

de *Conus textile*, un cône qui se nourrit essentiellement de strombes, des mollusques sauteurs. Après avoir injecté une première dent radulaire dans le pied de la proie, le cône la libère de l'extrémité de son proboscis et en injecte une autre, quelques secondes après. Ce procédé est répété plusieurs fois jusqu'à ce que le strombe soit paralysé. Les cônes vermivores utilisent également plusieurs dents radulaires pour lacérer les vers et les couper en morceaux, ce qui en facilite l'ingestion.

Ces différentes stratégies d'envenimation nous ont conduits à étudier la morphologie des dents radulaires et leurs fonctions. Quel que soit le régime alimentaire, elles transpercent la proie et injectent le venin dans la plaie. Toutefois, la morphologie des dents radulaires est liée au régime alimentaire et à la stratégie d'envenimation adoptée. Les dents des cônes qui pêchent au harpon sont caractérisées par la présence d'un long harpon dont l'extrémité est incurvée ; après s'être ancrées dans les tissus de la proie, elles permettent aux cônes d'injecter le venin et de rapporter la proie vers la bouche.

Contrairement aux serpents, les cônes se déplacent lentement sur leur terrain de chasse. Malgré ce handicap, certains d'entre eux se nourrissent exclusivement de petits poissons qu'ils chassent à l'affût. La principale fonction du venin des cônes piscivores est donc d'immobiliser la proie. De même, le venin des cônes malacophages paralyse le pied des mollusques avant qu'ils ne se rétractent dans leur coquille. Cette nécessité d'immobiliser une proie a favorisé, au cours de l'évolution, la sélection de petites protéines (des peptides de 10 à 40 acides aminés), les conotoxines, qui agissent sur le système nerveux central et/ou périphérique. Le succès de la prédation est assuré, comme nous allons l'expliquer, par la combinaison de plusieurs conotoxines.

Les jonctions neuromusculaires, les zones de contact entre les ramifications des nerfs et les fibres musculaires sont les cibles les plus vulnérables et les plus exposées aux venins de cônes. Elles forment des synapses dont

la terminaison nerveuse est l'élément présynaptique et la fibre musculaire l'élément postsynaptique (voir la figure 4). La plupart des conotoxines perturbent la transmission neuromusculaire en agissant sur la terminaison nerveuse ou sur la fibre musculaire.

Pêche au harpon et paralysie rigide

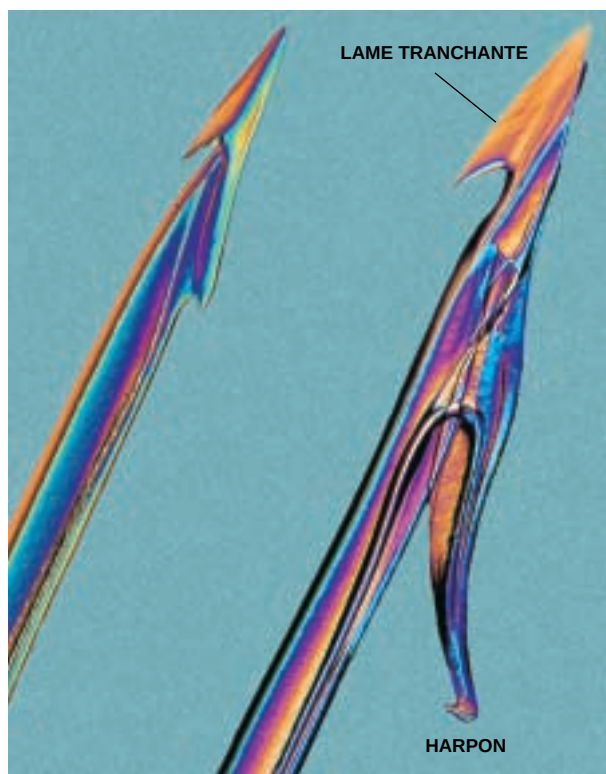
Lorsqu'un influx nerveux (potentiel d'action) propagé par un axone arrive à la terminaison nerveuse, celle-ci se dépolarise (une dépolarisation est une perturbation de la différence de potentiel qui règne de part et d'autre de la membrane cellulaire). Cette dépolarisation entraîne l'ouverture transitoire des canaux calcium présynaptiques. L'entrée d'ions calcium dans la terminaison déclenche l'arrimage, puis la fusion, des vésicules contenant de l'acétylcholine (un neuromédiateur) avec la membrane présynaptique. De l'acétylcholine est libérée dans la fente synaptique, et certaines molécules se fixent

