

TOXICOLOGIE

Étude des venins des principaux serpents venimeux de Guyane française et de leur neutralisation.

J. Estévez (1), P. Magaña (1), J.-P. Chippaux (2), N. Vidal (3), R. Mancilla (1), J.F. Paniagua (4) & A.R. de Roodt (5)

(1) Instituto Bioclón, Calzada de Tlalpan 4687, Col. Toriello Guerra, México DF, México.

(2) Institut de recherche pour le développement, UR 010 " Santé de la mère et de l'enfant en milieu tropical ", La Paz, Bolivie. CP 9214, La Paz, Bolivie. Courriel : chippaux@ird.fr

(3) Département Systématique et évolution, UMR 7138, Systématique, évolution, adaptation, Muséum national d'histoire naturelle, Paris, France.

(4) Laboratorios Silanes S.A. de C.V., Dirección de Investigación y Desarrollo, Amores 1304, Col. del Valle, México DF, México.

(5) Área de Investigación y Desarrollo / Serpentario. Instituto Nacional de Producción de Biológicos – ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Ministerio de Salud, Buenos Aires, Argentina.

Manuscrit n° 3174. "Toxicologie". Reçu le 9 octobre 2007. Accepté le 18 décembre 2008.

Summary: Study on the venoms of the principal venomous snakes from French Guiana and the neutralization.

We studied some biochemical, toxic and immunological characteristics of the venoms of *Bothrops atrox*, *Bothrops brazili* and *Lachesis muta*, Viperidae responsible for most of the bites of venomous snakes in French Guiana. Chromatographic (HPLC) and electrophoretical profiles (SDS-PAGE), lethal, hemorrhagic, defibrinogenating, coagulant, thrombin like, proteolytic, fibrino(geno)lytic and phospholipase activities were studied. In addition, the neutralization of some toxic activities conferred by four antivenins was compared. The chromatographic and electrophoretic profiles were different for the three venoms, showing differences between *Bothrops* and *L. muta* venoms. In general, bothropic venoms showed the highest toxic and enzymatic activities, while the venom of *L. muta* showed the lowest lethal, hemorrhagic and coagulant activities. The enzymes of bothropic venoms responsible for gelatinolytic activity were around 50-90 kDa. All the venoms were able to hydrolyze α and β chains of the fibrinogen, showing different patterns of degradation. Although all the antivenoms tested were effective to various degrees in neutralizing the venom of *B. brazili* and *B. atrox*, neutralization of *L. muta* venom was significantly better achieved using the antivenom including this venom in its immunogenic mixture. For the neutralization of *L. muta* venom, homologous or polyvalent antivenoms that include the "bushmaster" venom in their immunogenic mixture should be preferred.

Résumé:

Nous avons étudié certaines caractéristiques biochimiques, pharmacologiques et immunologiques des venins de *Bothrops atrox*, *B. brazili* et *Lachesis muta* (le « maître de la brousse »), Viperidae responsables de la plupart des morsures par serpents venimeux en Guyane française. Les profils chromatographiques (HPLC) et électrophorétiques (SDS-PAGE), ainsi que les activités létale, hémorragique, défibrinante, coagulante, thrombinique, protéolytique, fibrino(géno)lytique et phospholipase ont été étudiées. En outre, la neutralisation des activités toxiques et enzymatiques par quatre antivenins a été comparée. Les profils chromatographiques et électrophorétiques étaient différents dans les trois venins. Généralement, les venins de *Bothrops* ont présenté les activités toxiques et enzymatiques les plus élevées, alors que la toxicité et les activités hémorragiques ou coagulantes du venin de *Lachesis muta* étaient plus faibles. Les enzymes des venins de *Bothrops* responsables de l'activité gélatinolytique avaient une masse molaire voisine de 50-90 kDa. Tous les venins hydrolysaient les chaînes α et β du fibrinogène, montrant différents profils de dégradation. Alors que tous les antivenins examinés ont neutralisé à différents degrés le venin de *B. brazili* et *B. atrox*, la neutralisation du venin de *L. muta* était significativement plus forte avec le seul antivenin incluant ce venin dans sa préparation. Pour la neutralisation du venin de *L. muta*, des antivenins monovalents ou polyvalents incluant le venin du « maître de la brousse » dans leur préparation devraient être privilégiés.

Introduction

Les accidents d'envenimation par morsure de serpents venimeux sont fréquents dans les régions tropicales parce que la densité de serpents y est plus élevée et que de nombreuses causes environnementales et biologiques favorisent le contact entre l'homme et les serpents venimeux. En Amérique, les principaux serpents responsables des accidents appartiennent à la famille des *Viperidae* (4, 5, 29) et les principaux genres impliqués dans les envenimations sont *Bothrops* (fer de lance), *Crotalus* (serpent à sonnettes) et *Lachesis* (maître de la brousse

ou *bushmaster*) (5, 18, 29). En Amérique centrale et du Sud, ces genres sont responsables de la majorité des envenimations humaines (25, 30).

En Guyane française, les morsures de serpent sont fréquentes et les principales espèces impliquées sont des serpents des genres *Bothrops* et *Lachesis* (9). Jusqu'à présent, aucun antivenin développé avec des venins de serpents guyanais n'est disponible et la seule possibilité est d'utiliser des antivenins obtenus à partir de pays étrangers (8).

Dans ce travail, nous avons étudié certaines caractéristiques biochimiques et toxiques du venin des trois serpents

venoms
toxicity
Bothrops atrox
Bothrops brazili
Lachesis muta
snakes
antivenoms
French Guyana
South America

venins
toxicité
Bothrops atrox
Bothrops brazili
Lachesis muta
serpents
antivenins
Guyane française
Amérique du Sud

d'importance sanitaire en Guyane française, *Bothrops atrox*, *B. brazili* et *Lachesis muta*. Nous avons également mesuré la neutralisation de certaines de leurs activités toxiques ou enzymatiques par trois antivenins commerciaux disponibles dans cette région, ainsi qu'un antivenin expérimental, aujourd'hui commercialisé.

