

L'origine génétique de la variabilité des venins : impact sur la préparation des sérums antivenimeux.

S. W. Nkinin (1), J.-P. Chippaux (2), D. Piétin (3), Y. Doljansky (3), O. Trémeau (4) & A. Ménez (4)

(1) Centre Pasteur du Cameroun, B.P. 1274, Yaoundé, Cameroun.

(2) ORSTOM et CERMES, B.P. 10887, Niamey, Niger.

(3) LATOXAN, 05150 Rosans, France.

(4) D.I.E.P., Centre d'Étude de Sacley, 91191 Gif-Sur-Yvette Cedex, France.

(5) Manuscrit n° 1759. «Toxicologie». Accepté le 6 juin 1997.

Correspondant et tirés-à-part : JPChippaux

Summary: Genetic origin of the variability of venoms: impact on the preparation of antivenom sera (SAV).

Key-words: Antivenoms -
Crotalus atrox - Naja haje -
Neurotoxin- - Venoms

One of the main possible origin of the biochemical variations of venoms could be genetic. We studied the venom of members of litters born in a snake farm (12 *Crotalus atrox* and 21 *Naja haje*). We first used the electrophoresis in cellulose acetate (AE). Then, variations were confirmed by immunoelectrophoresis (AIE) using an antivenom (IPSER Africa®, Pasteur Mérieux Sérums & Vaccins) and immunosera prepared on rabbit from i) venom presenting the maximum of bands in electrophoresis (complete venom) and ii) pure toxins (neurotoxin- and cardiotoxin-). At last, the toxicity of some samples was measured and the ability of SAV to neutralise the corresponding sample was measured. The AE of *C. atrox* venoms showed a good homogeneity, probably due to a good genetic stability of the investigated group. On the other hand, *N. haje* venoms have revealed a great heterogeneity. The 13 samples were allocated to five groups according to the absence of some fractions compared to the complete venom. The AIE showed that the neurotoxin- is present in every sample, but variable in quantity, even when it did not appear on AE. We suggest that these pattern variations are due either to relative variations of protein fractions in samples or to modifications of the chemical composition of the neurotoxin-. However, the variation of toxicity between the different samples questioned the neutralisation ability of antivenoms. We propose that venom sample choice for SAV production should be based on biochemical criteria and toxicity of samples rather than random pooling.

Résumé :

Mots-clés : *Crotalus atrox* - *Naja haje* -
Neurotoxine- -
Sérum antivenimeux -
Venins

L'une des principales causes des variations biochimiques des venins semble être génétique. Nous avons étudié le venin des membres de fratries nés en élevage (12 *Crotalus atrox* et 21 *Naja haje*). Nous avons utilisé en première intention l'électrophorèse en acétate de cellulose (AE). Les variations ont été confirmées par immunoelectrophorèse (AIE) à l'aide de sérums antivenimeux (SAV = IPSER Africa®, Pasteur Mérieux Sérums & Vaccins) et d'immunsérums préparés sur lapin à partir de venins présentant le maximum de fractions en électrophorèse (venin total) et de toxines pures (neurotoxine- et cardiotoxine-). Par ailleurs, nous avons mesuré la toxicité de certains échantillons et la capacité du SAV à neutraliser ces échantillons. En AE, les venins de *C. atrox* montrent une bonne homogénéité, traduisant une grande stabilité génétique au sein du groupe analysé. En revanche, les venins de *N. haje* ont révélé une grande hétérogénéité. Il a été possible d'assigner les 13 échantillons à cinq groupes en fonction de l'absence de certaines fractions par rapport au venin total. L'AIE confirme ces résultats. L'AIE montre que la neurotoxine- est présente en quantité variable dans tous les échantillons, même lorsqu'elle n'apparaît pas en AE. Nous pensons que ces variations sont liées à la différence de concentration des fractions protéiques dans chaque échantillon et/ou à une modification de la composition chimique de la neurotoxine. Quoiqu'il en soit, la variation de toxicité entre les différents échantillons pose le problème du pouvoir neutralisant des SAV. Le choix des venins servant à la fabrication des SAV devrait reposer sur la composition biochimique et la toxicité des échantillons plutôt que sur un mélange aléatoire des venins.

