

210

# Cartographie du venin de *Scodra griseipes* (Theraphosidae)

C. Lange\*, C. Paris\*, M.L. Celerier°, J.-C. Cherton\* & J.-J. Basselier\*

\* Laboratoire de Chimie Organique Structurale, CNRS URA 455

° U.F.R. des Sciences de la vie, CNRS URA 689

Université P. et M. Curie, 4 Place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05. FRANCE.

## Résumé

Nous avons envisagé une nouvelle approche de l'étude d'un venin par élaboration de sa cartographie. Sont examinées les diverses caractéristiques du venin brut du point de vue de la biologie et de l'analyse chimique : la dose létale 50 chez la souris, le dosage des protéines, les empreintes réalisées au moyen de la spectroscopie en Ultra-Violet, l'électrophorèse, la Chromatographie Liquide Haute Performance, la Résonance Magnétique Nucléaire du proton. Les résultats de ces études montrent que les caractéristiques biologiques et structurales des venins bruts de *Scodra griseipes* mâles et femelles sont différentes.

La suite de ce travail préliminaire consiste en l'isolement et l'analyse des constituants du venin brut. La séparation par HPLC est réalisée sur une colonne TSK G3000 SW ainsi que par électrophorèse (SDS-PAGE). Les fractions obtenues sont analysées par Spectroscopie Ultra-Violette. Une seule parmi elles provoque chez la souris des effets neurotoxiques semblables à ceux obtenus avec le venin brut.

## Summary

A new approach is elaborated for the description of the crude venom of *Scodra griseipes*. Biological and structural behaviours are used to discriminate male and female venoms. Lethal dose 50 on the mouse is given. Differentiation using Ultra-Violet and Infrared spectroscopy are presented. Electrophoresis, High-Performance Liquid Chromatography and  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance show the sexual discrimination between the two venoms.

The venom components of *Scodra griseipes* are isolated and chemically analysed. The fractionation of crude venom using HPLC is performed with TSK G3000 SW column. The fractions are subjected to electrophoresis (SDS-PAGE). Toxicity studies of each fractions are tested on the mouse. One of these fractions presents the same neurotoxic effects on the mouse as crude venom. These components are also analysed using Ultra-Violet.

Les venins du mâle et de la femelle de *Scodra griseipes* étant totalement inconnus, il nous a d'abord paru intéressant de les distinguer tant par des caractéristiques biologiques que structurales. L'isolement et l'analyse des constituants du venin brut feront suite à ce travail préliminaire. Nous rappelons que *Scodra griseipes* est une mygale africaine et que jusqu'à ce jour seule *Pterinochilus sp.*, également originaire d'Afrique, a fait l'objet d'une étude de venin (1,2,3). Les venins de plusieurs mygales américaines ont pour leur part intéressé un plus grand nombre de chercheurs (4).

---

Dans cet article sont rassemblés les données correspondant à deux posters présentés lors du Colloque.

## I Cartographie du venin brut

- Les venins sont constitués de 10% seulement de matière sèche. Grâce à la méthode de Lowry modifiée par Peterson (5), nous avons déterminé le pourcentage de protéines contenues dans le venin lyophilisé de *Scodra griseipes*. Les résultats présentés dans le tableau I montrent que la concentration protéique du venin des femelles est plus faible que celle des mâles.

Tableau I : Dosage des protéines du venin lyophilisé de *Scodra griseipes*

Araignée	% de protéines
femelle	48
mâle	80

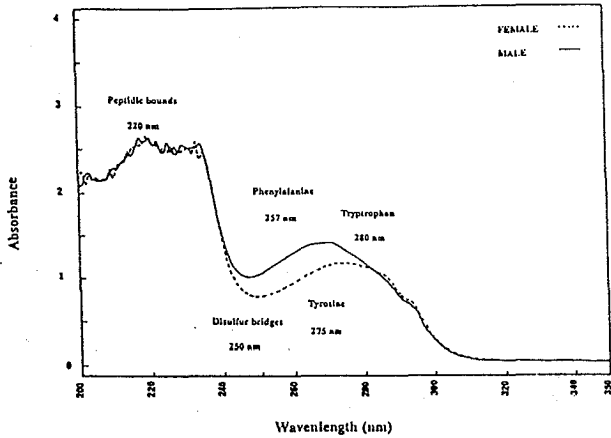
- Le pH de solutions de venin à 0,5 mg/ml dissous dans de l'eau désionisée est de 5,5 pour le mâle comme pour la femelle. Le venin est donc de nature acide.

