

30

Trente ans d'étude des venins d'animaux et particulièrement ceux des araignées Theraphosides

M.L. Celerier^o, C. Paris*, C. Lange* & J.-J. Basselier*

* *Laboratoire de Chimie Organique Structurale, CNRS URA 455*

^o *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 dénombré les principaux articles traitant des venins d'animaux et de leurs toxines publiés entre 1960 et 1989. Nous avons alors comparé, au cours de ces trente dernières années, l'évolution du nombre de travaux au sein de différents groupes zoologiques.

Nous nous sommes particulièrement intéressés au cas des araignées et parmi elles aux mygalomorphes de la famille des Theraphosidae. Le peu d'études consacrées aux venins d'araignées et un intérêt récent des chercheurs sont mis en évidence par comparaison avec les nombreuses publications consacrées à d'autres catégories d'animaux venimeux.

L'état actuel des connaissances et le développement des travaux sur les venins de Theraphosidae sont présentés. Parmi ces mygales, une seule espèce africaine a été étudiée.

Summary

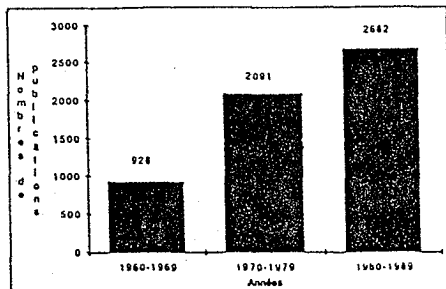
A review is given on the evolution, over the last three decades, of the major articles about animal venoms and their toxins, especially those of the Theraphosid spiders. Considerations on the present knowledge and its development about the venom of these spiders are based on a brief survey of the literature. Venom features have been studied in only one african Theraphosidae.

A travers l'analyse du nombre de travaux concernant les venins animaux*, nous avons tenté de comparer l'évolution de l'intérêt qui leur est porté au cours de ces trentes dernières années. Etudiant le venin d'une Theraphosidae (1, 2), nous avons examiné le cas des araignées et plus particulièrement celui des mygalomorphes de cette famille.

Le nombre d'articles sur les venins ayant triplé en 30 ans (figure I), il est clair que l'intérêt qui leur est porté a fortement augmenté.

* Les sources bibliographiques utilisées sont : les Chemical abstract et les Listes annuelles des travaux arachnologiques établies par le "Centre International de Documentation Arachnologique" (CIDA).

Figure I : Evolution du nombre de publications sur les venins animaux de 1960 à 1989



Les venins de serpents sont les plus étudiés (figure II) et donc les mieux connus. Ces reptiles sont responsables d'un grand nombre d'accidents graves. Ils peuvent fournir des quantités importantes de venin, ce qui facilite les analyses. Si l'intérêt envers les insectes, les scorpions et les animaux marins a évolué de manière à peu près constante de 1960 à 1989, celui porté aux venins d'araignées, s'est considérablement accru (figures II et III). Malgré tout, ces derniers restent les "parents pauvres" de telles études, en raison peut-être du faible nombre d'envenimations répertoriées chez les humains.

Figure II : Comparaison du nombre de publications sur les venins chez divers groupes d'animaux entre 1960 et 1989