Matériel et méthodes

Venins

Les venins de *Bothrops atrox*, *B. brazili* et *Lachesis muta* ont été obtenus par l'un des auteurs (NV) à partir d'adultes capturés en Guyane et prélevés manuellement sur place; les venins ont été desséchés sous vide. Tous les venins étaient stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les tests ont été effectués à partir d'un mélange des échantillons de venins de même espèce.

SDS-PAGE

Des échantillons contenant 25 μg de venin ont été mis à migrer en milieu non-réducteur sur un gel vertical d'acrylamide de 12,5 % en utilisant le système discontinu de tampon décrit par LAEMMLI (20). Pour l'évaluation des masses molaires des protéines de venin, un kit de marqueurs (Broad Range, BioRad) a migré dans le même gel. Les gels ont été colorés au bleu de Coomassie (Brilliant Blue R, Sigma).

Chromatographie

Des échantillons contenant 200 μg de chaque venin dilués dans 80 μl d'eau distillée ont migré dans une colonne C 18 en chromatographie liquide sous haute pression (HPLC, Waters), en utilisant un gradient d'acétonitrile (5 à 40 %), pendant 35 minutes à un débit de 1 ml·mn⁻¹. L'absorbance de l'éluat a été lue à 280 nm.

Détermination des activités toxiques et enzymatiques

Toxicité

Elle a été déterminée par titrage sur souris en suivant les recommandations de la pharmacopée mexicaine (1) et du ministère de la santé du Brésil (26). Des doses croissantes de chaque venin diluées dans du sérum physiologique à 0,15 M de NaCl ont été administrées par voie intraveineuse (i.v.). Huit souris CF-1 de 18 à 22 grammes ont été utilisées pour chaque dose administrée sous un volume de 0,2 ml. Les décès ont été enregistrés après une mise en observation de 48 h. La dose mortelle 50 % (DL₅₀), définie comme la dose de venin qui tue 50 % des souris envenimées, a été déterminée par la méthode de Spearman et Karber (27) qui répond à une loi log-probit. Les tests de toxicité ont été effectués au laboratoire de l'Institut de biotechnologie de l'Université nationale autonome du Mexique à Cuernavaca qui possède son propre élevage et l'habilitation à mener des expérimentations sur les animaux conformément à la pharmacopée mexicaine.

Activité hémorragique

Elle a été déterminée selon la méthode décrite par THEAKSTON et REID (34) modifiée par FERREIRA *et al.* (16). Des quantités croissantes (de 1 à 300 μg) de chaque venin diluées dans 100 μl de sérum physiologique à 0,15 M, ont été injectées par voie intradermique (i.d.) dans la peau du dos préalablement rasée de souris CF-1. Après 3 h, les souris ont été sacrifiées et le plus grand diamètre de la tache hémorragique observée sur la face interne de la peau du dos a été mesuré avec un pied à coulisse. La dose minimale hémorragique (MHD) a été con-

sidérée comme la plus petite dose de venin produisant une lésion hémorragique d'un centimètre de diamètre. Chaque test a été exécuté en triple.

Activité coagulante

Elle a été déterminée sur plasma humain ajusté à 2,8 g de fibrinogène comme décrit par THEAKSTON et REID (34). Nous avons ajouté à 200 μl de plasma humain des quantités croissantes (1 à 200 μg) de chaque venin diluées dans 50 μl de sérum physiologique à 0,15 M. La dose minimale coagulante sur le plasma humain (MCD-P) a été estimée comme la dose minimale de venin produisant la coagulation en 60 secondes et a été exprimée en mg·l⁻¹ (34) ou en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (21). Chaque test a été reproduit cinq fois.

Activité thrombinique

Elle a été déterminée sur le fibrinogène de bovin (2 % en sérum physiologique à 0,15 M) comme décrit par THEAKSTON et REID (34). Nous avons ajouté à 200 μl de sérum de fibrinogène des quantités croissantes (1 à 200 μg) de chaque venin diluées dans 50 μl de sérum physiologique à 0,15 M. La dose minimale coagulante sur fibrinogène de bovin (MCD-F) a été estimée comme la dose de venin produisant une coagulation en 60 secondes et a été exprimée en mg·l⁻¹ (34) ou en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (21). Chaque test a été renouvelé cinq fois.

Activité défibrinogénante

La dose minimale défibrinogénante (MDD) a été déterminée selon la méthode décrite par THEAKSTON et REID (34). Des groupes de 6 souris CF-1 de 18 à 20 g ont reçu des doses croissantes infra-létales de chacun des venins en i.v. Après 1 heure, les souris ont été anesthésiées à l'éther, puis du sang a été prélevé dans le plexus veineux rétro-orbitaire à l'aide de tubes capillaires non héparinés; la présence ou l'absence de la coagulation pour chaque dose a été observée. La MDD a été estimée comme la dose minimale de venin qui produit une absence de coagulation sanguine en 60 minutes. Chaque test a été exécuté en triple.

Activité fibrino(géno)lytique

Elle a été effectuée en utilisant des méthodes classiques (11). Des échantillons contenant 1,8 ml de fibrinogène de bovin à 2 % (Sigma) ont été mélangés avec 400 μg de chaque venin dilué dans 200 μl de sérum physiologique à 0,15 M. Après incubation du mélange pendant 120 minutes à 37 $^{\circ}\text{C}$, des échantillons de 20 μl ont été prélevés puis déposés sur un gel de SDS-PAGE (acrylamide/bisacrylamide à 10 % en milieu réducteur) en système discontinu comme décrit par LAEMMLI (20). Après la migration, les gels ont été fixés et colorés au bleu de Coomassie. Des témoins ont été déposés dans les mêmes gels : fibrinogène préparé dans les mêmes conditions, sans venin (témoin négatif) et mélangé avec du venin de *Bothrops asper* comme témoin.