La spectroscopie UV du venin de *Scodra griseipes*, la RMN ainsi que des méthodes de séparation telles que l'électrophorèse et la Chromatographie Liquide Haute Performance ont permis de différencier le venin du mâle de celui de la femelle.

- Les spectres UV sont obtenus à partir de solutions à 0,5 mg/ml d'eau désionisée sur un spectrophotomètre 8450 UV/VIS Hewlett-Packard. Lorsqu'ils sont superposés, outre la bande d'absorption à 220 nm, ils montrent un maximum d'absorption vers 270 nm ( $\lambda^*$ ) et des coefficients d'extinction molaire différents (figure I). La bande de longueur d'onde  $\lambda^*$  du venin de femelles est de 275 nm, celle du venin de mâles est de 270 nm.

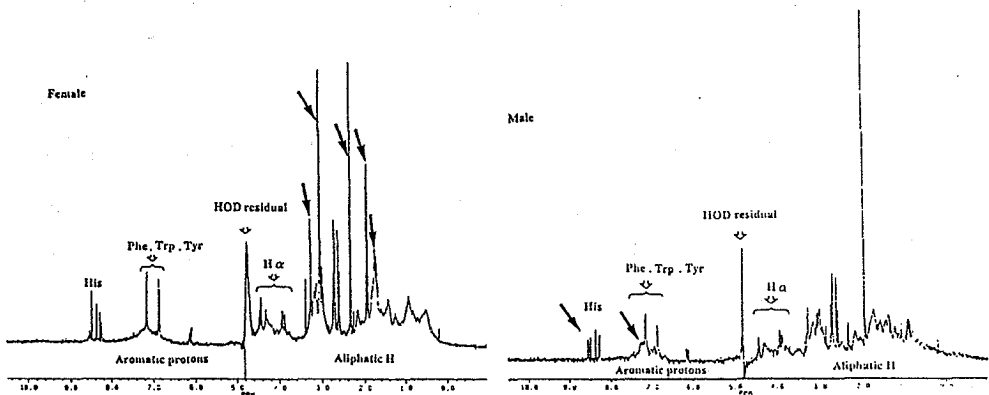
Le rapport d'absorption  $A_{280}/A_{260}$  calculé dans les deux cas est supérieur à 1, ce qui révèle la présence majoritaire des protéines par rapport à des nucléotides (6).

Figure I : Spectres UV du venin brut lyophilisé de *Scodra griseipes*



- Les spectres RMN ont été enregistrés après échange des protons labiles avec l'eau lourde, à 25°C, sur un appareil à 500 MHz Brücker. Les spectres des venins de femelles et de mâles présentent des différences notables dans la zone des protons aliphatiques (figure II).