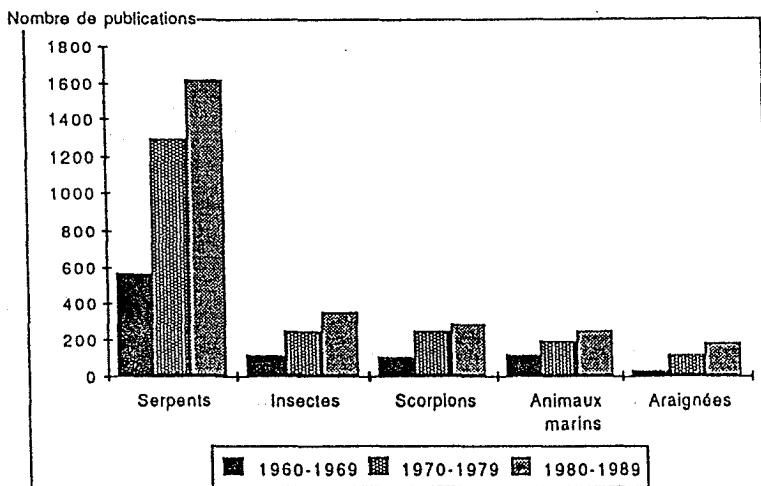
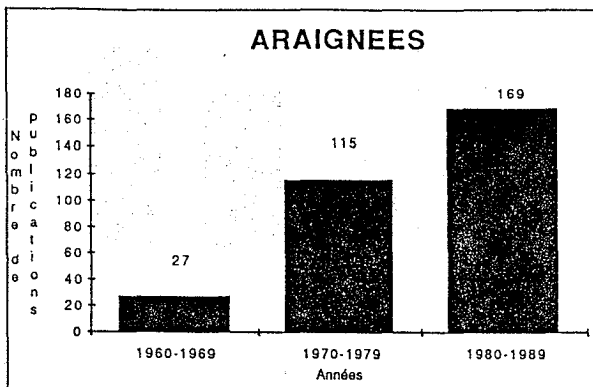
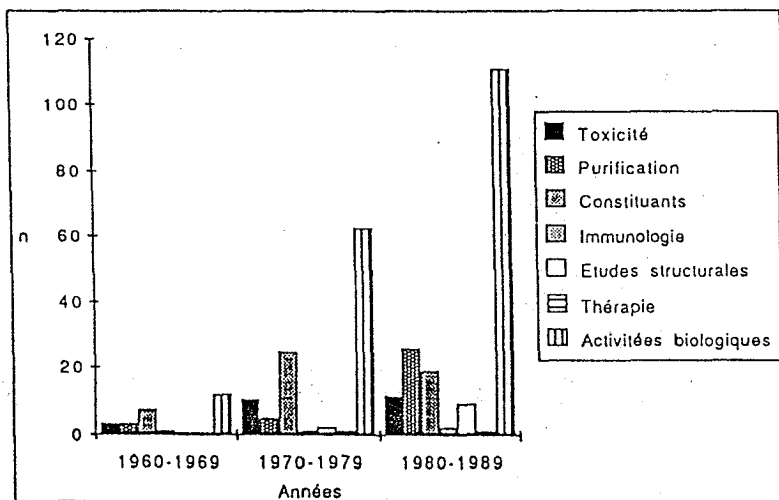


Figure III : Evolution du nombre de publications sur les venins d'araignées de 1960 à 1989



Les premiers travaux sur les venins d'araignées ont d'abord consisté à purifier les divers constituants de ces mélanges complexes et surtout à rechercher leur activité biologique, ce qui explique le grand nombre d'articles parus dans ces domaines (figure IV). En revanche, les études structurales et immunologiques n'apparaissent qu'au cours des deux dernières décennies. Elles restent néanmoins peu développées.

Figure IV : Nombre de publications (n) par domaines d'études des venins d'araignées de 1960 à 1989



La bibliographie concernant les venins de Theraphosidae n'est composée que de 12 publications de langue anglaise, ce qui représente seulement environ 4% des références sur les venins d'araignées. Ont été étudiées : *Pterinochilus sp.* (3, 8, 11), *Dugesiella hentzi* (4, 5, 7, 9, 13, 14), *Aphonopelma sp.* (4, 5), *Aphonopelma emilia* (4), *Aphonopelma seemanni* (9), *Brachypelma albopilosum* (6), *Brachypelma smithii* (9, 10), *Brachypelma emilia* (9), *Eurypelma californicum* (12), soit 9 espèces parmi les 650 Theraphosidae répertoriées à ce jour (15). Toutes ces mygales sont originaires du continent américain à l'exception de *Pterinochilus sp.* localisée en Afrique.

Les principaux résultats de ces 12 articles sont rassemblés en annexe.

Certains composés des venins de ces mygales ont été ainsi identifiés : la hyaluronidase, des peptides toxiques (poids moléculaires de 4000 à 8000 d), des polyamines (spermine, cadavérine...), des nucléotides (ATP, ADP, AMP), des acides aminés (acide aspartique, acide glutamique, acide γ -amino butyrique).

Ces venins sont des mélanges complexes. Certains de leurs constituants sont communs à toutes les araignées, d'autres sont propres à chaque espèce. Ils présentent actuellement un intérêt pour la recherche de molécules nouvelles (16, 17, 18, 19).