Hydrolyse protéolytique (zymogramme) de gélatine

Elle a été effectuée en utilisant la méthode décrite par MARKLAND et PERDON (24) avec quelques modifications (11). Des échantillons contenant 100 μg de venin ont migré sur un gel de SDS-PAGE (acrylamide/bisacrylamide à 10 %) contenant 5 % de gélose pour biologie moléculaire (BioRad), en milieu non réducteur sans ébullition préalable et en système discontinu comme décrit par LAEMMLI (20). L'évaluation des masses molaires a été effectuée en utilisant le kit de marqueurs comme décrit précédemment. Après avoir pris une photo de chacun d'eux, les gels, lavés trois fois avec de l'eau distillée, puis avec un sérum physiologique à 0,15 M, sont ensuite incubés dans une solution de tampon phosphate

à pH 7,4 pendant 180 minutes à 37 °C et colorés au bleu de Coomassie : l'absence de coloration correspond à l'action des enzymes protéolytiques.

Activité gélatinolytique

Des doses décroissantes (500 à 6,25 µg) de chaque venin diluées en sérum physiologique à 0,15 M ont été mélangées à 1 ml de gélatine à 20 % (BioRad) à 37 °C. Les échantillons ont été incubés pendant 6 heures à 37 °C, puis ont été laissés à la température ambiante. La présence ou l'absence de liquéfaction de la gélatine a été observée et la dose minimale de venin produisant la liquéfaction notée (12).

Activité phospholipasique

Cette activité enzymatique a été étudiée sur le jaune d'œuf (13). Nous avons mélangé dans une boîte de Pétri, 15 ml d'agarose à 1 % (Sigma) en sérum physiologique à 0,15 M. avec 0,5 ml de jaune d'œuf et 100 µl d'une solution de 100 mM de CaCl₂. Après solidification, des doses croissantes de venins dilués dans 40 µl de sérum physiologique à 0,15 M. ont été placés dans les puits de 5 mm de diamètre perforés dans la phase solide. Après incubation à la température ambiante pendant 48 heures, les halos de l'hydrolyse radiale ont été mesurés et le pouvoir hydrolytique a été estimé comme la dose de venin capable de produire un halo d'un diamètre moyen de 2 centimètres; la dose a été exprimée en microgrammes de venin. Chaque test a été reproduit cinq fois.

Antivenins

Les antivenins utilisés dans la présente étude ont été l'Antivipmyn® (AV; Bioclón, Mexique, lot B-2E-05), l'Antibotrópico-Crotálico® (ABC; Instituto Butantan, São-Paulo, lot 9810123/A), l'Antibotrópico® (AB; Instituto Vital Brazil, Rio de Janeiro, lot 951118) et l'Antivipmyn-Tri® expérimental (Exp-AV3; Bioclón, México), aujourd'hui commercialisé sous le même nom. L'AV est produit en immunisant des chevaux avec du venin de *B. asper* et *Crotalus durissus terrificus* selon les recommandations de la pharmacopée mexicaine (1). L'ABC est produit en immunisant des chevaux avec un mélange de venins de *Bothrops* (50 % de venin de *B. jararaca* et 12,5 % de venin de chacune des espèces suivantes : *B. alternatus*, *B. neuwiedii*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*; 15) et du venin de *C. durissus terrificus* (6). L'AB est produit en immunisant des chevaux avec les venins de *Bothrops* brésiliens. Enfin, l'Exp-AV3 est produit en immunisant des chevaux avec du venin de différents *Bothrops* d'Amérique latine, de *C. durissus terrificus* et de *Lachesis muta*. La teneur en protéines des antivenins était respectivement de 2,2 g·dl⁻¹, 4,5 g·dl⁻¹, 5,2 g·dl⁻¹ et 4,2 g·dl⁻¹. Les antivenins commerciaux étaient des fragments d'immunoglobulines (F(ab')₂) et Exp-AV3 était composée d'immunoglobulines entières (IgG), précipitées par l'acide caprylique (28).

Neutralisation des activités toxiques

Neutralisation de la létalité

Des doses croissantes de chacun des antivenins ont été incubées avec 3 DL50 des différents venins pendant 30 minutes à 37 °C puis 0,2 ml du mélange en sérum physiologique à 0,15 M a été injecté en i.v. chez les souris CF-1 (18-22 g, n = 8 par dose). Les décès ont été enregistrés 48 h après injection et la dose efficace à 50 % (ED50) a été estimée comme la dose d'antivenin nécessaire pour assurer la survie de 50 % des souris. Des témoins ont reçu 3 DL50 de venin sous un volume de 0,3 ml en sérum physiologique à 0,15 M. Les doses administrées et le délai d'observation étaient conformes à la pharmacopée

mexicaine (1). Les résultats ont été analysés par la méthode Spearman et Karber (27).

Neutralisation de l'activité hémorragique

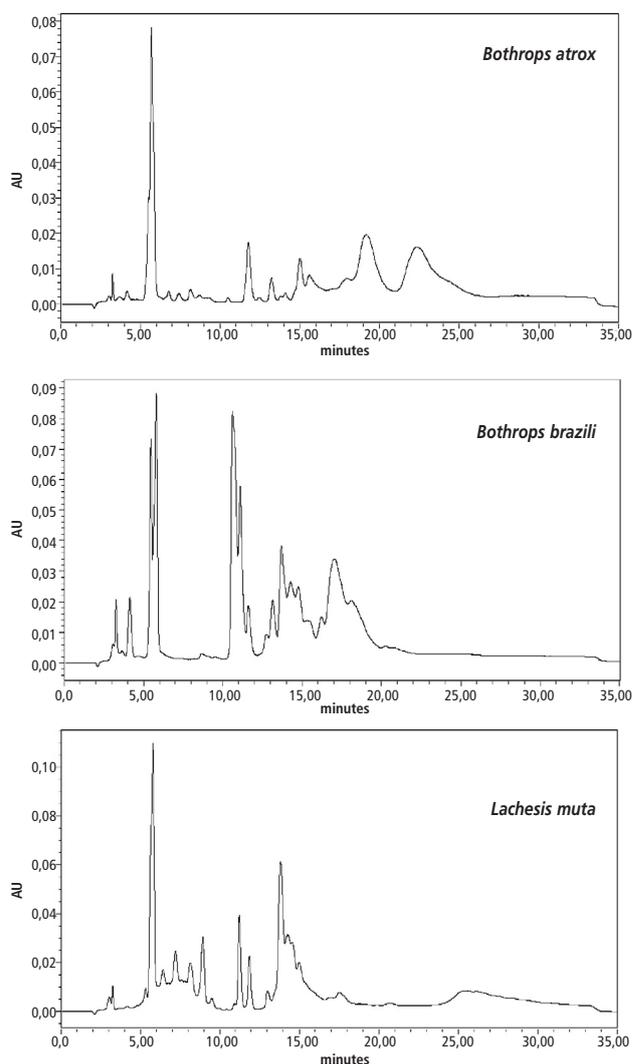
Les souris CF-1 ont reçu en i.d. dans le dos 100 µl de mélange contenant 3 MHD de chaque venin dilué en sérum physiologique à 0,15 M incubé avec des quantités croissantes de chacun des antivenins (1 à 80 µl) pendant 30 minutes à 37 °C. Des témoins ont reçu 3 MHD de venin dilué en sérum physiologique à 0,1 M. Après 3 h, des souris ont été sacrifiées par anesthésie à l'éther et les halos hémorragiques ont été mesurés comme décrit ci-dessus. La capacité neutralisante a été définie comme la dose d'antivenin réduisant de 50 % le diamètre des cercles hémorragiques en comparaison avec les témoins (34). Les résultats ont été effectués à l'aide du logiciel Prism3 (GraphPad inc., San Diego, CA) qui utilise une analyse non paramétrique des résultats.

