

Contribución à l'étude du venin de *Vipera Latastei* Bosca, 1878

J. DETRAIT*
G. NAULLEAU**
H. SAINT GIRONS***

La Vipère de Lataste est localisée à la partie occidentale de la région méditerranéenne. Il s'agit d'une espèce polytypique où l'on reconnaît actuellement trois sous-espèces (Saint-Girons, 1980). La forme nominale, *Vipera latastei latastei*, est largement répandue dans la Péninsule Ibérique, à l'exception de sa frange septentrionale (Duguy et al., 1979) et de son quart sud-occidental. *V. latastei gaditana*, sous-espèce voisine de la précédente, se rencontre dans le sud-ouest de la Péninsule Ibérique et en Afrique du Nord (Rif, Moyen-Atlas central et Tell algérien), tandis que *V. latastei monticola*, forme naine très différenciée, est localisée à quelques stations du Haut-Atlas marocain. Morphologiquement, *V. latastei* est à bien des égards intermédiaire entre *V. aspis* et *V. ammodytes*. Dans la Péninsule Ibérique, sa taille est analogue ou un peu supérieure à celle de *V. aspis*, mais sa tête, proportionnellement plus élargie à sa partie postérieure, contient des glandes venimeuses plus volumineuses.

Il n'existe que peu de données concernant le venin de la Vipère de Lataste. Schöttler (1938, 1942) et Salva Miquel (1946) ont étudié certaines de ses propriétés pharmacologiques. Zeller (1948) compare ses activités enzymatiques à celles d'autres Viperidae, tandis que Schwick et Dickgiesser (1963), ainsi que Saint Girons et Detrait (1978), traitent sommairement de ses communautés antigéniques avec les venins des Vipères d'Europe. Par ailleurs, Gonzalez (1981) fournit quelques renseignements sur les symptômes de l'envenimation et la morbidité humaine en Catalogne.

Dans ces conditions, il nous a semblé justifié de reprendre l'étude des activités de ce venin mal connu, de le comparer à celui d'autres Vipères d'Europe et de rechercher in vivo son éventuelle neutralisation par des immunosérums hétérologues.

MATERIEL ET TECHNIQUES

Les venins utilisés au cours de ce travail proviennent de 5 spécimens de *Vipera latastei gaditana* originaires du sud de l'Espagne: Benalmadena (Málaga) et Alcolea (Cordoue). Par ailleurs, à titre de comparaison, nous avons fait quelques essais succincts avec le venin de *V. la-*

* Institut Pasteur, Unité de Pharmacologie et de Toxicologie, 28 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

** C.N.R.S., Centre d'Etudes Biologiques des Animaux Sauvages, 79360 Villiers-en-Bois, France.

*** Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire d'Evolution des Etres Organisés, 105 boulevard Raspail, 75006 Paris, France.

tastei latastei, prélevé chez un individu originaire de Falcet (Tarragone).

La toxicité aiguë du venin de *V. l. gaditana*, exprimée en dose létale 50% (DL50), a été déterminée par administration par la voie intraveineuse à des groupes de 6 à 8 Souris mâles de souche SPF, pesant de 23 à 27 g, de doses croissantes de venin mis en solution dans du sérum physiologique. Le volume injecté par Souris était de 0,5 ml pour 20 g. de poids corporel et la vitesse d'inoculation de 10 secondes/0,5 ml. En ce qui concerne le venin de *V. l. latastei*, seule la dose létale 100% (DL100) a pu être établie, étant donnée la très faible quantité de produit dont nous disposions.

La détermination du pouvoir neutralisant in vivo de trois immunsérums monovalents non purifiés (sérum anti-venin de *V. berus berus* de Russie, sérum anti-venin de *V. aspis aspis* de France et sérum anti-venin de *V. ammodytes ammodytes* de Yougoslavie) a été réalisée en recherchant le volume de sérum nécessaire pour neutraliser un volume constant (0.1 ml) d'une solution plus ou moins concentrée de venin. Nous avons utilisé les niveaux de 3 DL 50 sur 6 Souris mâles pour chacune des 4 ou 5 doses de sérum étudiées et de 10 DL 50 sur des groupes de 4 Souris seulement en raison des faibles quantités de venin dont nous disposions. Les essais ont été réalisés par administration par la voie intraveineuse de 0,5 ml pour 20 g de Souris d'un mélange, préparé extemporanément, de venin et de sérum plus ou moins dilué. Les résultats sont exprimés en dose efficace à 50% (DE 50). c'est à dire en dose d'immunsérum pur qui assure la survie de 50% des Souris de 20 g ayant reçu 3 ou 10 DL 50 de venin.

