

41. ENZYMES ET TOXINES DES VENINS DE SERPENTS. RECHERCHES BIOCHIMIQUES ET IMMUNOLOGIQUES SUR LE VENIN DE *NAJA NIGRICOLLIS*

P. BOQUET, Y. IZARD, M. JOUANNET et J. MEAUME

Institut Pasteur, Paris, France

Cet exposé ne constitue pas une revue des recherches publiées sur les enzymes et les toxines des venins de serpents. Une telle entreprise dépasserait les limites d'un bref entretien en raison du nombre considérable des publications parues sur ce sujet (1,2). Notre but est de vous présenter les résultats d'expériences récentes entreprises dans le dessein d'établir une relation de causalité entre les antigènes décelés dans un venin par les méthodes d'immuno-diffusion et d'immuno-électrophorèse et les facteurs enzymatiques et toxiques de ce même venin.

Disposant de quantités relativement importantes de venin de *Naja nigricollis*, un ELAPIDAE africain, nos recherches ont été orientées vers l'étude de ce poison.

D'une manière générale, on constate que les propriétés nocives des venins d'ELAPIDAE et celles des venins de VIPERIDAE ou de CROTALIDAE diffèrent. L'expérience nous enseigne, par exemple que la plupart des venins neurotoxiques des ELAPIDAE d'Afrique contiennent peu ou ne contiennent pas d'enzymes protéolytiques, alors que ceux des CROTALIDAE américains, objet de recherches approfondies de la part des expérimentateurs brésiliens, dégradent les protéines.

Notre choix étant dicté par les seules raisons matérielles, nous avons procédé de la manière que voici.

MÉTHODES

Dans des expériences préliminaires, le venin de *Naja nigricollis* est filtré à travers un gel de dextrane, le "Sephadex G₁₀₀ fine" choisi en raison de ses propriétés d'exclusion. Six fractions sont obtenues par ce procédé. Elles sont lyophilisées et conservées à basse température.

La dernière fraction ou "fraction VI" contient un facteur d'une grande nocivité, que nous appelons "toxine α " (3) et des protéines de masses moléculaires voisines. Pour purifier cette toxine α , la fraction VI a été de nouveau filtrée à travers un gel de "Sephadex" plus sélectif, le "Sephadex G₅₀ fine". Les techniques de ces filtrations sont décrites "in extenso" dans une précédente publication (4).

Chaque fraction est soumise à une analyse immunologique suivant les méthodes d'immuno-diffusion double en milieu gélifié (5) et d'immuno-électrophorèse (6). Par ce dernier procédé on obtient la séparation des antigènes contenus dans des échantillons de 5 à 10 μg des produits examinés. Un courant de 1,5 v/cm est maintenu pendant 2 heures et le tampon utilisé est la solution usuelle de véronal sodique/HCl 0,025 M (pH 8,2). Dans les deux séries d'expériences on précipite les antigènes par l'immuno-sérum 984 qui provient d'un cheval hyperimmunisé par des injections répétées de venin de *Naja nigricollis*.

RÉSULTATS

1 — Le tracé de la figure 1, illustre le résultat de la filtration de 500 mg de venin de *Naja nigricollis* à travers le "Sephadex G₁₀₀ fine". Il est défini par une mesure absorptiométrique de la teneur en protéines de chaque échantillon de filtrat recueilli ($\lambda = 2.800 \text{ \AA}$). Ces échantillons sont répartis en 6 lots correspondant aux fractions I à VI.

