

ÉTUDE TOXICOLOGIQUE ET ANALYTIQUE DU VENIN DE *CONUS TESSULATUS*

par

J.-L. BOEHRER (1), S. SOLAR (2), H. RABESANDRATANA (3) et P. COULANGES (4)

En 1971, BRYGOO et RABESANDRATANA (1) mettaient en évidence pour la première fois l'action toxique du venin de *Conus tessulatus* (BORN 1778) sur la souris.

Nous avons essayé d'aller plus avant dans la connaissance de ce dernier par l'étude :

— d'une part de la toxicité sur la souris par voie IV en fonction de la teneur en protéines totales de l'extrait glandulaire injecté (détermination de la dose minima mortelle) ;

— d'autre part des « principes toxiques » du venin suivant les caractéristiques ci-après : taille moléculaire, mobilité électrophorétique, propriétés immunologiques.

Nous nous sommes particulièrement intéressés aux protéines car, au cours d'une étude portant sur *Conus geographus*, MAITROT (2) avait conclu à la nature protéique et globulinique des « principes toxiques » du venin sur des arguments : d'affinité de coloration vis-à-vis de l'amidoschwartz, de détoxification efficace par le formol dilué, de niveau de migration électrophorétique. Il avait de même démontré l'intérêt de travailler sur la partie tubulaire car c'est dans cette partie de la glande à venin que se concentre la « toxine ».

I. — MATÉRIEL

— Il s'agit de 23 cônes récoltés à Tuléar et conservés au congélateur jusqu'au moment de leur utilisation.

(1) Volontaire du Service national, Institut Pasteur, Pharmacien-biologiste.

(2) Pharmacien des Armées, Docteur en Pharmacie.

(3) Directeur Station marine, Tuléar.

(4) Médecin des Armées, Chef de laboratoire Institut Pasteur.

— Les coquilles sont cassées entre les mors d'un étai et après décongélation on prélève par dissection l'appareil veineux comportant la « glande » de Leiblin et le tube formant son prolongement vers la trompe. On obtient ainsi 23 glandes ; mais nous ne travaillerons que sur l'ensemble des 23 tubes correspondants.

— On leur fait subir une série de congélation-décongélation et broyage dans un petit mortier, le broyat étant à chaque fois épuisé par une solution de tampon phosphate (pH 7,2). L'extrait tubulaire ainsi obtenu est amené à 10 ml et réparti en 10 flacons de 1 ml pour lyophilisation.

— Le dosage de protéines totales par microméthode nous indique qu'il y a 2,2 mg de protéines par ml d'extrait tubulaire, soit 22 milligrammes pour les 23 tubes, soit environ 1 milligramme de protéines dosées par tube d'appareil veineux.

2. — EXPÉRIMENTATION

I. DÉTERMINATION DE LA DOSE MINIMA MORTELLE CHEZ LA SOURIS PAR VOIE IV (VEINE CAUDALE)

Nous utilisons le produit lyophilisé reconstitué extemporanément avec de l'eau distillée.

Les résultats sont consignés dans le tableau I : durée de survie des souris en fonction de la dose injectée exprimée en millilitre ; entre parenthèses la teneur en protéines, exprimée en milligramme.

TABLEAU I

Souris n°	0,1 ml (0,22)	0,2 ml (0,44)	0,33 ml (0,66)
1	S < 3'	S = 1'30"	S = 3'
2	S > 2 h	S = 3'	
3	S > 2 h	S = 2 h	
témoin	0 signes	0 signes	0 signes

S < à = survie inf. à ; S > à = survie sup. à ; le témoin était injecté avec une quantité égale de tampon phosphate.

Le tableau de résultats appelle les commentaires suivants : que ce soit pour les doses 0,1 ml ou 0,2 ml nous avons constaté,

— soit une action foudroyante de l'extrait avec mort de la souris dans un tableau de spasmes respiratoires, paralysie du train postérieur, puis quadriplégie.

— soit l'installation progressive et lente d'un même syndrome avec récupération dans un temps variable (quelques minutes en général). Cette récupération peut être définitive pour les doses faibles ou alors elle est suivie d'une rechute avec décès de l'animal dans le même tableau que précédemment.

Signes annexes : les souris présentent une cyanose des extrémités et de la queue ; par contre on voit rosir la tête de façon progressive. Ce dernier fait se confirme à l'autopsie (entreprise immédiatement après la mort de la souris) qui révèle une hémorragie cérébrale importante, cette observation est contraire à ce que remarquaient BRYGOO et RABESANDRATANA.

S'agit-il d'un phénomène de sensibilité individuelle ? La reprise des expérimentations sur un plus grand nombre d'animaux, la détermination de la DL 50 devrait nous permettre de répondre à cette question. Nous pensons pouvoir fixer la DMM entre 0,2 ml et 0,3 ml (soit exprimé en teneur protéique entre 0,44 et 0,66 mg de protéines). Ainsi avec BRYGOO nous affirmons la présence d'un venin à action rapide chez *Conus tessulatus*, contrairement à ENDEAN et RUDKIN (3) qui n'avaient pas trouvé d'action toxique ; l'action est considérée comme intermédiaire par rapport d'une part à celle de *Conus geographus* très rapide (2) et d'autre part à celle de *Conus zeylanicum*, beaucoup plus lente (4 à 12 heures en IP pour la moitié d'un appareil venimeux).