Figure II : Spectres RMN  $^1\text{H}$  du venin de *Scodra griseipes*

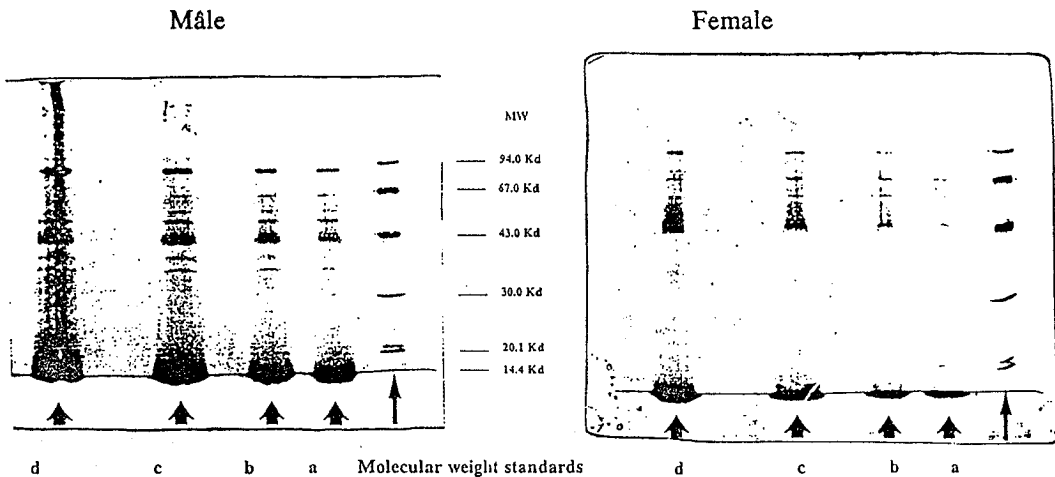


Deux types d'électrophorèse (SDS-PAGE) ont été envisagés pour l'étude du venin. Le premier avec un gel de polyacrylamide à 10% permettant de séparer des molécules protéiques dont le poids moléculaire varie de 14 000 à 100 000 daltons

environ. Des quantités variables allant de 38  $\mu\text{g}$  à 300  $\mu\text{g}$  de venin brut lyophilisé sont chargées sur ces gels. Les protéines sont révélées par du bleu de Coomassie R. La figure III présente les résultats obtenus.

Figure III : Gels de SDS-PAGE à 10% des venins de mâles et femelles

Dans ce système ont été employés comme marqueurs de masse les protéines et polypeptides suivants : la phosphorylase B (PM = 94 000d), la sérum albumine bovine (PM = 67 000d), l'ovalbumine (PM = 43 000d), l'anhydrase carbonique (PM = 30 000d), un inhibiteur de la trypsine (PM = 20 100d), la lactalbumine (PM = 14 100d).



(a) 38  $\mu\text{g}$ , (b) 75  $\mu\text{g}$ , (c) 150  $\mu\text{g}$ , 300  $\mu\text{g}$  de venin lyophilisé

Les venins de mâles et de femelles sont fractionnés par SDS-PAGE à 10%. Le tableau II montre que le venin de mâles se distingue du venin de femelles par 3 bandes de poids moléculaires 35 000, 53 000 et 67 000d.

Nous remarquons également que la coloration des bandes protéiques du gel de venin de mâle est plus intense que celle du venin de femelles. Ce résultat indique que la concentration protéique du venin de mâles est supérieure à celle du venin de

femelles, à quantités déposées identiques. Ceci confirme les résultats obtenus précédemment par le dosage des protéines (méthode de Lowry modifiée par Peterson).

Tableau II : Poids moléculaires des bandes observées sur les gels de SDS-PAGE à 10% chez *Scodra griseipes*