sur leurs récepteurs localisés sur la fibre musculaire. Ces récepteurs-canaux sont aussi nommés récepteurs nicotiniques, car la nicotine s'y fixe également. Cette interaction entraîne un changement de conformation de ces récepteurs, qui s'ouvrent, laissant passer simultanément des ions sodium et potassium et, dans une moindre mesure, des ions calcium. Le changement de conductance électrique qui en résulte provoque une dépolarisation locale ; lorsque le seuil d'excitabilité électrique de la fibre musculaire est atteint, des canaux ioniques, localisés sur le muscle squelettique, s'ouvrent. Cette ouverture engendre un potentiel d'action qui se propage le long de la fibre musculaire et active la machinerie de la contraction (voir la figure 4). L'ouverture des canaux qui participent à la transmission neuromusculaire est transitoire ; ainsi, un potentiel d'action qui se propage le long d'un axone donne une seule contraction musculaire.

Baldomero Olivera, de l'Université de l'Utah, a montré que le venin du

cône *Conus purpurascens*, un cône qui pêche au harpon, déclenche deux symptômes lorsqu'il est injecté à un poisson : une paralysie rigide et une paralysie flasque. Le premier effet physiologique, la paralysie rigide, encore nommée choc excitotoxique, se caractérise par une tétanie et est assuré par la combinaison d'au moins deux conotoxines, la δ -P₆A et la κ -P₇A. La première (δ -P₆A) agit sur les canaux sodium et la seconde (κ -P₇A) sur les canaux potassium.

La conotoxine δ -P₆A se fixe sur les canaux sodium présynaptiques et en empêche la fermeture. À la jonction neuromusculaire, cette action se manifeste par une forte entrée d'ions sodium dans la terminaison et, par conséquent, par une dépolarisation prolongée de la membrane présynaptique, c'est-à-dire par une augmentation de l'excitabilité membranaire. Or, c'est une dépolarisation de la terminaison nerveuse qui aboutit à l'ouverture des canaux calcium déclenchant la cascade des événements qui aboutissent à la contraction musculaire. La dépolarisation maintenue, sous



3. LES DENTS RADULAIRES sont creuses et ouvertes à leurs deux extrémités, ce qui permet au venin de s'y accumuler et de s'écouler dans la plaie. Longues de quelques dixièmes de millimètre à plus de 20 millimètres, ces dents lacèrent les proies avec la lame tranchante de leur sommet. Elles sont maintenues à l'extrémité du proboscis pendant que la proie est transpercée et ingérée. Les dents radulaires des espèces vermivores et malacophages (par exemple, celles de *Conus textile*, à gauche) sont moins élaborées que celles des espèces piscivores qui « pêchent au harpon », tel *Conus striatus* : leurs dents (à droite) sont pourvues d'un long harpon dont l'extrémité peut être incurvée.

