

Recherches biochimiques et immunologiques sur le venin des serpents

par

P. BOQUET, J. DETRAIT et R. FARZANPAY

(avec la collaboration technique de A. M. RONSSERAY, S. CASSEAUT
et C. DUMAREY)

III. — Etude des analogues de l'antigène alpha du venin de *Naja Nigricollis* (*)

«Le sérum d'un lapin immunisé contre le venin de cobra ou de vipère agit indifféremment sur tous les venins que j'ai expérimentés.» A cette conclusion exprimée par A. Calmette [8], M. Arthus [2] oppose une autre opinion. Il écrit: «A part quelques rares exceptions, l'action des sérums antivenimeux est zoologiquement spécifique. Elle s'exerce uniquement sur les venins dont on a usé pour la préparation des chevaux fournisseurs du sérum.»

Il est aujourd'hui démontré que le sérum d'un animal immunisé par des injections répétées d'un venin de serpent neutralise spécifiquement ce venin et inhibe ou atténue les effets d'autres venins, mais il n'agit pas indifféremment sur tous ces poisons. Son action est sélective. Elle conduit à établir des relations immunologiques entre des serpents appartenant à des groupes voisins ou distants les uns des autres, tels que les définissent les classifications zoologiques [3 à 12]. Ces relations ont été mises en évidence par deux procédés. Le premier consiste à mesurer, *in vitro* et *in vivo*, sur des venins de serpents appartenant à des familles, à des genres et à des espèces différentes, l'action d'un immunosérum antivenimeux dont la spécificité est connue. Les venins neutralisés par cet immunosérum contiennent des antigènes de même nature. Le second est fondé sur les résultats de l'analyse immunochimique dans un milieu gélifié, en d'autres termes, sur une étude comparative de systèmes précipitants comportant un venin de serpent et l'immunosérum spécifique, d'une part. et d'autre part. des venins de natures différentes et le même immunosérum.

Quel que soit le procédé choisi, les antigènes des venins et les anticorps des immunosérums étudiés réagissent mutuellement suivant leurs affinités, d'où les difficultés rencontrées parfois lorsqu'on entreprend d'interpréter les résultats. C'est ainsi que l'atténuation des effets nocifs d'un venin sous l'influence d'un sérum antivenimeux peut être la conséquence de la neutralisation d'un ou de plusieurs facteurs accessoires, et non celle de l'inhibition progressive du facteur toxique principal. C'est ainsi, également, que les analogies établies entre certains venins par l'analyse immunochimique n'apportent

(*) Annales de l'Institut Pasteur. Tome 116. 1969. pp. 522 - 542.

aucun élément qui permette de définir avec certitude une relation entre les propriétés toxiques ou enzymatiques communes à ces venins et les antigènes dont la précipitation dans un gel autorise le dénombrement. Au contraire, l'emploi des protéines extraites à l'état pur du venin d'un serpent permet de définir, d'une manière précise, les propriétés biologiques de ces substances et d'identifier par l'analyse immunochimique les antigènes analogues des divers venins étudiés comparativement. Dans cet ordre de faits on a récemment constaté que la toxine α du venin de *Naja nigricollis* d'Ethiopie est précipitable, non seulement par l'immunsérum spécifique, mais encore par l'immunsérum anti-venin de *N. naja* d'Asie, ce qui autorise à penser que le venin de *N. naja* contient un antigène analogue à la toxine α [12, 4]. Cette toxine est une protéine basique du venin de *N. nigricollis* [5 à 7, 21]. Son poids moléculaire est voisin de 6 800; *in vivo*, elle se comporte comme un curare [43] (I).

Les expériences dont nous exposons les résultats ont pour but de mettre en évidence la présence de substance antigéniquement voisines de cette toxine dans divers venins d'Elapidae, de Viperidae et de Crotalidae. Ces expériences sont fondées sur le principe de la précipitation sélective des antigènes et des anticorps dans un gel [31, 33].

MATERIEL ET METHODES

I. — MATERIEL

1° Venins.

Les venins de serpents utilisés sont présentés dans le tableau I.

Tous ces venins desséchés sous vide, après avoir été recueillis, sont conservés à + 4° C dans des tubes ou des flacons scellés.

Avant chaque expérience, la quantité désirée de venin est pesée et dissoute dans de l'eau distillée à raison de 10 mg/ml.

2° Toxine α du venin de *N. nigricollis*.

La toxine α provient du venin de *N. nigricollis* d'Ethiopie. L'échantillon de venin choisi pour extraire cette toxine et l'échantillon employé dans nos précédentes expériences ont la même origine. Ils ont été broyés et conservés dans les mêmes conditions (2) [5, 6, 7].

(I) Lee et Chang ont récemment démontré qu'une fraction toxique isolée du venin de *N. naja atra* de Formose se comporte comme un curare. Cette fraction est vraisemblablement de même nature que la cobratoxine extraite du même venin par Yang (C. Y. Lee et C. C. Chang. Mode of action of purified toxins from Elapid venoms on neuromuscular transmission. *Mem. Inst. Butantan*, 1966, 33, 555-572; C. C. Yang. Crystallization and properties of cobratoxin from Formosan cobra venom. *J. biol. Chem.*, 1955, 240, 1016-1018).

(2) Deux échantillons de toxine α ont été préparés, l'un par Y. Izard, l'autre par M. Jouannet et C. Dumarey.

TABLEAU I.