Introduction

L'une des hypothèses les plus vraisemblables pouvant expliquer la variabilité biochimique de la composition des venins de serpents est qu'elle soit d'origine génétique (5, 6). Selon cette hypothèse, la variabilité pourrait être due à une différence de concentration de chaque fraction (variation quantitative) ou à des modifications structurales de certaines protéines (variation qualitative). Les conséquences cliniques et thérapeutiques de cette variabilité sont une grande diversité des symptômes et de

leur gravité relative, ainsi qu'une efficacité inconstante des sérums antivenimeux (2, 3, 4). L'O.M.S., dès 1981, proposait de constituer une banque de venins de référence pour définir les antigènes devant servir à l'immunisation des animaux utilisés pour la fabrication des sérums antivenimeux (9). Plus pragmatiquement, le choix des antigènes servant à la fabrication des sérums antivenimeux repose sur deux concepts opposés : le mélange aléatoire d'échantillons de venins de diverses origines ou le choix raisonné de venins, voire de fractions isolées, représentatifs de propriétés toxiques définies (4).

Production d'immunsérums

Les venins présentant le maximum de fractions en électrophorèse, ainsi que les fractions pures neurotoxine- et cardiotoxine- (purifications effectuées au laboratoire du CEN de Gif-sur-Yvette à partir de venins de *Naja nigricollis*), ont été inoculés à des lapins de 1700 à 2000 g. avec de l'adjuvant de Freund selon la méthode classique (3). Les prélèvements de sang ont été effectués à la veine de l'oreille. Après centrifugation, les immunsérums (IS) ont été congelés et conservés à -20°C.

Identification des différentes fractions

En nous fondant sur les connaissances concernant les venins (11), nous avons comparé la position des bandes électrophorétiques des venins de *Naja* comportant le plus de fractions et la position des fractions pures obtenue par AE dans les mêmes conditions expérimentales. Nous avons confirmé ces résultats grâce aux arcs de précipitations visualisés en AIE et à la toxicité des venins.