Neutralisation de l'activité coagulante

Une quantité fixe de venin correspondant à 4 MCD-P (soit 40 µg de venin de *B. atrox*, 25 µg de venin de *B. brazili* et 200 µg de celui de *L. muta*) dissoute dans 0,5 ml de sérum physiologique à 0,15 M. a été incubée pendant 30 minutes à 37 °C avec des quantités croissantes (1 à 100 µl) de chacun des antivenins complétées à 110 µl par sérum physiologique à 0,15 M. Puis nous avons ajouté 0,5 ml de plasma humain ajusté à 2,8 g·l⁻¹ de fibrinogène. Nous avons ensuite mesuré le temps

Figure 1.

Profil chromatographique en HPLC des venins de *B. atrox*, *B. brazili* et *L. muta*.
Chromatographic profiles of the venoms of *B. atrox*, *B. brazili* and *L. muta*



de coagulation pour chacun des tubes. Les témoins étaient constitués par des échantillons sans antivenin. La capacité neutralisante des antivenins a été exprimée comme la dose minimale d'antivenin qui a retardé le temps de coagulation de plus de cinq minutes en comparaison avec les témoins.

Neutralisation de l'activité thrombinique

Une quantité fixe de venin correspondant à 1,2 MCD-F (soit 120 µg de venin de *B. atrox*, 75 µg de venin de *B. brazili* venom et 900 µg de celui de *L. muta*) dissoute dans 0,5 ml de sérum physiologique à 0,1 M. a été incubée pendant 30 minutes à 37 °C avec des quantités croissantes (1 à 100 µl) de chacun des antivenins, complétées à 110 µl par du sérum physiologique à 0,15 M. Puis nous avons ajouté 0,5 ml d'une solution de fibrinogène bovin à 2 %. Nous avons ensuite mesuré le temps de coagulation pour chacun des tubes. Les témoins étaient constitués par des échantillons sans antivenin. La capacité neutralisante des antivenins a été exprimée comme la dose minimale d'antivenin qui a retardé le temps de coagulation de plus de cinq minutes en comparaison avec les témoins.

Résultats

Les profils chromatographiques et électrophorétiques sont présentés sur la figure 1. Le nombre de crêtes et la vitesse d'éluion des principales fractions ont différé selon les venins, excepté la première, la plus élevée, qui est apparue en 5 minutes environ pour tous les venins étudiés. Le venin de *B. atrox* a montré 7 pics principaux tous élués en moins de 25 minutes (figure 1a). Le venin de *B. brazili* a montré 14 pics qui ont été élués en moins de 18 minutes (figure 1b). Le venin de *L. muta* a montré 12 pics, élués en moins de 19 minutes (figure 1c).

Les profils électrophorétiques ont également montré de grandes différences entre les trois venins. Celui de *B. brazili* a présenté les bandes les plus denses au-dessous de 45 kDa. Celui de *B. atrox* comporte quelques bandes au-delà de 100 kDa, mais les plus importantes se situent autour de 40-48 et 20-30 kDa. Enfin, *L. muta* possède un venin dont quelques bandes sont supérieures à 100 kDa et les plus denses autour de 24 kDa. Tous les venins ont présenté des bandes fortement colorées autour de 7-15 kDa (figure 2).

Les résultats de l'étude des activités toxiques et enzymatiques sont détaillées dans le tableau I et sur les figures 3 et 4. Nous avons utilisé les tests recommandés par l'OMS (27) et décrits en détail avec les modalités de représentation des résultats par THEAKSTON et REID (34). Tous les venins ont hydrolysé le fibrinogène montrant l'hydrolyse des chaînes α et β du fibrinogène et une digestion partielle de la chaîne γ (figure 3). Le venin de *B. brazili* a montré l'hydrolyse la plus complète avec une absence des chaînes α et β , tandis que les venins de *B. atrox* et *L. muta* montraient des fragments de masse moléculaire inférieure à celle des chaînes de fibrinogène.

L'activité hydrolytique sur la gélatine était présente dans les trois venins. L'activité du venin de *B. atrox* est la plus élevée (12,5 µg), suivie par ceux de *B. brazili* (25 µg) et de *L. muta* (100 µg). Le zymogramme a montré que les masses molaires des enzymes responsables de cette activité se situent entre 50 et 90 kDa (figure 4), ce qui est concordant avec les masses molaires des métalloprotéases des venins de serpent (2, 23).