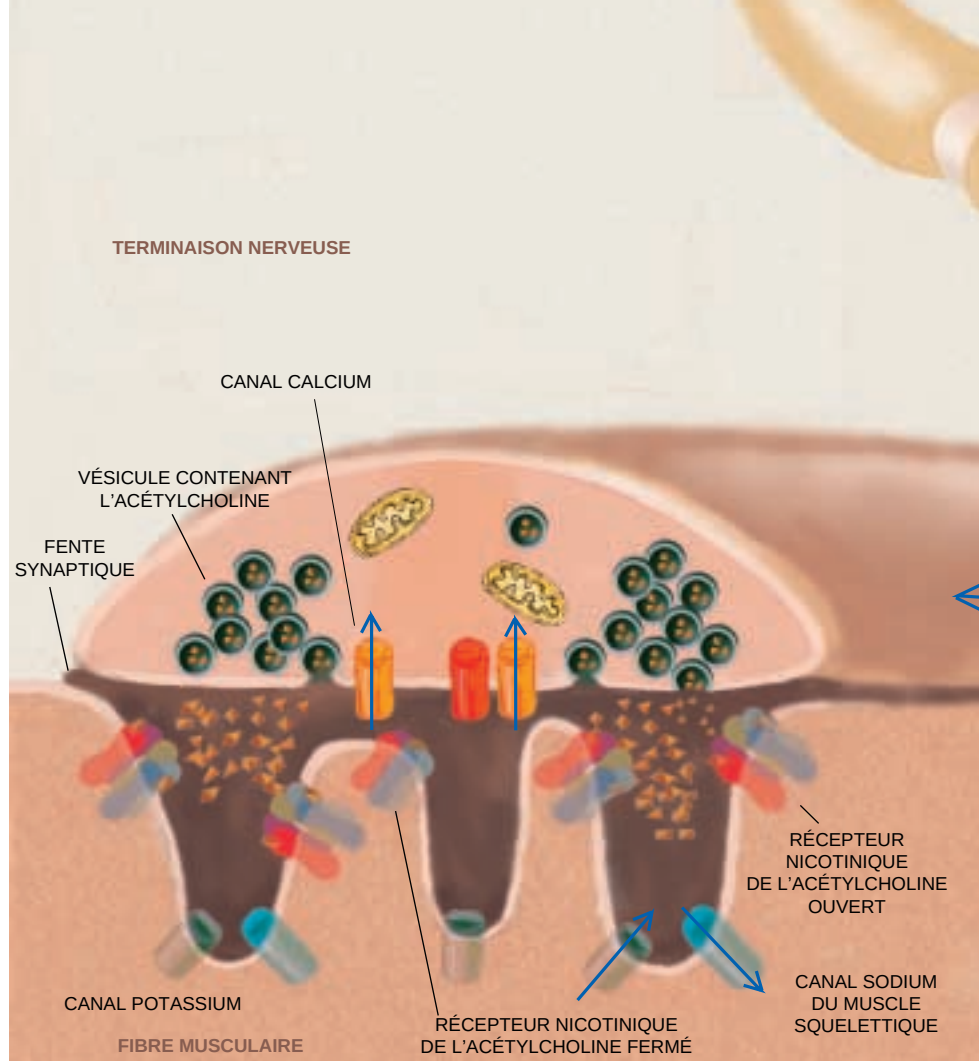
l'action de la δ -P₆A, se traduit par des contractions répétées du muscle. Selon B. Olivera, la κ -P₇A agit en synergie avec la δ -P₆A : la combinaison d'une entrée prolongée d'ions sodium et d'un blocage de la sortie des ions potassium se manifeste par une forte dépolarisation de la membrane des cellules excitables. Cela aboutit à des contractions musculaires répétées qui provoquent une tétanie (paralysie rigide) de la proie.

La paralysie flasque

Le deuxième symptôme provoqué par l'injection du venin de *Conus purpurascens* se caractérise par une paralysie flasque du poisson. Au moins trois toxines agissent en synergie pour bloquer la transmission neuromusculaire : l' α A-P₄A et la ψ -P₃E, qui bloquent toutes les deux des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine, et la μ -P₃A, qui bloque les canaux sodium du muscle squelettique. Dans ce cas, les toxines n'agissent plus sur les terminaisons nerveuses (présynaptiques), mais sur les fibres musculaires (postsynaptiques). En empêchant l'acétylcholine de se fixer sur ses récepteurs, les toxines α A-P₄A et ψ -P₃E bloquent la transmission neuromusculaire. Quant à la μ -P₃A, elle inhibe les canaux sodium, bloquant ainsi directement l'émission des potentiels d'action musculaire. Ainsi, l'action simultanée de ces toxines se traduit par un blocage de la contraction musculaire, qui se caractérise par une paralysie flasque.