Résultats

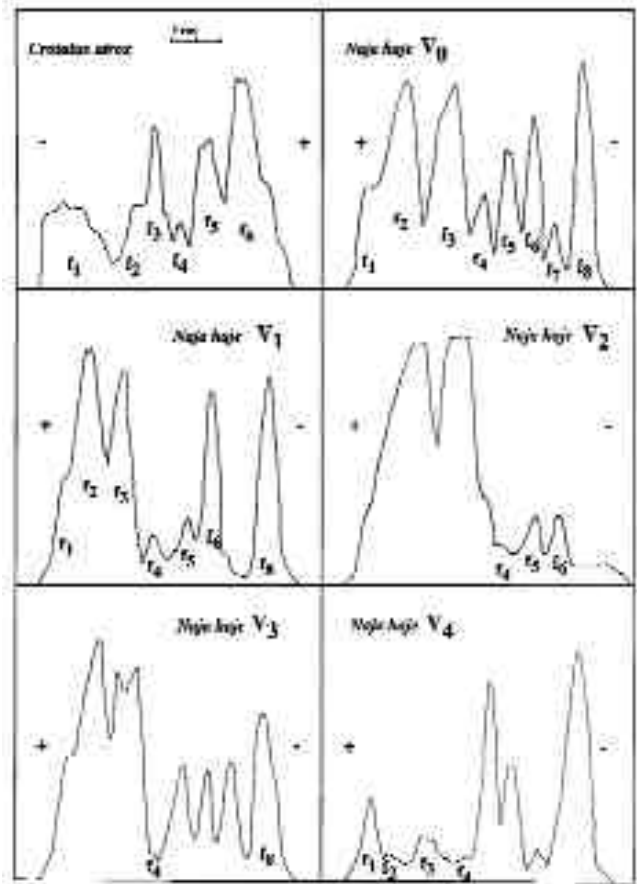
Électrophorèses

Avec les venins de *Crotalus atrox*, nous n'avons pas observé de bandes électrophorétiques bien individualisées, en raison d'un recouvrement partiel des extrémités de chaque bande. Nous avons dénombré 6 fractions (F₁ à F₆) de la cathode à l'anode. Le point d'application (dépôt) de l'échantillon correspond à la fraction F₃. La similitude entre les différents échantillons est très grande et nous avons considéré qu'il n'existe qu'un seul type de venin (fig. 2 et 3).

Les venins de *Naja haje* présentent un électrophorégramme constitué de bandes nettement séparées. Le nombre maximum de fractions que nous avons observé est de 8 (F₁ à F₈) à partir de l'anode (fig. 2 et 3). Le point d'application correspond à la fraction F₁. Nous avons noté une grande hétérogénéité dans les électrophorégrammes des divers échantillons, tant au niveau du nombre de bandes que de la concentration respective de chacune d'elles. Aucune liaison au sexe ou à l'âge n'a été retrouvée. Les 21 venins ont été répartis en 5 groupes appelés V₀ à V₄ (fig. 2 et 3).

Figure 3.

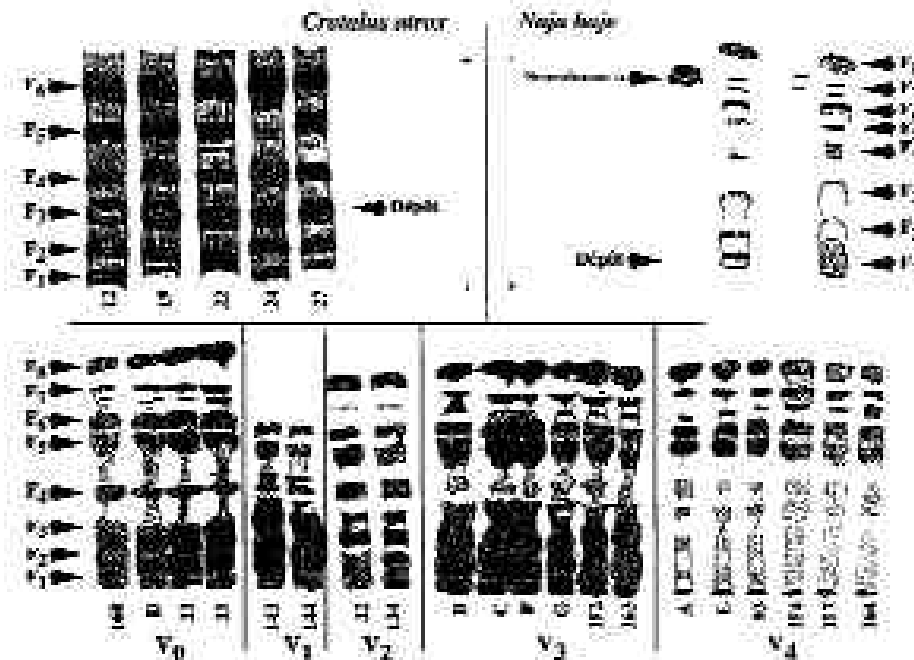
Courbes d'intégration des électrophorégrammes des différents groupes de venin.



La neurotoxine- migre à la même distance que la fraction F₇ du venin de *Naja haje* (fig. 3). La cardiotoxine- migre au niveau des fractions F₂ et F₃, donnant une bande ne correspondant à aucune des fractions présentes sur nos électrophorégrammes.

Figure 2.

Electrophorégrammes des venins de *Crotalus atrox* et de *Naja haje*.