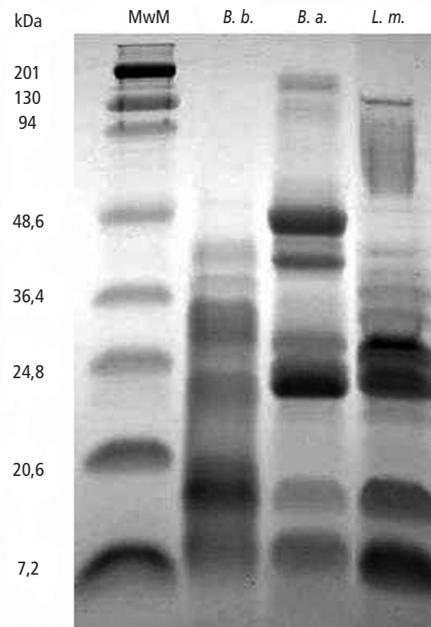
Le venin de *B. brazili* a montré les activités létale (36 µg), coagulante (2,4 µg), thrombinique (25 µg) et phospholipase (0,3 µg) les plus élevées. Le venin de *B. atrox* a montré l'activité defibrinogénante la plus élevée (5 µg). Enfin, le venin de *L. muta* a montré les plus faibles activités toxiques

et enzymatiques, excepté l'activité defibrinogénante qui était plus élevée que celle de *B. brazili*.

Les résultats des expériences de neutralisation sont présentés dans le tableau II. La neutralisation la plus efficace du venin de *B. atrox* a été obtenue avec les antivenins AB, ABC et Exp-AV3 ($p < 0,05$). Ce dernier antivenin était au moins deux fois plus efficace que les autres pour ce qui concerne la neutralisation du venin de *B. brazili*. La neutralisation du venin de *L. muta*, comme prévisible, a été très significativement supérieure ($p < 0,05$) avec l'antivenin qui incluait ce venin dans sa préparation (Exp-AV3).

Figure 2.

Profils électrophorétiques en SDS-PAGE des venins de *Bothrops atrox* (B. a.), *B. brazili* (B. b.) et *Lachesis muta* (L.m.).
SDS-PAGE profiles under non reducing conditions profiles of the venoms of *Bothrops atrox* (B. a.), *B. brazili* (B. b.) and *Lachesis muta* (L. m.).



Les marqueurs de masses molaires (MwM) exprimés en kDa sont à gauche du gel (The molecular weight markers (MwM) expressed in kDa are at the left of the gel).

Figure 3.

Activité fibrino(géno)lytique des venins de *Bothrops asper* (B. asp.), *Bothrops atrox* (B. atr.), *B. brazili* (B. braz.) et *Lachesis muta* (L. m.) sur le fibrinogène (Fibr.)
Fibrino(geno)lytic activity of the venoms of *Bothrops asper* (B. asp.), *Bothrops atrox* (B. atr.), *B. brazili* (B. braz.) and *Lachesis muta* (L. m.) on the fibrinogen (Fibr.).

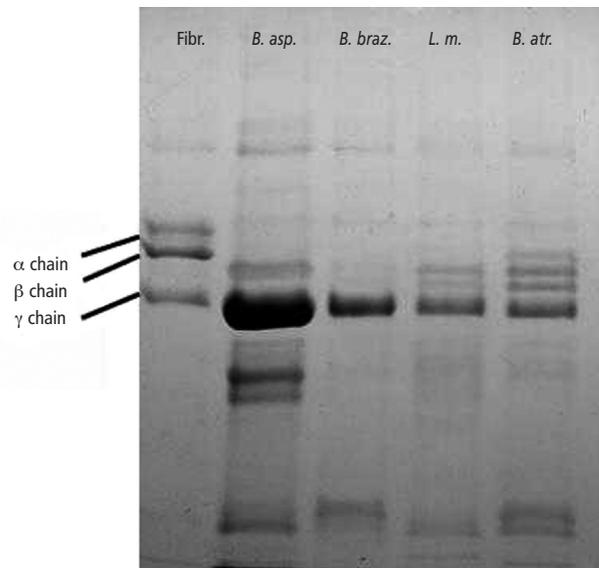
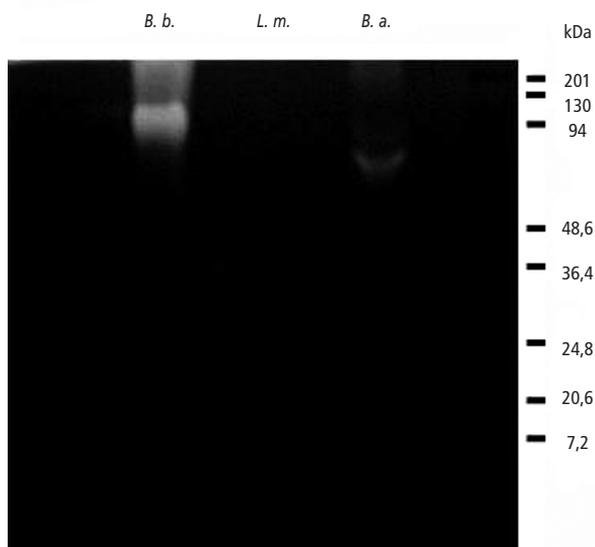


Figure 4.

Hydrolyse protéolytique (zymogramme) de gélatine par les venins de *Bothrops atrox* (B. a.), *B. brazili* (B. b.) et *Lachesis muta* (L. m.).
 Proteolytic hydrolysis (zymogram) of gelatin by the venoms of *Bothrops atrox* (B. a.), *B. brazili* (B. b.) and *Lachesis muta* (L. m.).



Les marqueurs de masses molaires exprimés en kDa sont à droite du gel
 (The molecular weight markers expressed in kDa are at the right of the gel)

Les antivenins AB, ABC et Exp-AV3 ont neutralisé l'activité coagulante du venin de *B. atrox*, tandis que les antivenins AB et ABC ont montré le meilleur pouvoir neutralisant sur le venin de *B. brazili*. Seuls les antivenins AV et Exp-AV-3 ont neutralisé l'activité coagulante du venin de *L. muta*; le second s'est révélé le plus efficace. Les résultats des analyses de neutralisation des enzymes thrombiniques montrent que l'antivenin Exp-AV3 était le plus efficace, bien que l'ABC ait neutralisé à la même dose cette activité dans le venin de *B. atrox*.