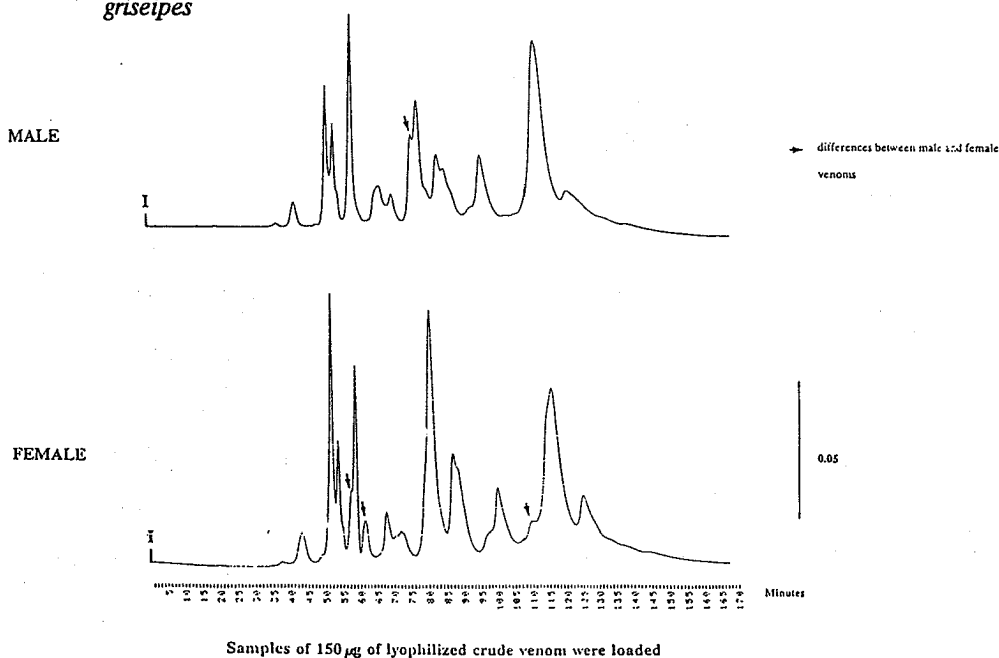
PM (kd)	mâles	femelles
81-86	+	+
69-71	+	+
67	-	+
59-61	+	+
56-58	+	+
53	-	+
51	+	+
48	+	+
41-42	+	+
37-38	+	+
35	-	+

Sont alors entrepris des SDS-PAGES à 12,5% permettant de localiser des polypeptides de poids moléculaires compris entre 2000 et 12 500d environ. Les marqueurs de masse utilisés couvrent une gamme de poids moléculaires allant de 2800 à 12 400d. Les gels des venins de mâles comme de femelles présentent une bande importante vers 2400d.

La séparation de différentes fractions a été réalisée par filtration sur gel sur une colonne TSK G3000 SW de 7,5 x 600 mm montée sur un chromatographe Merck (pompes I-6200, détecteur UV L-4000, intégrateur D-2500). La colonne est équilibrée puis éluée avec un tampon acétate d'ammonium 0,5M de pH 6,8 contenant 0.05% de

$\text{NaN}_3$ . Le débit est de 30 ml/hr. Les éluats sont suivis par détection UV à la longueur d'onde de 280 nm. A nouveau, on note des différences entre venins de mâles et de femelles, en ce qui concerne les fractions III-3, IV-4, V-5, VI-6, VII-7 et IX-9 (figure IV).

Figure IV : Chromatogrammes des venins du mâle et de la femelle de *Scodra griseipes*