Analyse immuno-électrophorétique

Tous les groupes de venins de *Naja haje* ont répondu avec la même intensité lorsqu'ils ont été mis en présence des immun-sérums, en dépit des différences observées en électrophorèse (Fig 4). Avec l'échantillon de venin de *Naja* présentant le plus de bandes en électrophorèse (groupe V₀), les arcs de précipitation apparaissent en 24 à 48 heures, aussi bien avec le SAV qu'avec l'IS. Avec ce dernier, certains arcs apparaissent toutefois plus épais, moins bien définis, qu'avec le SAV (fig. 4 g). L'absence de quelques arcs dans les immuno-électrophorégrammes des différents échantillons de venins de *Naja* mérite d'être notée. Le groupe V₁, présentant une faible concentration en fraction F₇, montre une réduction très nette des deux arcs principaux par rapport à V₀. En revanche, les venins du groupe V₂, dépourvus de fractions F₇ et F₈ et pauvres en fractions F₅ et F₆, présentent un aspect des arcs de base identique à ceux du

protection de ce venin par le SAV. Cela indique que les propriétés toxiques et immunologiques de ces fractions basiques sont neutralisées par le SAV. On peut penser qu'elles ont une toxicité et des propriétés immunologiques très proches de celles de la neurotoxine – mais qu'elles en diffèrent par la structure.

En revanche, les venins du groupe V₂, dépourvus de la plupart des fractions basiques, notamment F₇ et F₈, sont les moins toxiques. L'AIE montre un arc cathodique proche de la position typique mais de faible densité et légèrement décalé vers l'anode, ce qui fait douter de son identité (fig. 4b). Paradoxalement, la capacité neutralisante du SAV est la plus faible. Ces résultats suggèrent que la toxicité des venins de ce groupe est liée à une substance distincte des neurotoxines et absente du venin qui a permis la fabrication du SAV ou présentant une faible immunogénicité.

Enfin, le venin possédant toutes les fractions (groupe V₀) présente une toxicité importante. La bonne neutralisation par le SAV confirme son excellente adéquation pour ce venin.

De ces résultats, on peut supposer que la forte neurotoxicité des venins V₀, V₁ et V₄, riches en protéines basiques, est probablement associée à la fraction F₇ et, dans une moindre mesure, aux fractions F₅ à F₈. La variabilité de l'efficacité du SAV, du même ordre de grandeur pour V₀ et V₁ et inférieure de moitié pour V₄, pourrait être liée à la concentration du venin en neurotoxine. L'hypothèse d'une variation très légère de composition de la neurotoxine dans le groupe V₁ mais n'affectant pas ses propriétés pharmacologiques (toxique) ou immunologique (protection du SAV) est vraisemblable mais non démontrée. L'absence de protéine basique dans les venins du groupe V₂, associée à une faible toxicité, peut être interprétée soit comme une déficience totale en neurotoxine, soit comme une mutation importante de la neurotoxine affectant l'ensemble de ses propriétés biochimiques (migration électrophorétique), pharmacologiques (faible toxicité) et immunologiques (faible protection par le SAV).

L'absence d'arc en présence d'IS anti-cardiotoxine-, alors que les venins de *Naja haje* sont riches en cardiotoxines, indique que la parenté immunologique entre les cardiotoxines de *N. haje* et celles de *N. nigricollis* sont faibles. Ceci est à opposer à la paraspécificité de l'IS anti-neurotoxine-, préparée également à partir du venin de *N. nigricollis* et qui reconnaît parfaitement la neurotoxine de *N. haje*.