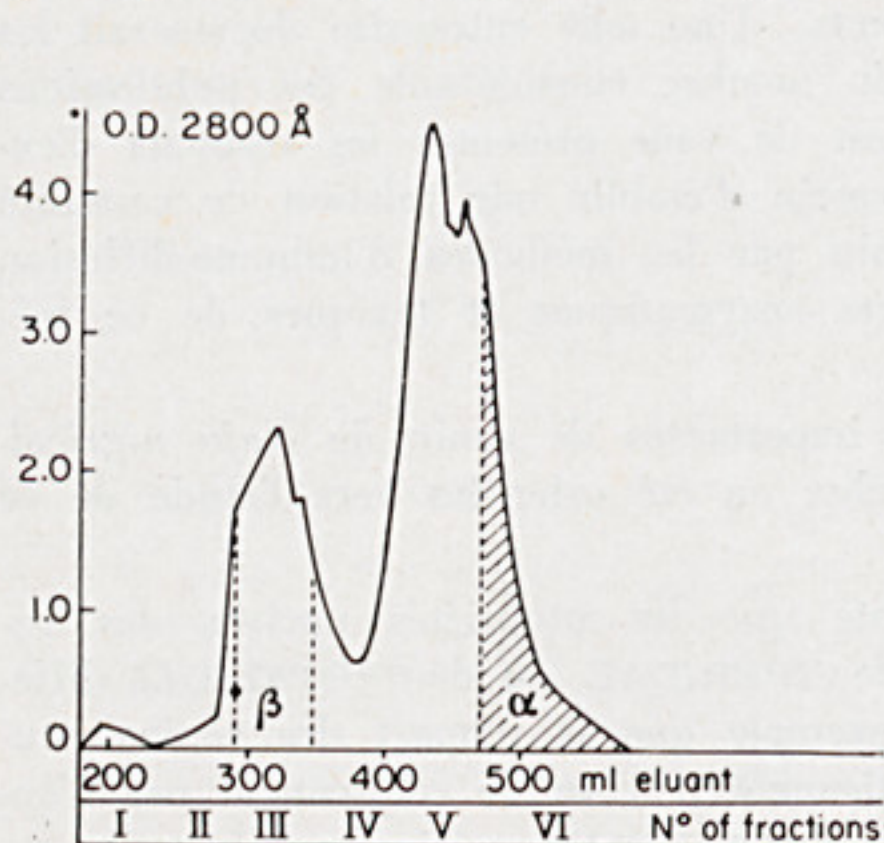


Fig. 1

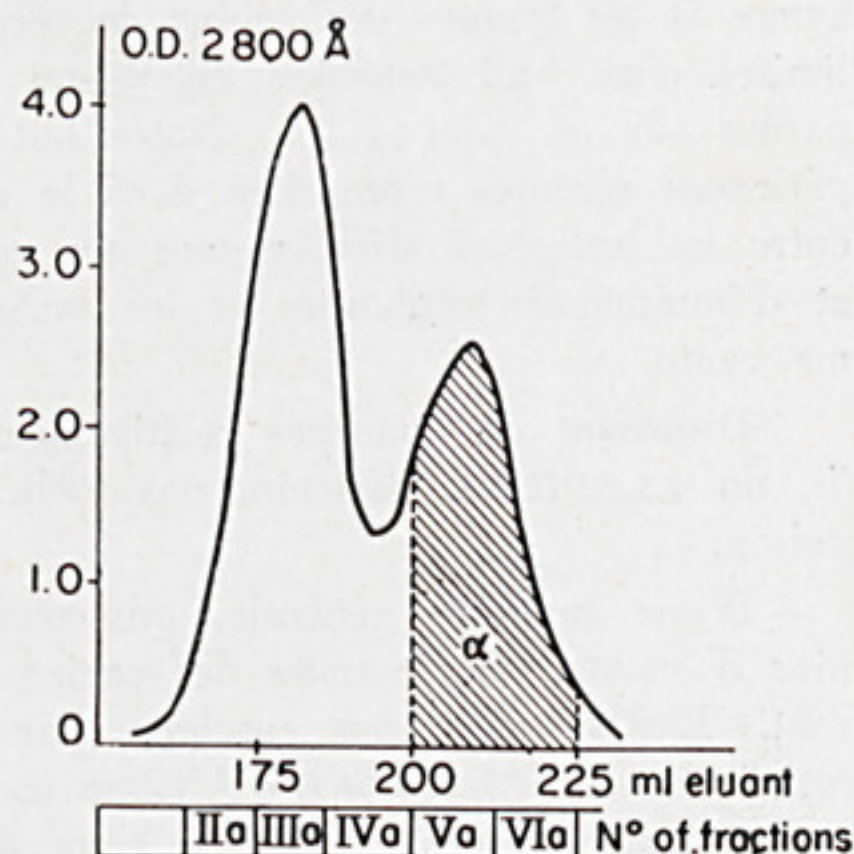


Fig. 2

Le tracé de la figure 2 correspond à la filtration de la fraction VI à travers le "Sephadex G₅₀ fine". Les sous-fractions Va et VIa ainsi obtenues sont définies par le second pic de ce graphique. Soumis à une filtration de contrôle sur "Sephadex G₅₀ fine", le produit terminal semble homogène.

2 — La figure 3 représente une préparation dans laquelle 25 μg de venin de *Naja nigricollis* ont été analysés par immuno-électrophorèse et à titre comparatif, la représentation schématique des antigènes dissociées par le même procédé.

Chaque antigène précipité étant désigné par un symbole, on constate que l'antigène correspondant au premier arc α se déplace vers l'anode. Il apparaît seulement dans les préparations les plus riches en venin. Un second antigène que nous désignons par la lettre A est sensiblement iso-électrique à pH 8,2. Plusieurs arcs constituent ensuite le groupe des antigènes B. Peu distincts dans les immuno-électrophorèses du venin total, ils ont été l'objet d'une analyse approfondie dont les résultats sont exposés dans les paragraphes réservés aux fractions I et III.