A partir des données brutes, les DL 50 et DE 50, ainsi que leurs limites fiducielles respectives, ont été calculées par la méthode graphique de Lichtfield et Wilcoxon (1949).

Les communautés antigéniques ont été recherchées par analyse immunoélectrophorétique selon la technique de Jouannet (1968), légèrement modifiée (Saint Girons et Detrait, 1978).

RESULTATS ET DISCUSSION

Toxicité

La toxicité aiguë du venin de *V. latasteigaditana*, exprimée en DL 50/Souris de 20 g, est de 30,3 µg (soit 1,513 mg.Kg⁻¹), avec pour limites fiducielles 28,5 et 32,1 µg.

D'après les données représentées dans le tableau I, on constate que la toxicité de ce venin est globalement inférieure à celles que nous avons établies pour d'autres venins de Vipères européennes dans des conditions opératoires identiques. Par rapport aux venins de *V. seoanei* et de *V. aspis aspis* la différence est relativement faible, mais significative ($p < 0,05$); elle est très importante lorsque la comparaison porte sur les venins de *V. berus berus*, *V. aspis zinnikeri* et *V. ammodytes ammodytes*. Pour autant que l'on en puisse juger sur la DL 100, calculée sur un seul échantillon, le venin de *V. latastei latastei* aurait une toxicité légèrement supérieure à celui de *V. l. gaditana* et très proche de celui de *V. aspis aspis*. Par la voie sous-cutanée et sur des venins provenant probablement de *V. l. latastei*, Schöttler (1938, 1942) et Salva Miquel (1946) obtiennent respectivement des DL 100 de 120 et 50 µg pour la Souris de 20 g.

A côté de différences dues aux techniques expérimentales, il existe très probablement, comme nous avons pu le constater pour *V. aspis* (Saint Girons et al., 1982), d'importantes variations individuelles et régionales de la toxicité des venins. Mais, dans l'ensemble et comparé à ceux des autres Vipères européennes, le venin de *V. latastei* paraît faire partie du groupe des venins relativement peu toxiques.

Venins	DL 50 %	Limites fiducielles	DL 100 %
<i>V. latastei gaditana</i>	30,3	28,5 - 32,1	35,3
<i>V. latastei latastei</i> (Tarragone)			25,0
<i>V. seoanei</i> (Guipúzcoa)	23,1	21,0 - 25,4	30,5
<i>V. aspis aspis</i> (Vendée)	20,1	18,8 - 21,5	27,0
<i>V. aspis zinnikeri</i> (Burgete)	9,6	8,2 - 11,1	12,5
<i>V. berus berus</i> (Bretagne)	11,0	9,7 - 12,5	14,1
<i>V. berus berus</i> (Russie)	7,2	5,2 - 8,3	10,7
<i>V. ammodytes ammodytes</i> (Yougoslavie)	9,5	8,7 - 10,5	12,9

Tableau I.- Toxicité aiguë, par la voie intraveineuse chez la Souris, des venins de *Vipera latastei* et d'autres Vipères européennes (µg/Souris de 20 g.).

Quantité de venin disponible et morbidité humaine.

Il est toujours très difficile d'apprécier la quantité de venin dont dispose un Serpent donné, les résultats variant dans de fortes proportions selon l'espèce, la taille, l'individu, le mode de prélèvement et l'opérateur. D'après les dimensions des glandes venimeuses, les quelques données fournies par Schöttler (1938) et les résultats de nos propres prélèvements, on peut estimer que la quantité de venin disponible chez *V. latastei* dans la Péninsule Ibérique est intermédiaire entre celle dont disposent *V. aspis* et *V. ammodytes*, soit un poids sec de l'ordre de 20 mg pour 100 g de poids corporel, ce qui est d'ailleurs le poids moyen approximatif d'une Vipère de Lataste adulte dans cette région.

Sur 125 cas de morsures dues à *V. latastei* en Catalogne, Gonzalez (1981) enregistre, sur une période de 15 ans, un décès et un cas d'envenimation grave, chez des adultes. Ceci suggère que la gravité des envenimations dues à cette espèce est voisine de celle qui est due à *V. aspis*, ce qui peut effectivement correspondre à l'injection d'une dose plus élevée d'un venin moins toxique. Compte tenu de sa vaste répartition géographique, c'est *V. latastei* qui est, pour l'ensemble de l'Espagne, responsable de la majorité des cas d'envenimation.

Signes cliniques de l'envenimation expérimentale.