Comme *Conus purpurascens*, *Conus consors* utilise la technique de la pêche au harpon. Avec l'équipe de Jordi Molgo, au laboratoire de neurobiologie cellulaire et moléculaire du CNRS, à Gif-sur-Yvette, nous avons montré que, dans le venin de *Conus consors*, il existe deux familles de conotoxines : l'une agit au niveau présynaptique en augmentant l'excitabilité des terminaisons nerveuses (l'action se traduit par un choc excitotoxique), et l'autre inhibe la transmission neuromusculaire (il en résulte une paralysie flasque).

À La Rochelle, dans le Laboratoire de synthèses et études des substances naturelles à activités biologiques, le SESNAB, dirigé par Yves Letourneux, nous avons alors isolé, à partir du venin brut de *Conus consors*, trois nouvelles conotoxines : la CcTx, la α -Cn₁A et la α -Cn₁B. La CcTx semble activer sélectivement les canaux sodium de la ter-



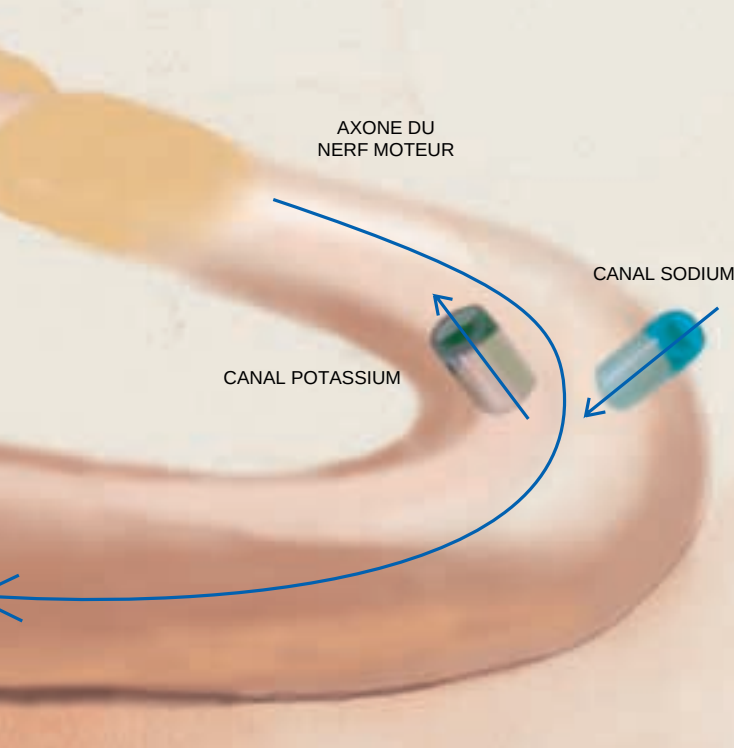
minaison, ce qui, par une entrée massive d'ions sodium, augmente l'excitabilité nerveuse. Cette toxine est responsable, du moins en partie, du choc excitotoxique provoqué par le venin brut de *Conus consors* (qui se manifeste par la tétanie des nageoires). Les deux conotoxines α -Cn₁A et α -Cn₁B bloquent les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine et participent ainsi à l'inhibition de la transmission neuromusculaire. Ainsi, *Conus consors* et *Conus purpurascens* utilisent deux groupes de toxines. Le premier agit rapidement et tétanise la proie : le poisson est immobilisé jusqu'à l'entrée en action de l'autre groupe de conotoxines qui bloque la transmission neuromusculaire. Par cette « stratégie pharmacologique » et la morphologie élaborée de leurs dents, ces cônes optimisent leurs chances d'immobiliser leurs proies.