L'origine génétique de la variabilité des venins n'est pas surprenante, même si l'on sait que d'autres facteurs interviennent pour l'expliquer (5, 6). MEBS *et al.* (8) ont mis en évidence l'existence d'une fraction basique chez les femelles de *Crotalus adamanteus*, absente chez les mâles. Une constatation similaire a été faite par DALTRY *et al.* (6) chez *Calloselasma rhodostoma*. THEAKSTON et REID (10) ont montré, chez un même spécimen de *Crotalus atrox*, une variation de toxicité en fonction de l'âge, tandis que WILLIAMS et WHITE (12) ont décrit une variation d'activités enzymatiques chez un spécimen de *Pseudohaje textilis* au cours de l'année. Enfin, DALTRY *et al.* (7) ont récemment montré que la variation biochimique des venins de *Calloselasma rhodostoma* était fortement corrélée au régime alimentaire des populations étudiées.

Conclusion

La variabilité biochimique des venins de serpent porte certainement sur la concentration des différentes fractions. Il est également possible qu'elle concerne la structure biochimique de certaines protéines. Dans le premier cas, on peut incriminer l'expression de gènes à pénétrance variable. Les secondes pourraient s'expliquer par des gènes multialléliques dont le mode de transmission reste à découvrir.

Au plan théorique, il reste à confirmer par des techniques d'analyse plus sophistiquées qu'une même toxine peut être représentée par plusieurs variants dans le venin d'individus distincts appartenant à la même espèce.

Au plan pratique, le choix du venin devant servir à la fabrication des sérums antivenimeux sera raisonné plutôt qu'aléatoire. Il faut, en effet, que ce venin possède un maximum de fractions pour pouvoir représenter le plus grand nombre de variants. Par ailleurs, sa toxicité doit être aussi réduite que possible pour éviter une trop forte représentation des protéines les plus toxiques, sous réserve que ces dernières soient fortement immunogènes, par rapport aux autres substances toxicologiquement actives.

Références bibliographiques

- BOULAIN JC, FROMAGEOT P & MENEZ A - Further evidence showing that neurotoxin-acetylcholine receptor dissociation is accelerated by monoclonal neurotoxin-specific immunoglobulin. *Mol Immunol*, 1985, **22**, 553-556.
- CHIPPAUX JP - Les morsures de serpents en Afrique inter-tropicale. *Cahiers Santé*, 1992, **2**, 221-234.
- CHIPPAUX JP & GOYFFON M - Production and use of snake anti-venom. In: Reptiles and Amphibian Venoms « Handbook of natural toxins - AT TU Ed, M Dekker, Inc, 1991, Vol. 5, 529-555.
- CHIPPAUX JP & GOYFFON M - La sérothérapie antivenimeuse : ses applications, ses limites, son avenir. *Bull Soc Path Ex*, 1991, **84**, 286-296.
- CHIPPAUX JP, WILLIAMS V & WHITE J - Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 1991, **29**, 1279-1303.
- DALTRY JC, PONNUDURAI G, SHIN CK, TAN N-H, THORPE RS & WÜSTER W - Electrophoretic profiles and biological activities : intraspecific variation in the venom of the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). *Toxicon*, 1996, **34**, 67-80.
- DALTRY JC, WÜSTER W & THORPE R S - Diet and snake venom evolution. *Nature*, 1996, **379**, 537-540.
- MEBS D & KORNALIK F - Intraspecific variations in content of a basic toxin in eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) venom. *Toxicon*, 1984, **22**, 831-833.
- THEAKSTON RDG - Characterization of venoms and standardization of antivenoms. In: Natural Toxins, Animal, Plant and Microbial - JB HARRIS ed, Oxford Univ Press, 1986, 287-303.
- THEAKSTON RDG & REID HA - Changes in the biological properties of venom from *Crotalus atrox* with ageing. *Period Biol*, 1978, **80**, 123-133.
- TU AT - Reptiles and Amphibian Venoms « Handbook of natural toxins», AT TU Ed, M Dekker, Inc, 1991, Vol. 5.
- WILLIAMS V & WHITE J - Variation in the composition of the venom from a single specimen of *Pseudonaja textilis* (common brown snake) over one year. *Toxicon*, 1992, **30**, 202-206.