Chez la Souris éprouvée par la voie intraveineuse, les signes cliniques de l'envenimation ne se distinguent guère de ceux relevés pour *V. aspis aspis*. Toutefois, lors des premiers essais réalisés à une vitesse d'inoculation de l'ordre de 4 à 5 secondes/0,5 ml, nous avons observé à plusieurs reprises l'apparition 2 à 3 minutes après l'administration du venin d'un état de choc, suivi presque immédiatement de convulsions et de la mort, ceci se manifestant même avec des doses qui, lorsque les injections ont été par la suite effectuées en 10 secondes/0,5 ml, se révélaient non létales. Il va de soi que les DL 50 ont été calculées dans ces dernières conditions opératoires.

Schöttler (1938) a suggéré la présence d'une neurotoxine thermorésistante dans le venin

de *V. latastei*. Compte tenu de ce que l'on sait actuellement de la composition des venins des Vipères européennes, il est probable, comme l'ont montré Meldrun (1965) et Sket et al. (1973), que l'action neurotropicque résulte en réalité d'un effet indirect sur le système nerveux central, consécutif à une anoxie résultant de l'hypotension artérielle. Celle-ci a d'ailleurs été signalée par Salva Miquel (1946) lors de l'envenimation expérimentale chez le Chien par le venin de *V. latastei*.

Les symptômes observés chez l'Homme victime d'une morsure par *V. latastei* ne diffèrent apparemment pas de ceux qui résultent de l'envenimation par *V. aspis* (Gonzalez, 1981).

Venins	Niveaux de toxicité					
	3 DL 50			10 DL 50		
	Immunsérums anti-Vipera					
	berus	aspis	ammody.	berus	aspis	ammody.
<i>V. latastei gaditana</i>	56	57	62,5	400	400	400
	37-84	39-83	43-91			
<i>V. berus berus</i>	5,9			400		
	5,3-6,6			354-452		
<i>V. aspis aspis</i>		31			188	
		28-53			171-207	
<i>V. ammodytes ammodytes</i>			45			185
			44-47			176-195

Tableau II.- Séroprotection du venin de différentes Vipères européennes. Volume d'immunsérum (μ l) nécessaire pour assurer la survie de 50 % des Souris de 20 g. et limites fiduciales.

Séroprotection hétérologue

On constate, d'après les résultats rassemblés dans le tableau II, qu'au niveau de toxicité de 3 DL 50 la dose efficace nécessaire à la neutralisation du venin de *V. latastei gaditana* à 50% (DE 50) est sensiblement égale pour chacun des 3 immunsérums. Les venins de *V. aspis aspis* et de *V. ammodytes ammodytes* sont à peine mieux neutralisés par les immunsérums homologues que le venin de *V. latastei*, la différence n'étant pas significative, alors que pour le venin de *V. berus berus* la DE 50 est près de 10 fois plus faible en réaction homologue.

Au niveau de toxicité de 10 DL 50, aucune protection n'a été obtenue, du moins pour le volume de sérum limité à 400 μ l, inhérent à la technique utilisée, contrairement à ce qui est observé avec les venins des autres espèces en

réactions homologues. Toutefois, il convient de noter que, dans le cas du venin de *V. berus berus*, le pouvoir neutralisant de son propre immunosérum, particulièrement élevé à 3 DL 50, devient faible à 10 DL 50, la différence entre ces deux niveaux de toxicité étant bien moindre pour les venins de *V. aspis aspis* et de *V. ammodytes ammodytes*.

Ces résultats suggèrent que la constitution des fractions toxiques du venin de *V. latastei gaditana* diffère nettement de celle du venin de *V. berus berus* et ceci dès la dose de 3 DL 50. Par rapport aux venins de *V. aspis aspis* et de *V. ammodytes ammodytes*, la distinction est moindre et ne se manifeste guère à 3 DL 50. A la dose de 10 DL 50, en revanche, se révèle dans le venin de *V. latastei gaditana* la présence d'une ou plusieurs activités nocives, muettes à faible concentration, qui ne sont pas neutralisées par les sérums hétérologues et qui deviennent létales à dose élevée.