La pêche au filet

Le cône le plus étudié, et aussi le plus dangereux, est *Conus geographus* qui a adopté la stratégie de la pêche au filet et non pas celle du harpon. Les premières études de toxicité de son venin

ont été entreprises dès 1962 par R. Endean, de l'Université de Queensland, en Australie, mais ce n'est qu'en 1978 que l'équipe de B. Olivera a isolé la première conotoxine de type α , l' α -G₁. En plus de cette toxine, *Conus geographus* en utilise deux autres (α -G₁A, α -G₂), trois conotoxines de type μ (μ -G₃A, μ -G₃B et μ -G₃C), qui bloquent sélectivement les canaux sodium du muscle squelettique, et une conotoxine de type ω (ω -G₆A) qui inhibe les canaux calcium présynaptiques. Cette dernière conotoxine empêche donc la libération d'acétylcholine qui se produit, normalement, après l'entrée d'ions calcium. Ces conotoxines agissent en synergie afin de bloquer la transmission neuromusculaire.

La stratégie de *Conus geographus*, qui ne paralyse ses proies qu'après les avoir piégées par la bouche, ne nécessite pas de toxines telles que δ -P₆A, κ -P₇A ou CcTx. En revanche, l'équipe de B. Olivera a récemment identifié dans le venin de *Conus geographus* trois autres toxines qui agissent spécifiquement sur le système nerveux central, et non pas sur la jonction neuromusculaire : la σ -G₈A, la conantokine-G et la contulakine-G.



	CONOTOXINE	RÉCEPTEUR	TYPE DE PARALYSIE
PÊCHE AU HARPON	CONOTOXINES DE TYPE δ : δ -P ₆ A	CANAL SODIUM PRÉSYNAPTIQUE	CHOC EXCITOTOXIQUE
	CONOTOXINES DE TYPE κ : κ -P ₇ A	CANAL POTASSIUM	
	CONOTOXINES DE TYPE ψ : ψ -P ₃ E	RÉCEPTEUR NICOTINIQUE DE L'ACÉTYLCHOLINE	PARALYSIE FLASQUE
	CONOTOXINES DE TYPE α : α -G ₁ , α -Cn ₁ A, α -P ₄ A	RÉCEPTEUR NICOTINIQUE DE L'ACÉTYLCHOLINE	PARALYSIE FLASQUE
	CONOTOXINES DE TYPE μ : μ -G ₃ A, μ -G ₃ B, μ -P ₃ A	CANAL SODIUM DU MUSCLE SQUELETTIQUE	PARALYSIE FLASQUE
PÊCHE AU FILET	CONOTOXINES DE TYPE ω : ω -M ₇ C, ω -G ₆ A, ω -M ₇ A	CANAL CALCIUM PRÉSYNAPTIQUE	PARALYSIE

4. UNE JONCTION NEUROMUSCULAIRE est une zone de contact entre les ramifications d'un nerf moteur et une fibre musculaire. C'est une cible privilégiée des conotoxines. L'arrivée d'un influx nerveux (ou potentiel d'action) provenant de l'axone d'un nerf moteur provoque une dépolarisation (une variation de la différence de potentiel membranaire) ; des canaux calcium s'ouvrent et des ions calcium pénètrent dans la terminaison présynaptique. Les vésicules contenant l'acétylcholine fusionnent avec la membrane et leur contenu se déverse dans la fente synaptique. Quelques molécules de ce neurotransmetteur se fixent sur leurs récepteurs nicotiniques du muscle squelettique, qui changent de conformation et s'ouvrent, laissant passer

des ions. Cette dépolarisation locale atteint le seuil d'excitabilité de la fibre et engendre un potentiel d'action musculaire qui active la machinerie de la contraction. Normalement, l'ouverture des canaux ioniques (pré- et postsynaptiques) est transitoire : à un potentiel d'action correspond une seule contraction de la fibre musculaire. La plupart des conotoxines perturbent le fonctionnement de ces canaux. Certaines empêchent la fermeture de canaux ioniques présynaptiques (sodium), de sorte que les contractions persistent, créant une paralysie rigide nommée choc excitotoxique. D'autres conotoxines agissent sur les canaux ioniques postsynaptiques et bloquent la transmission neuromusculaire, ce qui provoque une paralysie flasque.