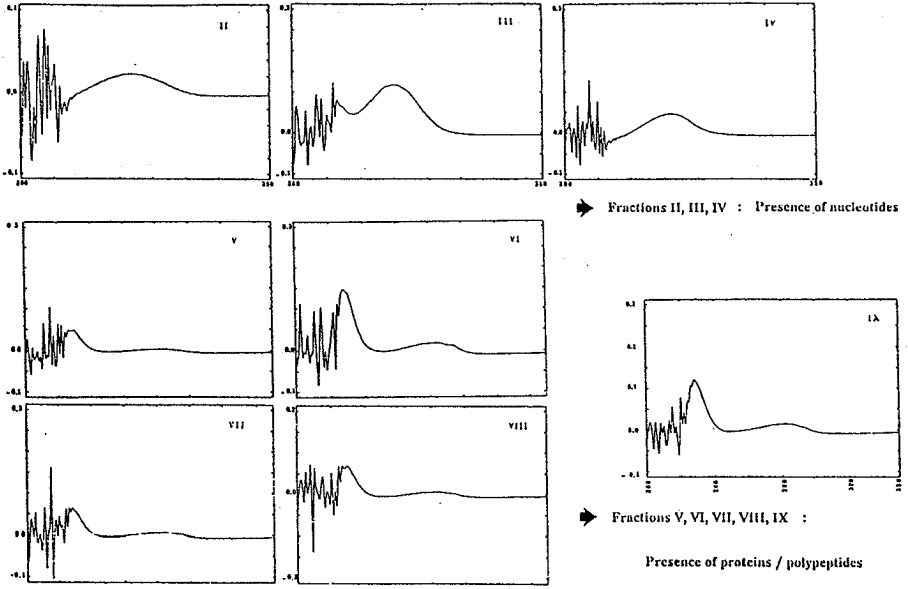


## II Cartographie des fractions du venin de femelles

Les fractions HPLC du venin de femelles (venin le plus toxique) sont recueillies, lyophilisées et étudiées à nouveau du point de vue de leur toxicité puis, en spectroscopie UV et en électrophorèse à 12,5%.

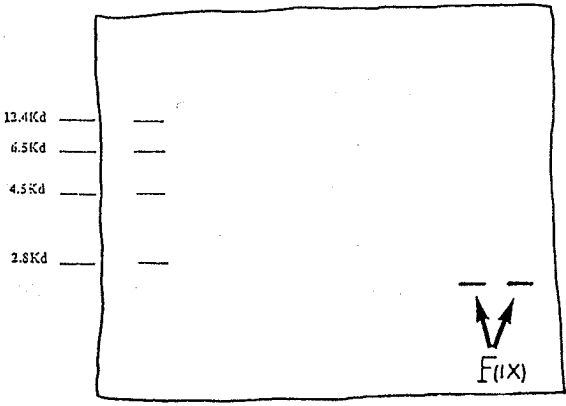
Les spectres UV des fractions II, III, IV ont un maximum d'absorption à 260 nm que nous supposons être dû à des nucléotides. En revanche, les fractions V, VI, VII, VIII et IX ont un maximum d'absorption à 280 nm, ce qui correspond à la présence de protéines ou de polypeptides (figure V).

Figure V : Spectres UV des fractions HPLC II à IX du venin de femelles de *Scodra griseipes*



La toxicité de chacune des fractions a été testée chez la souris. Les conditions opératoires sont les mêmes que celles précédemment utilisées pour le venin brut (7). Seule la fraction IX présente un caractère toxique. Les symptômes qu'elle provoque sont semblables à ceux observés avec le venin brut.

Figure VI : Gel de SDS-PAGE à 12,5% de la fraction IX du venin de femelles de *Scodra griseipes*



La fraction IX est alors étudiée en électrophorèse (SDS-Page à 12,5%). Une seule bande vers 2400d est détectée dans ces conditions (figure VI). La fraction toxique du venin de femelles de *Scodra griseipes* est donc de nature polypeptidique.

### Bibliographie

- 1- Z. Maretic. *Animal toxins, collection of papers presented at the first International Symposium on animal toxins*, Atlantic city, New Jersey, U.S.A., Aprim 9-11, 1966, F. E. Russell and P. R. Saunders, Eds, 23-28, Pergamon press, 1967.
  - 2- B. A. Perret. *Toxicon*, 1974, 12, 303-310.
  - 3- M. Bachmann. *Toxicon*, 1982, 20, N°3, 547-552.
  - 4- M.-L. Célérier, C. Paris, C. Lange, J.-J. Basselier. Trente ans d'étude des venins d'animaux et particulièrement ceux des araignées Theraphosides. *Actes du 12<sup>ème</sup> Colloque Européen d'Arachnologie*, 2-4 Juillet 1990, Paris, France.
  - 5- G. L. Peterson. *Analytical biochemistry*, 1977, 83, 346-356.
  - 6- M. Hori. *Meth. Enzym.*, 1970, 12A, 381.
  - 7- M.-L. Célérier, C. Paris, C. Lange, J.-J. Basselier. Contribution à la connaissance du venin de la mygale africaine *Scodra griseipes* Pocock, 1897 (Theraphosidae). *Actes du 12<sup>ème</sup> Colloque Européen d'Arachnologie*, 2-4 Juillet 1990, Paris, France.
-