D'après Schöttler (1938), 10 ml de sérum polyvalent (soit *anti-V. berus-V. aspis*, soit *anti-V. berus-V. ammodytes*) neutralisent environ 20 mg de venin de *V. latastei* par la voie sous-cutanée chez la Souris de 20 g. Selon les résultats que nous avons obtenus au niveau de toxicité de 3 DL 50, la neutralisation à 100% de 90 µg de venin exige environ 100 µl de chacun des 3 immunosérums hétérologues. 10 ml de ces sérums monovalents neutraliseraient ainsi environ 9 mg. de venin par la voie intraveineuse chez la Souris de 20 g. Toutes ces données, calculées par extrapolation, n'ont guère de signification en valeur absolue, mais suggèrent néanmoins que le venin de *V. latastei*, 3 à 4 fois plus toxique par la voie intraveineuse, est en outre 2 fois moins bien neutralisé que par la voie sous-cutanée.

Venins	Immunosérums anti-Vipera		
	<i>berus</i>	<i>aspis</i>	<i>ammod.</i>
<i>V. latastei gaditana</i>	50,0 %	71,4 %	57,1 %
<i>V. latastei latastei</i>	52,9 %	70,6 %	61,1 %
<i>V. berus berus</i>	100,0 %	70,6 %	55,6 %
<i>V. aspis aspis</i>	64,7 %	100,0 %	55,6 %
<i>V. ammodytes ammodytes</i>	54,1 %	58,8 %	100,0 %

Tableau III.- Proportion des antigènes communs entre les venins de *Vipera latastei* et d'autres Vipères européennes, révélée par l'analyse immunoelectrophorétique.

Communautés antigéniques

La proportion des antigènes communs (calculée d'après le rapport entre le nombre de lignes de précipités obtenues en réactions homologues et hétérologues) entre les venins des différentes espèces de Vipères européennes est en moyenne de 58,2%, avec une déviation standard de $\pm 2,2$ (Saint Girons et Detrait, 1978). On constate (tableau III) que cette proportion globale se retrouve avec le venin de *V. latastei*: $X = 60,5 \pm 3,6\%$.

Par ailleurs, les résultats obtenus avec le venin de *V. latastei gaditana* et avec celui du spécimen de la forme nominale sont pratiquement identiques. Ces deux venins sont plus proches de celui de *V. aspis aspis* (71% d'antigènes communs), que de celui de *V. ammodytes ammodytes* (59%) et plus éloigné encore de celui de *V. berus berus* (51,5%). Il va de soi que le nombre de lignes de précipités discernables n'est qu'un critère, parmi d'autres; du degré des communautés antigéniques et que l'on pourrait également tenir compte de la densité et de la position des arcs de précipités.

CONCLUSIONS

Par sa toxicité et ses communautés antigéniques, le venin de *Vipera latastei* se révèle assez proche de celui de *V. aspis aspis*, alors que ses relations avec le venin de *V. ammodytes ammodytes* et surtout celui de *V. berus berus* sont plus éloignées. Les épreuves de séroprotection in vivo, au moyen d'immunosérums monovalents hétérologues, montrent que le pouvoir toxique de ce venin est bien neutralisé, du moins à faible concentration (3 DL 50). Cependant, il convient de souligner qu'à ce niveau de toxicité, le venin de *V. latastei gaditana* présente une parenté aussi étroite avec le venin de *V. aspis aspis* qu'avec celui de *V. ammodytes ammodytes*, tous ces venins étant neutralisés par des volumes de sérum du même ordre de grandeur. En revanche, la différence est très fortement marquée avec le venin de *V. berus berus*. A forte concentration (10 DL 50), le venin de *V. latastei gaditana* n'est neutralisé par aucun des sérums utilisés.

Il n'existe apparemment guère de Corrélations, chez les Vipères, entre la toxicité des ve-

nins, ou leur neutralisation croisée, et les rapports phylogénétiques, tels qu'ils peuvent être appréciés par les critères morphologiques et biogéographiques. Les communautés antigéniques globales, révélées par immunoelectrophorèse, constituent sans doute un critère plus intéressant, tout au moins lorsque la proportion des antigènes communs est élevée. Car de nombreux exemples montrent que la constitution chimique des venins de Serpents peut évoluer très rapidement dans des populations isolées. De ce fait, des recherches complémentaires sont nécessaires pour apprécier l'importance des variations locales et régionales de la toxicité du venin de *V. latastei* dans la Péninsule Ibérique et leurs éventuelles implications thérapeutiques.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier vivement notre Collègue A. Bea qui a bien voulu se charger de la traduction du résumé de cet article en langues espagnole et basque.

RÉSUMÉ

Par sa toxicité chez la Souris et par ses communautés antigéniques in vitro, le venin de *Vipera latastei* se montre assez proche de celui de *V. aspis aspis* et plus éloigné des venins de *V. ammodytes* et surtout de *V. berus*.