La σ -G₈A est la première toxine peptidique connue qui inactive sélectivement le récepteur 5-HT₃ ouvert par la sérotonine. Les conantokines, isolées des venins de *Conus geographus* (conantokine-G) et de *Conus tulipa* (conantokine-T), bloquent le récepteur NMDA du glutamate, inhibant ainsi l'influx d'ions calcium dans les neurones du système nerveux central et, par conséquent, la transmission des messages nerveux. Ces trois toxines inhiberaient le «circuit sensoriel» des proies, les plongeant dans un «état de sédation». Les poissons, piégés par la bouche de *Conus geographus*, seraient dans un état léthargique avant même d'être paralysés par les conotoxines de type α , ω ou μ .

Séquences hypervariables et structures conservées

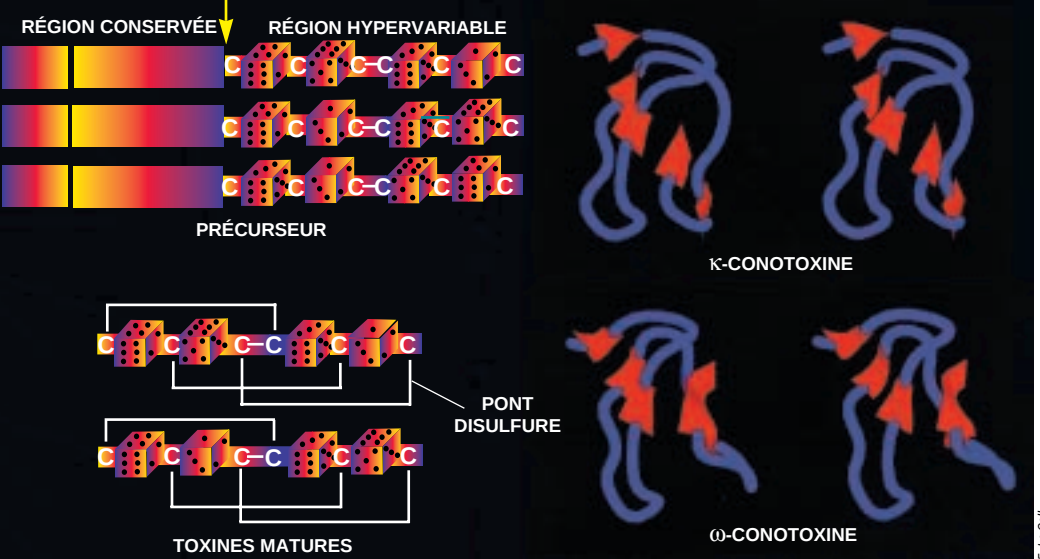
La centaine de conotoxines identifiées montre que les venins d'espèces différentes sont composés de toxines dont les séquences divergent. Cette divergence est également observée pour plusieurs conotoxines qui ont la même cible physiologique. Ainsi, les conotoxines α -G₁, α -P₄A et la ψ -P₃E qui toutes

bloquent les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine de la jonction neuromusculaire ont des séquences très différentes. Il en va de même pour les ω -G₆A et ω -M₇A qui agissent sur le même sous-type de canaux calcium.