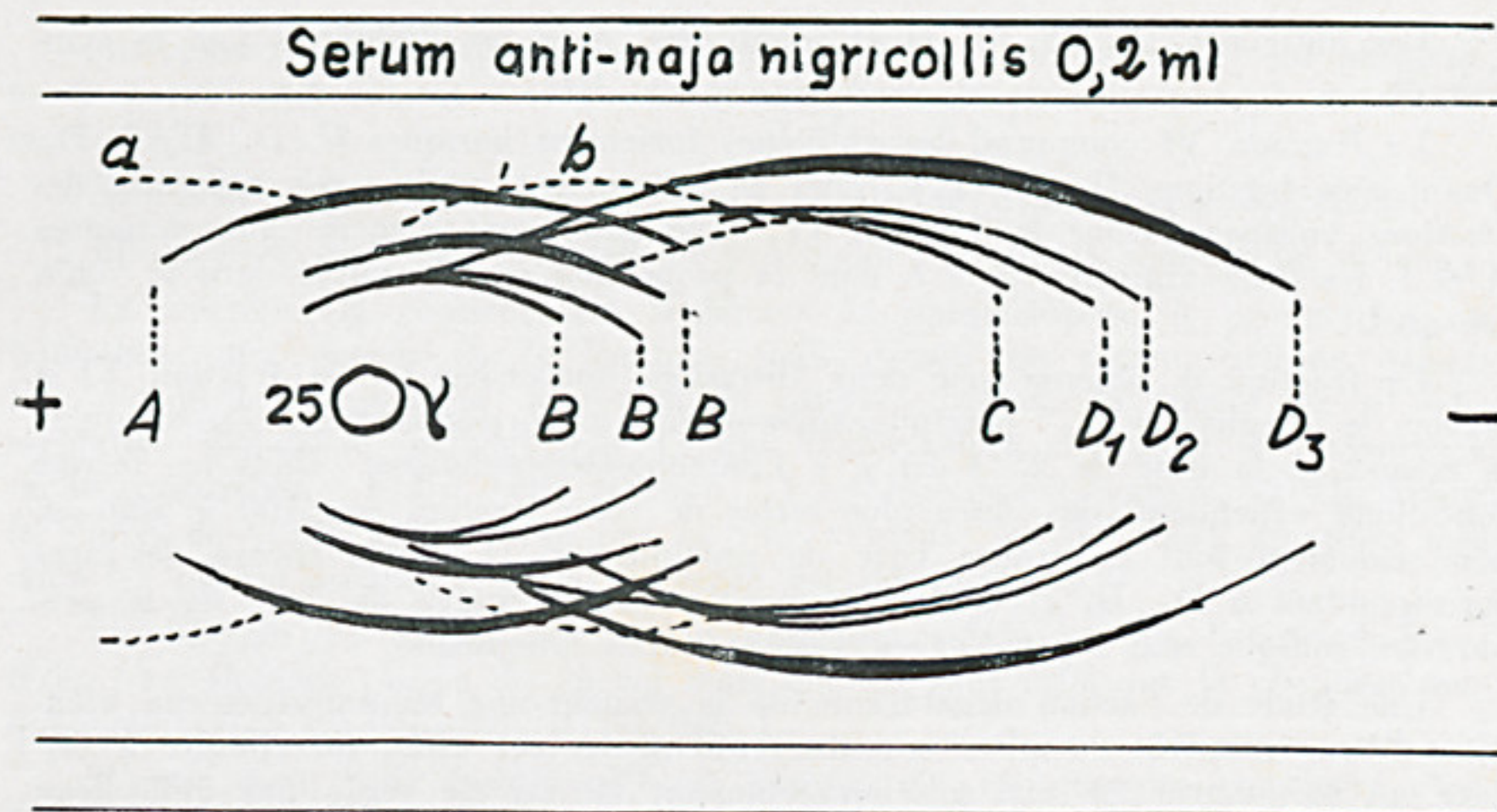


Fig. 3

Un antigène mal défini, *b* est observé dans les préparations qui contiennent une forte quantité de venin.

L'arc de précipité C correspond à un antigène basique. Cet arc est caractérisé par son amplitude et son aplatissement. Enfin, trois antigènes cathodiques précipitent selon les arcs D_1 , D_2 et D_3 . Onze parmi les treize antigènes dénombrés sont répartis dans les fractions I, III et VI.

La fraction I est essentiellement composée de 4 antigènes du groupe B et la fraction III contient l'antigène A et 3 antigènes du même groupe B.

Les expériences d'immuno-diffusion selon Ouchterlony démontrent que parmi ces antigènes un seul est commun aux fractions I et III. Cette observation est confirmée par l'expérience que voici. Lorsqu'on fait réagir suivant la même technique la fraction III sur un échantillon de sérum 984 épuisé par la fraction I ou la fraction I sur un échantillon du même sérum épuisé par la fraction III, trois lignes de précipité se forment dans chaque préparation. Au contraire le sérum 984 tel quel fait apparaître quatre lignes de précipité dans les préparations témoins. Cette observation nous a conduit à adopter la nomenclature suivante pour définir les antigènes du groupe B.

Fraction I	{	1B ₁	
		1B ₂	
		1B ₃	
		1B ₄	
		1B ₂ = 3B ₂ = B ₂	
Fraction III	{	3B ₁	
		3B ₂	
		3B ₃	
		A	

Les antigènes 1B₂ et 3B₂ étant identiques, nous les désignons par le symbole B₂.

La fraction VI comprend les antigènes fortement basiques C, D₁, D₂ et D₃. Quant aux fractions II, IV et V, elles se comportent comme des mélanges des fractions voisines. Dans la fraction IV, cependant, sont associés aux antigènes A et C les deux antigènes *a* et *b* dont la proportion semble faible dans le venin tel quel.

La fraction α , obtenue par deux filtrations successives de la fraction VI à travers le "Sephadex G₅₀" précipite suivant un arc correspondant à D₃ lorsqu'on la soumet, à la dose de 25 à 50 μ à l'immuno-électrophorèse. Dans les mêmes conditions, cependant, des doses plus fortes de cette fraction soit 100 à 500 μ g, non seulement font apparaître l'arc de précipitation D₃, mais encore des arcs correspondant à D₂, D₁ et C dont la position au voisinage de l'axe de la préparation indique que ces antigènes sont en faible proportion.