L'hémorragie a été mieux neutralisée par l'Exp-AV3 et l'ABC; le pouvoir neutralisant du premier, cependant, était significativement plus élevé que celui des antivenins AV et AB ($p < 0,05$).

Discussion

Les venins ont montré des différences électrophorétiques et chromatographiques, y compris entre les deux venins de *Bothrops* (figures 1 et 2).

Les activités toxiques des venins étaient similaires à ce qui est décrit pour les autres venins sud-américains de *Bothrops* sp et *Lachesis* sp (11; 31). Les activités hémorragique, coagulante, thrombinique et défibrinogénante étaient élevées dans le venin des trois serpents et confirmaient les observations cliniques chez les personnes mordues par ces serpents (5, 8, 9, 25). Bien que le venin de *B. brazili* ait montré des activités toxiques et enzymatiques supérieures à celui de *B. atrox*, les valeurs observées étaient voisines. En revanche, les activités du venin de *Lachesis* étaient inférieures à celles des venins de *Bothrops*, à l'exception de l'activité défibrinogénante supérieure à celle du venin de *B. brazili*. Cependant, on ne doit pas en déduire que les morsures de *Lachesis* représentent un risque vital ou d'incapacité moindre,

puisque ces serpents peuvent injecter des quantités de venin très supérieures à celles des *Bothrops*: les accidents par le « bushmaster » restent une urgence médicale (2, 19, 25, 32). L'activité hémorragique exprimée en MDH traduit l'action des métalloprotéases hémorragiques qui dégradent les endothéliums et provoquent l'inflammation locale, l'extravasation et les saignements locaux persistant plusieurs heures ou jours après la morsure (23). Les trois venins présentent une MHD basse avec une activité nettement plus hémorragique pour les *Bothrops*.

Tous les venins hydrolysent le fibrinogène. L'hydrolyse du fibrinogène par chacun des venins produit des fragments distincts, ce qui suggère des mécanismes de dégradation différents selon les venins (figure 4). Chez les *Viperidae*, auxquels appartiennent les trois espèces guyanaises étudiées, le fibrinogène est généralement dégradé par des enzymes thrombiniques dont la composition et le mode d'action varient selon l'espèce (3, 23). Cliniquement, cela se traduit par une rapide consommation du fibrinogène et une incoagulabilité sanguine par défibrination. Au plan thérapeutique, l'antivenin doit avoir été fabriqué avec un venin contenant l'enzyme thrombinique correspondante ou une enzyme dont la composition voisine favorise une immunogénicité croisée. En outre, les inhibiteurs classiques de la thrombine (héparine, hirudine, par exemple) n'ont que peu d'effets sur ces enzymes thrombiniques, ce qui réduit le champ des médicaments anti-hémorragiques utilisables.

Les activités gélatinolytique et, dans une moindre mesure, phospholipasique traduisent le pouvoir nécrosant du venin. Bien que les trois venins aient hydrolysé la gélatine, des bandes d'hydrolyse n'ont été observées que dans le zymogramme des venins de *B. brazili* (masse molaire autour de 90 kDa) et *B. atrox* (entre 50-90 kDa). Cependant, la nécrose clinique observée lors de la morsure par ces deux espèces est très différente (9). L'envenimation par *B. atrox* se manifeste par une nécrose externe progressive, tandis que celle de *B. brazili* est profonde, plus caractéristique d'une myolyse respectant la peau et l'aponévrose. Il est possible que l'activité phospholipasique plus puissante du venin de cette dernière espèce y soit associée. Le venin de *L. muta* n'a pas montré de bandes d'hydrolyse, même avec des quantités de venin supérieures à 100 µg (données non présentées). Cependant, l'activité protéolytique de ce venin sur la gélatine est confirmée par l'hydrolyse de ces substrats et son activité hémorragique (tableau I). L'activité protéolytique sur la gélatine est liée à l'activité hémorragique (14), ce qui est confirmé dans cette étude puisque les venins présentant une forte activité hémorragique étaient ceux qui ont montré l'activité gélatinolytique la plus élevée (tableau I).

La capacité neutralisante voisine des quatre antivenins sur la toxicité globale de *B. atrox* peut s'expliquer par les venins utilisés pour leur préparation. Ces antivenins sont fabriqués,

Tableau I.

venin	Activités biologiques des venins de <i>Bothrops atrox</i> , <i>B. brazili</i> et <i>Lachesis muta</i> (\pm deviation standard; $p = 0,05$). <i>Biological activities of the venoms from Bothrops atrox, B. brazili and Lachesis muta</i> (\pm standard deviation; $p = 0.05$).						
	DL50 (µg/souris)	MHD (µg/souris)	MCD-P (mg/l) [µg/ml]	MCD-F (mg/l) [µg/ml]	MDD (µg/mice)	activité gélatinolytique (µg)	activité phospholipasique (µg)
<i>Bothrops atrox</i>	57 (44-73)	24 \pm 1	19 [19 \pm 0,5]	195 [195 \pm 20]	5	6.25	7,7 \pm 1.6
<i>Bothrops brazili</i>	36 (32-41)	24 \pm 5	12 [12 \pm 3]	125 [125 \pm 15]	80	12.5	0,3 \pm 0.1
<i>Lachesis muta</i>	125 (105-139)	57 \pm 10	90 [90 \pm 13]	1500 (1500 \pm 120)	30	100	41,1 \pm 15.4

MDH = dose minimale hémorragique (*minimal hemorrhagic dose*)

MCD-P = dose minimale coagulante sur plasma humain (*minimal coagulant dose on human plasma*)

MCD-F = dose minimale coagulante sur fibrinogène bovin (*minimal coagulant dose on bovine fibrinogen*)

MDD = dose minimale défibrinogénante (*minimal defibrinogenating dose*)

Tableau II.

