comment distinguer les différents sous-types d'un récepteur sans avoir en mains une batterie de ligands spécifiques ? Comment analyser le fonctionnement d'une synapse sans en modifier le fonctionnement à l'aide de multiples effecteurs, agonistes ou antagonistes ? Peu à peu, au-delà de la synapse et de la notion de médiateur synaptique, l'existence de fonctions cholinergiques non neuronales devient une évidence. Cet ouvrage d'actualité n'a pas la prétention de couvrir tout le champ d'un immense domaine de recherches, constamment renouvelé, mais vise plutôt à présenter des résultats originaux parmi les plus récents, de façon à satisfaire la curiosité d'un public aussi large que possible, au-delà des seuls spécialistes.

Max Goyffon,
Muséum national d'Histoire naturelle