Une étude de l'action dénaturante de la chaleur sur les antigènes qui viennent d'être énumérés complète ces observations. A cet effet, on chauffe à 96° dans un bain-marie (2) une solution contenant 10 mg de venin par cm³ d'eau pure* et on prélève, à intervalles réguliers, des échantillons de cette solution qui sont aussitôt soumis à l'épreuve de l'immuno-électrophorèse.

Dans ces conditions en moins d'une minute l'antigène 1B₄ est privé de sa propriété de précipiter en présence de l'anticorps spécifique.

A l'exception de l'antigène B₂, les autres antigènes du groupe B ne précipitent plus après 5 minutes. Les délais de la perte de leur pouvoir de précipiter sont de 20 minutes pour l'antigène A, de 30 minutes pour l'antigène D₂, de 45 minutes pour l'antigène C, de 55 minutes pour l'antigène B₂ et de 60 minutes pour l'antigène D₃.

Parallèlement à ces recherches, nous avons entrepris de définir les propriétés enzymatiques et toxiques du venin de *Naja nigricollis* et à titre comparatif, celles des fractions obtenues à partir de ce venin.

Les techniques utilisées dans ces essais sont rapportées dans une publication séparée (4).

Si on admet que la dissociation des protéines par la méthode de filtration sur les "Sephadex" est fondée sur leur exclusion dans l'ordre décroissant de leurs masses moléculaires, on est conduit à penser que la fraction I est constituée par les protéines du venin dont la masse moléculaire est plus élevée.

Cette fraction I brise les liaisons carboxy-ester de l'acetylcholine mais elle est sans effet sur les acides aminés estérifiés. Une corrélation a été établie par Hamberg et Rocha e Silva (7) entre l'aptitude que possède le venin de *Bothrops jararaca* à hydrolyser le B.A.E.E et sa propriété de libérer de la bradykinine dans l'organisme animal.

Dans cet ordre de fait, ni le venin de *Naja nigricollis* ni aucune fraction examinée n'ont une action sur le B.A.E.E, le B.A.M.E, le T.A.M.E et l'A.T.E.E.

La même fraction I hydrolyse la liaison peptidique de la glycyl-leucine, et une des deux liaisons de la glycyl-glycyl-glycine et de la glycyl-leucyl-tyrosine mais elle est sans effet sur l'hémoglobine et la caséine.

* Eau desionisée.

Au contraire, elle rompt très aisément les liaisons phospho-ester du phosphate de paranitrophenol, de l'AMP, du bi-phosphate de paranitrophenol, de l'ADP et de l'ATP.

Son action dépolymérisante à l'égard de l'acide hyaluronique est faible.

Elle possède, enfin, la propriété de provoquer *in vitro* la coagulation du sang.

La fraction III contient non seulement la phospholipase A productrice de lysocithine aux dépens de la lécithine mais encore un facteur lytique direct. Elle détruit le complément du sérum de cobaye, diminue la vitesse de la sédimentation globulaire, dépolymérise l'acide hyaluronique et inhibe le phénomène de la coagulation. Enfin, cette fraction III est légèrement toxique, sa Ld_{50} pour la souris de 18-20 g. éprouvée par la voie veineuse est de 16,31 μ g alors que dans les mêmes conditions celle du venin est de 12,36 μ g.

La fraction VI exerce une action anticholinestérasique sur l'acétyl-cholinestérase des globules rouges du cheval mais elle est sans effet sur la cholinestérase que nous avons décelée dans la fraction I.

D'autre part, cette fraction VI est toxique et provoque des paralysies chez la souris et le lapin.