Neutralisation des activités toxiques par les antivenins AB (antibothropic, Instituto Vital Brazil), ABC (antibothropic-crotalic, Butantan Institute), AV (Antivipmyn NR, Instituto Bioclon) et Exp-AV3 (experimental antibothropic, crotalic and Lachesis antivenin).
Neutralization of toxic activities by antivenoms AB (antibothropic, Instituto Vital Brazil), ABC (antibothropic-crotalic, Butantan Institute), AV (Antivipmyn NR, Instituto Bioclon), Exp-AV3 (experimental antibothropic, crotalic and Lachesis antivenin).

venin	toxicité (μ l d'antivenin neutralisant 3 DL50) ¹			coagulation du plasma (μ l d'antivenin neutralisant 4 MCD-P)			coagulation du fibrinogène (μ l d'antivenin neutralisant 1,2 MCD-F)			hémorragie (μ l d'antivenin neutralisant 3 MHD) ¹		
	<i>B. atrox</i>	<i>B. brazili</i>	<i>L. muta</i>	<i>B. atrox</i>	<i>B. brazili</i>	<i>L. muta</i>	<i>B. atrox</i>	<i>B. brazili</i>	<i>L. muta</i>	<i>B. atrox</i>	<i>B. brazili</i>	<i>L. muta</i>
antivenin												
AB	7,8 (5,7-10,8)	27,0 (26,5-27,5)	245,9 (229,3-263,7)	25	50	>100	50	100	>100	11 (8-13)	6 (4-7)	60 (52-69)
ABC	40,3 (31,8-51,0)	35,5 (34,3-36,7)	104,4 (71,8-151,8)	25	50	>100	100	>100	>100	9 (6-13)	6 (3-9)	11 (7-16)
AV	7,8 (5,7-10,8)	130,0 (124,6-135,7)	300,4 (296,6-304,4)	>100	>100	50	>100	>100	>100	16 (13-18)	7 (5-10)	24 (16-35)
Exp-AV3	9,2 (6,5-13,0)	9,1 (7,5-10,9)	8,9 (8,7-9,1)	25	100	25	50	50	100	6 (4-7)	2 (1-3)	4 (1-9)

¹ Les intervalles de confiance à 95 % sont donnés entre parenthèses (the 95% confidence intervals are given in brackets)

MCD-P = dose minimale coagulante sur plasma humain (minimal coagulant dose on human plasma)

MCD-F = dose minimale coagulante sur fibrinogène bovin (minimal coagulant dose on bovine fibrinogen)

MDD = dose minimale défibrinogénante (minimal defibrinogenating dose)

entre autres, à partir de venin de *B. asper* ou de *B. moojeni*. Ces espèces ont de grandes similitudes avec *B. atrox*, puisqu'elles appartiennent toutes au même complexe zoologique (17; 35), ce qui pourrait traduire une proximité de composition de ces différents venins.

La neutralisation du venin de *L. muta* a été obtenue avec une efficacité significative seulement avec l'antivenin Exp-AV3. Ce dernier était le seul parmi ceux étudiés qui comportait ce venin dans sa préparation. Ce résultat pourrait paraître évident; toutefois, des études expérimentales récentes ont montré un pouvoir neutralisant similaire entre les antivenins polyvalents anti-*Bothrops* et les antivenins polyvalents anti-*Bothrops* et *Lachesis* (21), ce que nous n'avons pas observé dans notre étude. Les données cliniques et expérimentales suggèrent que le venin de *Lachesis* doit être inclus dans la préparation des antivenins employés pour traiter ses morsures (2, 7, 19, 2, 32, 3, 36), ce que nos résultats semblent confirmer, puisque nous avons observé la meilleure neutralisation de ce venin avec l'antivenin incluant dans sa préparation le venin de *Lachesis*. Il s'agit, à notre connaissance, de la première étude sur les activités biochimiques, toxiques et enzymatiques des venins des principaux serpents venimeux guyanais. Il était nécessaire de mener cette étude pour répondre aux recommandations de l'OMS (27) qui souligne, avec d'autres auteurs (10; 34), la variabilité spécifique et géographique des venins. Ainsi, les antivenins commerciaux étudiés dans cette étude sont utilisés généralement en Guyane pour traiter les envenimations (8). Toutefois, la capacité de neutralisation du venin des principaux serpents venimeux de la région n'est pas contrôlée en routine par les fabricants et la question de leur pertinence pour traiter les envenimations guyanaises est récurrente.

Conclusions

Les activités toxiques et enzymatiques des venins sont en général plus élevées chez les *Bothrops* que chez *L. muta*. Les premiers se révèlent ainsi plus fortement hémorragiques et nécrosants que ce dernier. La nécrose ne revêt, cependant, pas les mêmes manifestations cliniques chez les deux espèces de *Bothrops*.

Indépendamment des bons résultats observés avec les antivenins polyvalents anti-*Bothrops* hétérologues dans la neutralisation des venins de *Bothrops*, il a été clairement montré que leur activité paraspécifique n'est pas suffisante pour obtenir une neutralisation acceptable du venin de *L. muta* à l'égard des différentes activités étudiées. Bien que les antivenins disponibles puissent être utiles dans le traitement des accidents par

des espèces de *Bothrops* en Guyane, le traitement de *L. muta* impose l'emploi d'un antivenin incluant ce venin dans sa préparation.

Bien que les morsures de *Lachesis muta* soient relativement rares en Guyane (8, 9), il est recommandé d'utiliser systématiquement un sérum polyvalent comportant cette valence.