II. ÉTUDE DES CONSTITUANTS PROTÉIQUES DU VENIN

1. Préparation de l'immunsérum de lapin

a. Détoxification du venin

A un extrait lyophilisé de 2,2 mg d'extrait protéique nous ajoutons 5 millilitres de formol à 3,7 p. 1 000. L'ensemble est laissé en contact pendant quarante-huit heures à la température du

laboratoire. La quantité de formol ajouté et le temps de contact sont suffisants pour neutraliser le venin.

b. Immunisation du lapin.

Avant l'expérimentation nous prélevons du sérum par ponction nous l'appelons sérum « avant ». Le lapin mâle adulte sain reçoit 2 millilitres de suspension (1 millilitre d'extrait formolé + 1 millilitre d'adjuvant de Freund) répartis en 6 points d'injection intradermique. Vingt jours plus tard nous recommençons le même protocole, puis 2 semaines après nous ponctionnons le lapin, le sérum obtenu est appelé sérum « après ».

c. Protéines sériques et aspects électrophorétiques des sérums « avant » et « après ».

Protéines sériques « avant » 72 g/l ;

Protéines sériques « après » 73/l.

La comparaison des enregistrements électrophorétiques des protéinogrammes (faits sur cellogel) montre une augmentation des globulines surtout des première et troisième fraction globuliniques, l'albumine est en diminution.

	Sérum avant	Sérum après
Albumine :	41,8 g/l	30 g/l
Globulines :	5,7 g/l	10,6 g/l
	12,6 g/l	16,5 g/l
	11,9 g/l	16,8 g/l

2. Détermination des constituants

a. Suivant leur taille et masse moléculaire.

En déposant un extrait de 1 millilitre correspondant à 2,2 mg de protéines sur une colonne de gel Sephadex couplé à un enregistreur nous avons enregistré la présence de 2 pics.

— Nous avons utilisé du gel G 75 dans du tampon Tris-HCl, malheureusement ce dernier s'est révélé inhibiteur de la réaction de microdosage des protéines, nous empêchant ainsi de nous rendre compte du pourcentage de récupération protéique après passage sur la colonne.

— Nous sommes actuellement en train de reprendre ce fractionnement en utilisant du G 200 dans un tampon phosphate. Après isolement des diverses fractions, nous nous proposons de tester la toxicité de chacune d'elles sur la souris.

b. Suivant leur niveau de migration électrophorétique

— 30 μ l d'extrait déposé sur cellogel donnent deux bandes dans la région des globulines après migration de 45 minutes sous une tension de 200 V.

— La plus rapide des deux est la plus importante quantitativement.

c. Suivant leurs propriétés immunologiques

— On étudie le sérum « avant » et « après » en méthode de double diffusion d'Ouchterlony (gélose I p. 100 en tampon véronal 8,6) contre l'extrait de venin de cônes. Le sérum de lapin « avant » ne donne aucune bande de précipitation ; le sérum « après » en donnant deux d'inégale importance.

— L'étude immunoélectrophorétique nous donne également deux bandes après électrophorèse du venin de cônes (migration du type globulinique) et révélation par l'anti-sérum de lapin.

CONCLUSION

Nous avons mis en évidence l'action toxique du venin de *Conus tessulatus* sur la souris par voie intra-veineuse ; alors que certains auteurs l'admettent, d'autres la rejettent (1), elle est moins élevée que celle mise en évidence par MAITROT sur *Conus geographus*. Des arguments tels que l'action détoxifiante du formol, la colorabilité des bandes de migration en électrophorèse sur cellogel et en immunoélectrophorèse par l'amidoschwartz, la mobilité électrophorétique de ces mêmes constituants plaident en faveur de la nature protéique et globulinique des « principes actifs » du venin. On est en droit de se poser la question suivante ; ce fait déjà noté par MAITROT chez *Conus geographus* est-il commun à tous les venins de cônes ?

RÉFÉRENCES

- 1) BRYGOO (E.-R.), RABESANDRATANA (H.) 1971. — Toxicité chez la souris, du venin de *Conus tessulatus* Born 1778. *C. R. Soc. Biol.*, 165, 12, p. 2469.

- (2) MAITROT (P.), RICHARD (J.) et BRYGOO (E.-R.) 1974. — Détoxication du venin de *Conus geographus*. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, **42**, (1) 253-258.
- (3) BRYGOO (E.-R.) 1972 (1973). — Bibliographie de l'envenimation par des mollusques du genre *Conus* Linné 1758. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, **41** (1) 123-124.

RÉSUMÉ

L'étude du venin de *Conus tessulatus* nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un minimum de 2 constituants protéiques ; de confirmer son action toxique sur la souris, par comparaison à d'autres venins de cônes, il est considéré comme étant du type à action rapide.