Le produit le plus pur que nous avons obtenu après deux filtrations de cette fraction à travers un gel de "Sephadex G₅₀", exerce encore une action anticholinestérasique mais sa Ld_{50} pour la souris est faible. Elle est de 2 μ g dans les conditions qui viennent d'être définies. Nous l'avons désignée sous le nom de toxine α , et nous avons conclu d'une étude préliminaire (4) que cette toxine est une protéine de faible poids moléculaire. Elle franchit, en effet, les membranes d'acétate de cellulose et son coefficient de sédimentation exprimé en unités Svedberg est 0,84 (centrifugeuse Spinco; cellule standard de 12 m/m, angle 2°; concentration du produit 10 mg/cm³; vitesse de rotation 59.780 t/m; temps de centrifugation 96 min; température ambiante 20° $\pm$ 0,1°).

Une première analyse de ses acides aminés révèle qu'elle contient de fortes proportions d'arginine, de glycine, de lysine, d'acide aspartique, d'acide glutamique et de threonine (3).

Une collaboration a été établie avec J. Porath, E. Karlsson et D. Eaker de l'Université d'Uppsala qui ont bien voulu consacrer une partie de leur activité à l'étude de la toxine α et entreprendre une analyse de la structure de ce polypeptide.

Ces résultats acquis, il importait d'établir une relation entre les antigènes définis par les méthodes immunologiques fondées sur la précipitation mutuelle des antigènes et des anticorps dans un gel et les diverses propriétés qui viennent d'être énumérées.

Des globules de cheval additionnés de lécithine puis versés à la surface d'une préparation de la fraction I ou du venin tel quel, soumis au préalable à une immuno-électrophorèse, sont lysés entre les arcs de précipité de l'antigène A qui peut ainsi être considéré comme étant la phospholipase. En l'absence de lécithine et de la solution tamponnée dont le phosphate se comporte comme un agent inhibiteur, on observe une hémolyse entre les arcs de l'antigène précipité 3B₃, homologue vraisemblablement du facteur lytique direct décrit par Habermann et Neumann (8) à propos d'autres venins.

L'emploi de la technique d'Uriel (9) adaptée à l'hydrolyse des dérivés phosphorés du nitrophenol permet de suivre l'action des six fractions sur les liaisons

phospho-ester. L'hydrolyse du biphosphate de paranitrophénol se développe entre les arcs de précipité de l'antigène 1B₁.

Les expériences sur la thermo-sensibilité des divers antigènes qui viennent d'être dénombrés nous enseignent qu'à la température de 96° l'antigène 1B₄ perd en quelques secondes son aptitude à former un précipité au contact de l'anticorps spécifique. Or dans les mêmes conditions la fraction I perd également sa propriété de coaguler le sang. Cette observation incite à identifier l'antigène thermolabile 1B₄ facteur accélérateur de la coagulation sanguine. Privée de ce facteur, la même fraction I exerce, au contraire, une action anticoagulante. On est conduit à conclure, d'une part, que dans les conditions habituelles d'expérimentation le facteur coagulant de la fraction I exerce une action dominante, et, d'autre part, que les propriétés anticoagulantes communes des fractions I et III sont vraisemblablement sous la dépendance d'un même facteur. Les fractions I et III contenant un antigène commun B₂, on est autorisé à penser que cet antigène est un facteur anticoagulant. A l'appui de cette hypothèse, l'expérience démontre que le facteur anticoagulant des fractions I et III et l'antigène B₂ ont la même sensibilité thermique.

On constate, enfin, que la neurotoxine α thermorésistante est représentée par l'antigène D₃. C'est à cet antigène que correspond le polypeptide récemment isolé dans un état voisin de la pureté par Karlsson, Eaker et Porath (10). Le tableau I résume ces observations.