Quelle est l'origine de cette hypervariabilité? L'analyse des ARN messagers de ces peptides (les gènes sont transcrits en ARN messagers, eux-mêmes traduits en protéines) a montré qu'ils sont dans un premier temps traduits en précurseurs de 70 à 80 acides aminés, ayant trois régions distinctes : la séquence signal, la région propeptide et une région correspondant à une copie de la toxine. La comparaison des séquences des précurseurs des ω -G₆A et ω -M₇A a montré que la partie N-terminale (correspondant à la séquence signal) est quasi identique, tandis que la partie C-terminale (aboutissant à la toxine mature) est très variable, les résidus cystéine étant conservés (voir la figure 5). La cystéine est un acide aminé, et la plupart des conotoxines en contiennent plusieurs. Ces résidus, en se liant par des ponts disulfure (entre atomes de soufre), guident le repliement des conotoxines et leur confèrent

leur structure tridimensionnelle biologiquement active. Par un mécanisme génétique spécialisé, les cônes introduisent de nouvelles séquences spécifiquement entre les résidus cystéine. Ces hypermutations permettent la formation de nouvelles conotoxines aux fonctions biologiques très variées, à partir d'un même motif cystéine. Aujourd'hui, on connaît cinq familles de conotoxines ayant le même motif cystéine (C-C-CC-C-C) et des acides aminés inter-cystéine hypervariables et dont le précurseur a une séquence signal conservée. Ces toxines sont actives sur trois types de canaux ioniques : les canaux potassium, calcium et sodium.

De plus, l'équipe d'André Menez, au département d'ingénierie et d'études des protéines, au Centre d'études nucléaires de Saclay, a récemment montré que plusieurs de ces conotoxines (ω -G₆A, ω -M₇A et κ -P₇A) ont une structure tridimensionnelle similaire (voir la figure 5). Cette «stratégie biochimique» assure ainsi aux cônes un arsenal de toxines aux structures similaires et dont les actions physiologiques sont très variées.



5. LE PRÉCURSEUR DES CONOTOXINES est constitué d'une région conservée et d'une autre qui correspond à la séquence des toxines. Ces dernières renferment un arrangement d'acides aminés cystéine conservé (C- C- CC- C- C) et des séquences d'acides aminés (symbolisées par les dés) «hypervariables» (en haut à gauche). Les conotoxines matures sont obtenues après coupure du précurseur (à l'endroit de la flèche). Elles se replient alors par formation de ponts disulfure, qui s'établissent entre atomes de soufre des résidus cystéine (traits blancs, en bas, à gauche). On observe la structure tridimensionnelle de deux familles de conotoxines sur les images stéréographiques (à droite) ; pour les visualiser, on doit approcher la revue des yeux sans essayer d'accommoder, puis la reculer lentement, sans jamais chercher à obtenir une image nette.

Les applications thérapeutiques

Beaucoup de substances naturelles sont potentiellement utilisables comme agents thérapeutiques, mais la plupart d'entre elles n'ont pas une spécificité suffisante pour leur récepteur cible ; ce manque de spécificité est responsable d'effets secondaires indésirables. Les pharmacologues recherchent de nouvelles substances plus spécifiques. Dans ce contexte, les peptides des venins de cônes, parce qu'ils ont cette propriété, permettent l'étude de récepteurs et de canaux ioniques, cibles potentielles dans le traitement de nombreuses pathologies.

La plupart des conotoxines agissant sur le récepteur nicotinique empêchent l'acétylcholine de se lier à l'un ou l'autre des deux sites récepteurs de l'acétylcholine. Ce récepteur est constitué de cinq sous-unités qui forment un canal ; les sites de liaison du neuro-médiateur sont localisés aux interfaces des sous-unités α/γ , et α/δ . Lorsque deux molécules de neuro-médiateur se fixent sur ces sites, la protéine-canal change de conformation et s'ouvre. La spécificité d'interaction des conotoxines avec le récepteur nicotinique est illustrée par la conotoxine α -G₁ qui se lie uniquement sur le site récepteur situé à l'interface des sous-unités α et γ du récepteur nicotinique du muscle squelettique.