Bibliographie

- 1- 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^{ème} Colloque Européen d'Arachnologie*, 2-4 Juillet 1990, Paris, France.
- 2- C. Lange, C. Paris, M.-L. Célérier, J.-C. Cherton, J.-J. Basselier. Cartographie du venin de *Scodra griseipes* (Theraphosidae). *Actes du 12^{ème} Colloque Européen d'Arachnologie*, 2-4 Juillet 1990, Paris, France.
- 3- M. Bachmann. *Toxicon*, 1982, 20, N°3, 547-552.
- 4- S. G. Cabbiness, C. W. Gehrke, K. C. Kuo, T. K. Chan, J. E. Hall, S. A. Hudiburg, G. V. Odell. *Toxicon*, 1980, 18, 681-683.
- 5- T. K. Chan, C. R. Geren, D. E. Howell, G. V. Odell. *Toxicon*, 1975, 13, 61-66.
- 6- T. Friedel, W. Nentwig. *Toxicon*, 1989, 27, N°3, 305-316.
- 7- C. L. Lee, T. K. Chan, B. C. Ward, D. E. Howell, G. V. Odell. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1974, 164, 341-350.
- 8- Z. Maretic. animal toxins, collection of papers presented at the first International Symposium on animal toxins, Atlantic city, New Jersey, U.S.A., April 9-11, 1966, F. E. Russell and P. R. Saunders, Eds, 23- 28, Pergamon press, 1967.

- 9- G. V. Odell, S. A. Hudiburg, M. Herrero, S. G. Cabbiness, T. K. Chan, S. Aird, I. Kaiser. 9th World Congress on animal, plant and microbial toxins, 31 July-5 August 1988, Stillwater, Oklahoma, U.S.A.. *Toxicon*, 1989, 27, N°1, 67.
- 10- G. V. Odell, S. A. Hudiburg, C. L. Ownby, M. V. Herrero, S. D. Aird, I. Kaiser. 2nd International Symposium on neurotoxins in neurobiology, December 1988, Solis, Uruguay. *Toxicon*, 1989, 27, N°8, 835.
- 11- B. A. Perret. *Toxicon*, 1974, 12, 303-310.
- 12- A. Savel-Niemann. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1989, 370, 485-498.
- 13- F. L. Schanbacher, C. K. Lee, J. E. Hall, I. B. Wilson, D. E. Howell, G. V. Odell. *Toxicon*, 1973, 11, 21-29.
- 14- F. L. Schanbacher, C. K. Lee, I. B. Wilson, D. E. Howell, G. V. Odell. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1973, 44B, 389-396.
- 15- A. M. Smith. The Tarantula classification and identification guide, Fitzgerald Publishing London, 1988, 178p.
- 16- H. Jackson, P. N. R. Usherwood. *TINS*, 11, N°6, 1988.
- 17- D. Quicke. *New Scientist*, November 1988, 38-41.
- 18- H. Jackson, T. N. Parks. *Ann. Rev. Neurosci.*, 1989, 12, 405-414.
- 19- N. A. Saccomano, R. A. Volkmann, H. Jackson, T. N. Parks. *Annual reports in medicinal chemistry*, 1989, 24, 287-293.

Annexe : Bilan des travaux sur les venins de Theraphosidae de 1960 à 1989.

11 ▶ Isoelectric focusing : LKB column 8101 ➔ 16 Components

9 had isoelectric points between pI 7.0-10.5



7 had isoelectric points below 7.0

▶ Gel filtration : Sephadex G-50 fine ➔ 11 peaks



Substances of molecular weights from about 5000 to 20000 d

Pterinochilus sp. (3, 8, 11)

▶ Electrophoretic separations : 6% and 10% acrylamide gels



18 bands

▶ Lethality tests (mice 18-22g, cockroaches ≈ 1g)

Intravenous administration	{ LD50 (mice) = 3.3 µg/g (range 2.2-5.5 µg/g) LD50 (mice) = 3.9 µg/g (range 3.5-4.4 µg/g)	female venom
		male venom
Subcutaneous	{ LD50 (mice) = 8.2 µg/g (range 6.8-9.6 µg/g) LD50 (mice) = 5.4 µg/g (range 5.3-5.5 µg/g)	} female venom
Intraperitoneally		

LD50 (cockroaches) = 45.4 µg/g

3 ▶ Gel filtration : Sephadex G-50 ➔ 9 peaks

Peaks 1-3 : hyaluronidase activity



Peaks 4-7 : basic components, produced severe toxic effects in mice

Peak 8-9 : salts, non toxic material (adenosine nucleotides)

▶ Ion exchange chromatography of peak 4 (A4) : CM-Sephadex C-25 ➔ 6 fractions



Fraction A4/4 show the highest toxicity in mice

▶ Disc electrophoresis : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of fraction A4/4 (15%)