Références bibliographiques

1. ANONYME – *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. Editorial Tabacalera, México DF, México 7^e Ed, 2000.
2. BARD R, DE LIMA JRC, DE SILVA NETO RP, DE OLIVEIRA SG & DOS SANTOS MC – Ineficacia do antiveneno botrópico na neutralização da atividade coagulante do veneno de *Lachesis muta muta*. Relato de caso e comprovação experimental. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 1994, **36**, 77-81.
3. BJARNASSON JB & FOX JW – Hemorrhagic metalloproteinases from snakes venoms. *Pharmac Ther*, 1994, **62**, 325-372.
4. CAMPBELL JA & LAMAR W – *The venomous reptiles of Latin America*. NY University Press. Comstock, Ithaca, 1989.
5. CARDOSO JLC & FAN HW – Snakebites in South America. In: MEIR J & WHITE J (Eds), *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. Boca Raton, CRC Press, 1995, pp. 261-329.
6. CARICATI CP, GUIDOLIN R, YAMAGUSHI YK, MORAIS JF, DIAS DA SILVA W & HIGASHI HG – Esquema de hiperimunização mais conveniente a produção de plasma AV botrópico – crotálico. *Mem Inst Butantan Bol Biotecnol*, 1993, **4**, 9-12.
7. COLOMBINI M, FERNANDEZ I, CARDOSO DF & MOURA DA SILVA AM – *Lachesis muta muta* venom: immunological differences compared with *Bothrops atrox* venom and importance of specific antivenom therapy. *Toxicon*, 2001, **39**, 711-719.
8. CHIPPAX JP – Les envenimations ophidiennes en Guyane Française. *Méd Trop*, 2002, **62**, 177-184.
9. CHIPPAX JP, GALTIER J & LEFAIT JF – Épidémiologie des envenimations en Guyane française. *Bull Soc Pathol Exot*, 1984, **77**, 206 – 215.
10. CHIPPAX JP, WILLIAMS V & WHITE J – Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 1991, **29**, 1279-1303.
11. DE ROODT AR – *Estudio inmunobiológico del veneno de serpientes de importancia sanitaria de la Argentina*. PhD Thesis, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, 2002.
12. DE ROODT AR, DOLAB JA, FERNÁNDEZ T, SEGRE L & HAJOS SE – Cross reactivity and heterologous neutralization of crotaline antivenoms used in Argentina. *Toxicon*, 1998, **36**, 1025-1038.
13. DE ROODT AR, ESTEVEZ-RAMIREZ J, PANIAGUA-SOLÍS J, LITWIN S, CARBAJAL-SAUCEDO A et al. – Toxicity of venoms of snakes of medical importance in Mexico. *Gac Méd México*, 2005, **141**, 13-21.
14. DE ROODT AR, LITWIN S & VIDAL JC – Hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatin and

- lethality. *Toxicon*, 2003, **41**, 949-958.
15. DIAS DA SILVA W, GUIDOLIN R, RAW I, HIGASHI H G, CARICATTI CP et al. – Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. *Mem Inst Butantan*, 1989, **51**, 153-168.
 16. FERREIRA ML, MOURA DA SILVA AM, FRANCA FOS, CARDOSO JL & MOTA I – Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon*, 1992, **30**, 1063-1068.
 17. FURTADO MF, HOGE SA, PUERTO G., SALOMAO M., THEAKSTON RDG et al. – Systematics of the *Bothrops atrox* complex (reptilia, serpentes, Viperidae) in Brazil, a multivariate analysis. *Herpetologica*, 1996, **52**, 263-271.
 18. GUTIÉRREZ JM – Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev Biol Trop*, 2002, **50**, 377-394.
 19. JORGE MT, SANO-MARTINS IS, TOMY SC, CASTRO SC, FERRARI RA et al. – Snakebite by the bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: case report and review of the literature. *Toxicon*, 1997, **35**, 545-554.
 20. LAEMMLI UK – Cleavage of structural during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**, 680-685.
 21. LAING GD, THEAKSTON RDG, LEITE RP, DIAS DA SILVA W, WARRELL DA & BIASG – Comparison of the potency of three Brazilian *Bothrops* antivenoms using *in vivo* rodent and *in vitro* assays. *Toxicon*, 1992, **30**, 1219-1225.
 22. LAING GD, YALERQUE A, MARCELO A, RODRÍGUEZ E, WARRELL DA & THEAKSTON RDG – Preclinical testing of three south American antivenoms against the venoms of five medically-important Peruvian snake venoms. *Toxicon*, 2004, **44**, 103-106.
 23. MARKLAND FS Jr – Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, 1998, **36**, 1749-1800.
 24. MARKLAND, FS Jr & PERDON A – Comparison of two methods for proteolytic enzyme detection in snake venom. *Toxicon*, 1986, **24**, 385-393.
 25. MINISTERIO DE SAÚDE & FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*. Brasília, 1999.
 26. MINISTERIO DE SAÚDE – *Normas técnicas de fabricacao e controle de qualidade dos soros antifídicos, antitóxicos en antirrábico aprovada pela vigilancia sanitaria*. Secretaria de Vigilancia Sanitaria, Ministerio de Saúde, Brasília, 1996.
 27. OMS – *Caractérisation des venins et standardisation des sérums antivenimeux: progrès réalisés*. Publ. offset n°58, OMS, Genève, 1981.
 28. ROJAS G, JIMENEZ JM & GUTIÉRREZ JM – Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon*, 1994, **32**, 351-363.
 29. ROSENFELD G – Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In BÜCHERL W & BUCKLEY E (Eds), *Venomous Animals and their venoms*. Academic Press, New York, 1971, Vol II, pp. 345-384.
 30. RUSSELL FE, WALTER FG, BEY TA & FERNÁNDEZ MC – Snakes and snakebite in Central America. *Toxicon*, 1997, **35**, 1469-1522.
 31. SANCHEZ EF, FREITAS TB, FERREIRA-ALVES DL, VELARDE DT, DINIZ MR et al. – Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*, 1992, **30**, 95-103.
 32. SILVA HAAD J – Accidentes humanos por las serpientes de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*. *Mem Inst Butantan*, 1980/1981, **44/45**, 403-423.
 33. THEAKSTON RDG, LAING GD, FIELDING CM, LASCANO AF, TOUZET JM et al. – Treatment of snake bites by *Bothrops* species and *Lachesis muta* in Ecuador: laboratory screening of candidate antivenoms. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1995, **89**, 550-554.
 34. THEAKSTON RDG & REID HA – Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull Organ Mond Santé*, 1983, **61**, 949-956.
 35. WÜSTER W, SALOMÃO MG, THORPE RS, PUERTO G, FURTADO MFD et al. – Systematic of the *Bothrops atrox* complex: new insights from multivariate analysis and mitochondrial DNA sequence information. *Symp Zool Soc London*, 1997, **70**, 99-113.
 36. ZAVALETA MV, SALAS A, VILLEGAS V & CASTILLO YJ – *Farmacología de venenos y antivenenos de serpiente*. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Centro Nacional de Control de Calidad, Perú, 1998.