Les essais de séroprotection hétérologue montrent qu'à 3 DL 50 le venin de *V. latastei gadihana* est convenablement neutralisé par les sérums anti-venins de *V. berus*, *V. aspis* et *V. ammodytes*. A 10 DL 50, la technique utilisée n'a pas permis de préciser le niveau d'une éventuelle protection.

RESUMEN

El veneno de *Vipera latastei* se muestra próximo al de *V. aspis aspis* y alejado de los venenos de *V. ammodytes* y, sobre todo, de *V. berus*, según se desprende del estudio realizado sobre su toxicidad y por sus comunidades antigénicas in vitro.

Los ensayos de seroprotección heteróloga muestran que a 3 DL 50 el veneno de *V. latastei gadihana* se neutraliza convenientemente por los sueros antiveneno de *V. berus*, *V. aspis* y *V. ammodytes*. A 10 DL 50, la técnica utilizada no permite precisar el nivel de una protección eventual.

LABURPENA

Toxikotasunaren eta in vitro-ko antigeno multzoen ikerketak erakusten duenez *V. latasteiren* pozoina, *V. aspisenarengandik* hurbil aurkitzen da; ordea, *V. ammodytes* eta batez ere *V. berusen* pozoinengandik urrun.

Seroprotekzio heterologoko saioek honako hau erakusten dute: 3 DL 50-ean *V. latasteigaditanaren* pozoina *V. berus*, *V. aspis* eta *V. ammodytesen* pozoinkontrako gerli edo sueros egoki neutralizatzen da. 10 DL 50-ean erabilitako teknikak ez du biderik ematen inoizko babesaren maila finkatzeko.

BIBLIOGRAPHIE

- DUGUY, R.; MARTINEZ RICA, J.P. et SAINT GIRONS, H. (1979). La répartition des Vipères dans les Pyrénées et les régions voisines du nord de l'Espagne. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse*, 115, 359-377.
- GONZALEZ, D. (1981). Clinical aspects of bites by viper in Spain. *Toxicon*, 20, 349-353.
- JOUANNET, M. (1968). L'analyse immunoelectrophorétique appliquée aux venins de Serpents. *Toxicon*, 5, 191-199.
- LICHTFIELD, J.T. and WILCOXON, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. exp. Therap.*, 96, 99-113.
- MELDRUM, B.S. (1965). The action of snake venoms on nerve and muscle. The pharmacology of phospholipase A and of peptide toxins. *Pharmacol. Rev.*, 17, 393-446.
- SAINT GIRONS, H. (1980). Biogéographie et évolution des Vipères européennes. *C. R. Soc. Biogéogr.*, n.º 496, 146-172.
- SAINT GIRONS, H. et DETRAIT, J. (1978). Communautés antigéniques des venins et systématique des Vipères européennes. *Bull. Soc. zool Fr.*, 103, 155-166.
- SAINT GIRONS, H.; DUGUY, R. et DETRAIT, J. (1982). Les Vipères du sud du Massif Central: morphologie externe et venins. *Bull. Soc. Hist. nat. Toulouse*, 117 (sous press).

- SALVA MIQUEL, J.A. (1946). Estudio farmacológico del veneno de la «*Vipera latastei*» Bosca. Trab. Inst. Nac. Cienc. Med., 6, 397-409.
- SCHÖTTLER, W.H.A. (1938). Die Gifte von *Vipera latasti* und *Vipera lebetina*. Zeit. f. Hygiene, 120, 408-434.
- SCHÖTTLER, W.H.A. (1942). Untersuchungen über Toxikologie und Serologie der europäischen Ophiotoxine. Zeit. f. Hygiene, 124, 141-163.
- SKET, D.; GUBENSEK, F.; ADAMIC, S. and LEBEZ, D. (1973). Action of a partially purified basic protein fraction from *Vipera ammodytes* venom. *Toxicon*, 11, 47-53.
- SKET, D.; GUBENSEK, F.; PAVLIN, R. and LEBEZ, D. (1973). Oxygen consumption of rat brain homogenates after in vitro and in vivo addition of the basic protein from *Vipera ammodytes* venom. *Toxicon*, 11, 193-196.
- SCHWICK, G. und DICKGIESSER, F. (1963). Problem der Antigen- und Fermentanalyse im Zusammenhang mit der Herstellung polyvalenter Schlangengiften. In «Die Giftschlangen der Erde», Beringwerk-Mitteilungen, Marburg-Lahn, p. 35-66.
- ZELLER, E. (1948). Enzymes of snake venoms and their biological significance. *Adv. Enzymol.*, 8, 459-495.