MW(A4/4) 10500d

▶ Isoelectric focusing of purified toxin A4/4 : LKB column 8101



single peak at pI 9.39

▶ Amino acid analysis : ➔ 77 residues

5 Lys, 8 His, 6 Arg, 7 Asp, 4 Thr, 4 Ser, 1 Glu, 7 Gly, 5 Ala, 8 Cys, 4 Ile, 4 Leu, 7 Tyr, 6 Phe, 1 Trp

▶ Toxicity studies :

LD50 (crude venom) = 1.5 µg/g

SC

LD50 (fraction A4/4) = 0.1 µg/g



male mice 18-22g

- ▶ Lethality tests : white mice of $\approx 20g$

Intravenous LD50 \rightarrow LD50 of fresh venom for mice = $8.95 \mu g/g$
 \rightarrow LD50 of lyophilized venom for mice = $8.92 \mu g/g$

- ▶ Paper electrophoresis :

\rightarrow 5-7 components

- ▶ Direct spider bites :

\rightarrow mice : death ensued from 1 min to 3 hr after
 \rightarrow guinea pigs : death ensued from 35 min to 25 hr after

Dugesia hentzi (7, 13, 14)

13

- ▶ Disc gel electrophoresis : 7% acrylamide gels

≈ 8 acidic components, ≈ 7 basic components

- ▶ SDS-polyacrylamide gel (6%) electrophoresis :

MW(peak 1) = 150000

\rightarrow MW(peak 2) = 87000

\rightarrow MW(hyaluronidase, peak 3) = 39000

\rightarrow MW(peak 5) < 5000

- ▶ Gel filtration : Sephadex G-100 medium

5 components \rightarrow peak 3 : hyaluronidase (MW 37000)

\rightarrow peak 4 : cockroach toxin (MW 7300)

\rightarrow peak 5 : salts and γ -amino butyric, glutamic and aspartic acid

- ▶ Toxicity studies :

injected intra-abdominally \rightarrow LD50 (mice) = $0.3 \mu l/g$
 \rightarrow LD50 (cockroaches) = $0.31 \mu l/\text{adult male}$

- ▶ Two-dimensional paper chromatography of amino acid :

\rightarrow Glutamic, Aspartic and γ -amino butyric acid

- ▶ UV spectrum :

\rightarrow λ_{\max} = 258 nm presence of nucleotide or cofactor

- ▶ Lowry's protein assay : protein concentration of $200 \mu g/\mu l$

- ▶ pH = 5.44

- ▶ Hyaluronidase activity / no Phospholipase A, Chitinase, protease activity

• Hyaluronidase assays (Turbidimetric assay)

→ high activity

- Gel filtration purification of D.hentzi hyaluronidase Sephadex G-100 medium

→ peak 3 contained the hyaluronidase activity

→ Apparent MW 37000

- Isoelectric focusing LKB Model 8101 column

→ pI(hyaluronidase) 6.8

- Disc gel electrophoresis 7% acrylamide gel purity of hyaluronidase from gel filtration

→ single band

- SDS-polyacrylamide gel (6%) electrophoresis

→ MW 39000

- Amino acid composition 356 amino acid residues

→ 48 Lys, 6 His, 9 Arg, 13 Cys, 36 Asp, 22 Thr,

28 Ser, 32 Glu, 22 Pro, 31 Gly, 18 Ala, 17 Val, 16 Ile,

20 Leu, 13 Tyr, 15 Phe, 4 Met, 6 Try

7

- Gel filtration Sephadex G-25

→ peaks A, B, C peak A : contained the necrotoxin

Sephadex G-100 4 peaks

→ peak 3 : hyaluronidase (MW 39000)

→ peak 4 : necrotoxin (MW 6000-7000)

- Ion exchange chromatography CM- Sephadex

→ 2 peaks The major protein peak : necrotoxin

- Isoelectric focusing of purified necrotoxin LKB model 8101 column

→ pI 10.0

- Polyacrylamide gel electrophoresis peak 4 15% polyacrylamide

→ single band

- SDS-polyacrylamide gel 15%

→ one peak MW 6500

- Amino acid analysis 59 amino acid residues

16 Lys, 2 Asp, 1 Thr, 2 Ser, 6 Glu, 4 Pro, 6 Gly, 8 Cys, 1 Val, 5 Ile, 3 Leu, 4 Phe, 1 Trp

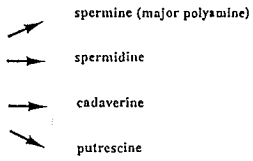
- Toxicity tests conducted with Sephadex G-25 fractions Intraperitoneal mice (30g)