De surcroît, certaines conotoxines agissent sélectivement et avec une forte

affinité sur les récepteurs nicotiniques neuronaux de l'acétylcholine, récepteurs constitués de sous-unités différentes de celles des récepteurs du muscle squelettique. Un autre exemple est celui des conotoxines de type μ . Ainsi, la μ -G₃A bloque spécifiquement les canaux sodium du muscle squelettique sans aucune affinité pour ceux du système nerveux central. Au contraire, la μ -P₃A, qui a le même motif cystéine, inhibe aussi les canaux sodium de neurones de rat. Ainsi, ces deux conotoxines de type μ sont des outils de choix pour les biologistes qui étudient la pharmacologie des différents types de canaux sodium. De la même façon, les ω -conotoxines qui sont spécifiques de certains types de canaux calcium ont été largement utilisées pour la caractérisation des fonctions physiologiques de ces canaux.

Parce qu'elles sont très spécifiques, ces ω -conotoxines ont des applications thérapeutiques. Ainsi, l'accumulation excessive de calcium intracellulaire est en partie responsable de la dégénérescence neuronale après une ischémie cérébrale (une insuffisance d'oxygénation après un accident vasculaire cérébral notamment). Certaines conotoxines de type ω , en inhibant des canaux calcium, sont efficaces sur des modèles expérimentaux d'ischémie chez l'animal : la conotoxine ω -M₇A prévient la destruction des neurones, même quand elle est injectée plusieurs heures après un choc ischémique provoqué.

Par ailleurs, ces canaux calcium sont abondants dans la moelle épinière, là où arrivent les terminaisons des fibres nociceptives (les fibres nerveuses associées à la douleur). L'administration, dans la moelle épinière de rat, de la conotoxine ω -M₇A supprime la douleur (l'effet observé est proportionnel à la dose administrée). Son efficacité est notablement supérieure à celle des opioïdes et la tolérance vis-à-vis de la conotoxine ω -M₇A n'augmente pas. Des tests cliniques sur l'homme ont été entrepris aux États-Unis : l'activité analgésique de cette conotoxine ne s'accompagne pas d'effets secondaires indésirables. La conotoxine ω -M₇A est la première molécule issue des venins de cônes à entrer dans la dernière phase d'essais cliniques. D'autres peptides de venins de cônes, également à l'étude, inhibent les convulsions qui accompagnent les crises d'épilepsie : c'est le cas des conantokines spécifiques des récepteurs NMDA du glutamate.

Six cents espèces de Conidae, une centaine de peptides par espèce : une multitude de substances thérapeutiques potentielles !

Frédéric LE GALL, docteur en neurobiologie, travaille au Laboratoire de neurobiologie cellulaire et moléculaire du CNRS, à Gif-sur-Yvette. Philippe FAVREAU travaille au Laboratoire de synthèses et études des substances naturelles à activités biologiques de l'Université de La Rochelle, où Georges RICHARD est professeur au Laboratoire de biologie et environnement marins.

B.M. OLIVERA, *Conus Venom Peptides, Receptors and Ion Channel Targets and Drug Design : 50 Millions Years of Neuropharmacology*, in *Molecular Biology of the Cell*, vol. 8, pp. 2101-2109, 1997.

F. LE GALL et al., *The Strategy Used by some Piscivorous Cone Snails to Capture their Prey : the Effects of their Venoms on Vertebrates and on Isolated Neuromuscular Preparations*, in *Toxicon*, n° 37, vol. 7, pp. 985-998, 1999.

P. FAVREAU et al., *Biochemical Characterization and NMR Structure of Novel Conotoxins Isolated from the Venom of Conus Consors*, in *Biochemistry*, n° 38, vol. 19, pp. 6317-6326, 1999.

F. LE GALL et al., *A new Conotoxin Isolated from Conus Consors Venom that Discriminates between Nerve and Muscle Voltage-Gated Sodium Channels*, in *European Journal of Neuroscience*, 1999 (à paraître).