TABLEAU I — ANTIGÈNES DU VENIN
DE *NAJA NIGRICOLLIS*

Code	Fonction presumée
a	?
A	Phospholipase
1B ₁	Ester hydrolase
3B ₁	?
B ₂	Facteur anticoagulant
1B ₃	?
3B ₃	Facteur hémolytique direct
1B ₄	Facteur coagulant
b	?
C	Anti enzyme?
D ₁	?
D ₂	?
D ₃	Toxine α

On peut considérer, pour conclure, que l'antigène A iso-électrique à pH 8,2 et l'antigène fortement basique D₃ représentent les protéines responsables, la première, de l'action hydrolysante du venin sur les lecithines et la seconde de son

action neurotoxique. On est conduit à admettre, d'autre part, qu'un certain nombre d'arguments plaident en faveur des relations de causalité que nous avons tenté d'établir entre divers antigènes et certaines activités enzymatiques exercées. Il apparaît cependant, que les propriétés physiologiques et biochimiques de plusieurs antigènes demeurent indéterminées et que le nombre des antigènes révélés par le phénomène immunologique de la précipitation est inférieur au nombre des activités actuellement connues du venin de *Naja nigricollis*. L'expérience nous enseignera dans quelle mesure une protéine est capable d'exercer plusieurs activités, dans un venin.

La question se pose également de savoir quelles relations peuvent être établies entre les antigènes caractérisés dans le venin de *Naja nigricollis* et les antigènes des autres venins de serpents. Des recherches immunologiques en voie de développement montrent que les venins de deux ELAPIDAE, *Naja haje* et *Naja naja* et celui d'un VIPERIDAE, *Echis carinatus* contiennent des protéines nocives dont la constitution est vraisemblablement voisine de celle de la toxine α . Dans cet ordre de faits, l'étude de la structure de cette "toxine" entreprise à Uppsala par Karlsson, Eaker et Porath, apportera l'élément essentiel d'une solution à ce problème.

BIBLIOGRAPHIE

1. BOQUET, P., *Toxicon*, 1966, à paraître.
2. BOQUET, P., IZARD, Y., JOUANNET, M. et MEAUME, J., *Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac.*, 33, 1966.
3. BOQUET, P., IZARD, Y., JOUANNET, M. et MEAUME, J., *C. R. Acad. Sci.*, 262, 1134, 1966.
4. BOQUET, P., IZARD, Y., MEAUME, J. et JOUANNET, M., *Mem. Inst. Butantan, Simp. Internac.*, 33, 1966.
5. OUCHTERLONY, O., *Acta Microbiol. scand.*, 32, 231, 1953.
6. GRABAR, P. et WILLIAMS, C. A., *Biochim. Biophys. Acta*, 17, 67, 1955.
7. HAMBERG, U., ROCHA E SILVA, M., *Experientia*, 13, 489, 1957.
8. HABERMANN, E. et NEUMANN, W., *Arch. exp. path. Pharmac.*, 223, 388, 1954.
9. URIEL, J., *Ann. Inst. Pasteur*, 101, 104, 1961.
10. KARLSSON, E., EAKER, D. et PORATH, J., *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, à paraître.

DISCUSSION

C. Y. Lee: "Is there any cardiotoxic component in the venom of *Naja nigricollis*? What is the molecular size of your neurotoxin?"

P. Boquet: "La présence de cardiotoxine n'a pas été recherchée. En ce qui concerne le poids moléculaire de la toxine, nous avons donné seulement le coefficient de sédimentation en unités Svedberg. Le Professeur Porath vous donnera de plus amples informations sur ce point."

S. Minton: "In which fraction of *Naja nigricollis* venom is the antigen shared with the venom of *Echis carinatus*?"

P. Boquet: "Une communante antigénique a été mise en évidence entre le venin de *Naja nigricollis* et l'échantillon de venin d'*Echis carinatus* qui nous a été adressé d'Ethiopie. Parmi les antigènes communs au venin de *Naja nigricollis* et au venin d'*Echis carinatus* étudiés, il convient de citer un antigène basique correspondant à l'antigène neurotoxique."

F. Kornalik: "How have you tested the procoagulant and anticoagulant properties of the *Naja nigricollis* venom?"

P. Boquet: "L'action du venin de *Naja nigricollis* sur la coagulation du sang a été mesurée selon les techniques usuelles (détermination du temps de prothrombine, etc...) au moyen du plasma humain."