→ peak A toxic to mice

→ peak B toxic to mice

Dugesia hentzi (4), *Aphonopelma* sp. (4, 5), et *Aphonopelma emilia* (4)

4 ▶ Ion-exchange method : identification of polyamine



▶ Spermine : nephrotoxic action in mice, rats, guinea pigs, dogs

Spermidine : toxic action in mice

5 • Gel filtration (Sephadex G-25) 5 peaks

- Peak 1 : hyaluronidase (MW 39000d)
- Peak 2 : necrotoxin (MW 6700d)
- Peak 3 : low molecular weight peptide (insect tox)
- Peak 4, 5 : nucleotides

• Ion exchange chromatography of peak 4 (DEAE-Sephadex A-25)

→ 3 peaks : adenosine 5'-triphosphate (in the highest amount), adenosine 5'-diphosphate, adenosine 5'-phosphate

• Thin-layer chromatography (MN 300 Cellulose/Silica gel G)

→ identification of the nucleotides

• Lethality tests (mice 30-32g)

- LD50 (necrotoxin) = 8.5µg/g
- LD50 (adenosine triphosphate) = 2.4 mg/g
- LD50 (necrotoxin + 0.6mg ATP) = 2.3µg/g
- LD50 (necrotoxin + 1.2mg ATP) = 1.3µg/g

SYNERGISTIC TOXIC EFFECTS OF ATP WITH THE PURIFIED NECROTOXIN

Brachypelma albopilosum (6)

6 • Venom quantities

16 ± 5 µl/spider

Protein determination

120 ± 20 µg/µl of venom

Toxicity

Tenebrio molitor, Blatta orientalis

LD50(T.m.) = 757 nl - LD50(B.o.) = 6.9 nl

LD50(T.m.) = 34.4 nl - LD50(B.o.) = 147 nl

Eurypelma californicum (12)

- pH 5.3 ± 0.3
- UV-absorption spectra
 - single maximum : 258 nm / pH 7.0
 - one maximum at 328 nm / pH 8.0
 - one maximum at 258 nm
- Toxicity tests
 - ↳ LD50 (male cockroaches) = 0.40 µl/g body weight
 - ↳ LD50 (female cockroaches) = 0.15 µl/g body weight
- Protein concentration (Biuret reaction)
 - 65 mg/ml (30-110 mg/ml)
- SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
 - 3 major components MW 40000, 43000, 13300
 - ↳ not a peptide
- Presence of
 - trace components MW 8000, 10000, 40000
 - ATP/ADP/AMP/Glu/GABA/Asp/Glucose/K⁺/Na⁺/Ca²⁺/Mg²⁺/Cl⁻
- Gel chromatography ● Sephadex G-25 sf
 - 4 peaks
 - Sephadex G-100 sf of peak I,II
 - peak I : hyaluronidase (turbidimetric assay) MW (SDS-PAGE) 40000
 - peak II : mixture of peptides
 - peak III : mixture of polyamine compounds (MW 13300)
 - peak IV : ATP
- RP-HPLC Merck Li Chro CART 124-4 supersphere 100 RP-18
 - 13 peaks
- Ion-exchange HPLC (Serra DEAE SI 100 polyol)
 - fraction 1 : ATP
 - fraction 2 : component 2' / AMP, ADP, ATP
 - fraction 3 : component 3' / ATP
- SDS-gel electrophoresis Amino acid analysis
 - fraction 1 : not protein ATP, Glu, Asp, ³H-aminobutyric acid
 - fraction 2', 3', 4, 5, 6 : bands of MW 1300
 - fraction 7 : a band between MW 1300-4300
 - peptides { fractions 8-13 : toxic peptides / MW 4300 fraction 9 : MW 4300 + mw 10000
- Thin-layer electrophoresis
 - fraction 1 : Glu, Asp, ³Haminobutyric acid
 - fraction 2' : substance consisting of polyamine spermine
 - fractions 4, 5, 6 : substances consisting of polyamine spermine
 - UV spectra
 - fraction 5, 6 : maximum at 328 nm : aromatic amino acids
 - fraction 7 : my absorption maximum : no aromatic amino acids
 - fractions 8-13 : typical protein spectra