FAMILLE	GENRE	ESPÈCE	ORIGINE
Elapidae ...	<i>Naja</i>	<i>nigricollis</i>	Afrique (Éthiopie)
Elapidae ...	<i>Naja</i>	<i>haje</i>	Afrique (origine indéterminée)
Elapidae ...	<i>Naja</i>	<i>melanoleuca</i>	Afrique (Guinée)
Elapidae ...	<i>Naja</i>	<i>nivea</i>	Afrique du Sud
Elapidae ...	<i>Haemachatus</i>	<i>hemachates</i>	Afrique du Sud
Elapidae ...	<i>Dendroaspis</i>	<i>viridis</i>	Afrique (Guinée)
Elapidae ...	<i>Naja</i>	<i>naja</i>	Asie (Cambodge)
Elapidae ...	<i>Naja</i>	<i>n. philippinensis</i>	Asie (Philippines) (*)
Elapidae ...	<i>Bungarus</i>	<i>coeruleus</i>	Asie (Cambodge)
Elapidae ...	<i>Pseudechis</i>	<i>australis</i>	Australie (**)
Elapidae ...	<i>Notechis</i>	<i>scutatus</i>	Australie (**)
Elapidae ...	<i>Oxyuranus</i>	<i>scutellatus</i>	Australie (**)
Viperidae ..	<i>Vipera</i>	<i>aspis</i>	Europe (régions comprises entre la Loire et le Jura)
Viperidae ..	<i>Vipera</i>	<i>ammodytes</i>	Yougoslavie
Viperidae ..	<i>Vipera</i>	<i>xanthina</i>	Israël
Viperidae ..	<i>Cerastes</i>	<i>cerastes</i>	Afrique (Tunisie région de Tozeur)
Viperidae ..	<i>Bitis</i>	<i>lachesis</i>	Afrique (Guinée)
Viperidae ..	<i>Bitis</i>	<i>gabonica</i>	Afrique (Guinée)
Viperidae ..	<i>Echis</i>	<i>carinatus</i>	a) Afrique (Éthiopie)
Viperidae ..	<i>Echis</i>	<i>carinatus</i>	b) Afrique origine indéterminée (***)
Viperidae ..	<i>Echis</i>	<i>carinatus</i>	c) Asie (Inde) (****)
Crotalidae ..	<i>Aghistrodon</i>	<i>rhodostoma</i>	Asie (Cambodge)

Plusieurs échantillons de venin ont été aimablement mis à notre disposition par le Dr. E. Salafranca de Manille (*), par M. St-Girons (**), par le Dr. P.A. Christensen de Johannesburg (***) et par le Dr. P.J. Deoras de Bombay (****).

La séparation de la toxine α est réalisée selon les deux procédés décrits par Karlsson, Eaker et Porath [21]. L'un de ces procédés consiste à filtrer le venin sur Sephadex G 75. La fraction contenant la toxine α est ensuite soumise à une chromatographie séparative sur une colonne d'Amberlite I. R. C. 50, l'éluant étant un tampon dont la concentration en phosphate varie de 0,06 M à 0,20 M. L'autre est fondé sur la séparation de la neurotoxine, polypeptide fortement basique, par une simple chromatographie du venin tel quel au moyen d'Amberlite (I. C. R. 50).

Desséchée à basse température aussitôt après sa préparation et conservée à + 4° dans des flacons hermétiquement clos, la toxine est dissoute immédiatement avant son emploi dans l'eau distillée à raison de 10 ml de solvant par mg de produit sec. Ses propriétés électriques et sa pureté sont contrôlées par des analyses immunoelectrophorétiques.

Déterminée dans des conditions définies dans notre précédent mémoire, la DL50 de toxine α injectée dans la veine caudale de la souris blanche de 20 g est de 1,6 μ g.

3° Immunsérums.

Nous utilisons comme antitoxine de référence le sérum d'un cheval hyperimmunisé pendant plusieurs mois par des injections sous-cutanées répétées de doses croissantes de venin de *N. nigricollis* d'Ethiopie. Recueilli stérilement, puis desséché à basse température pour en assurer la bonne conservation, ce sérum est conservé à + 4° C.

Avant chaque expérience, un certain poids du produit sec est pesé puis dissous dans un volume d'eau pure suffisant pour reconstituer le sérum tel qu'il était à l'origine. La solution filtrée sur des membranes «millipore» stérilisantes est additionnée de merthiolate (Merseptyl) dans la proportion de 1 p. 10 000 afin de prévenir les effets des contaminations accidentelles.

Accessoirement, d'autres immunsérums, préparés dans les mêmes conditions, ont été également employés: antivenins de *N. haje*, de *N. melanoleuca*, d'*Haemachatus hemachates*, d'*Echis carinatus* d'Afrique, de *N. naja* du Vietnam, et enfin de *N. naja philippinensis* (3).

II. - METHODES

1° Analyse immunochimique par diffusion des antigènes et des anticorps dans un gel, selon Ouchterlony [31, 32].

Le milieu dans lequel s'effectue la diffusion des réactifs est un gel d'agarose à 2 p. 100, déposé sur des plaques de verre, en une couche de 3 mm d'épaisseur. Des quantités variables d'antigènes sont versées sous le volume de μ l dans des puits de 2 mm de diamètre creusés dans le gel. Le sérum antivenimeux est réparti sous le même volume dans des puits de même dimension situés à 10 mm des précédents ou sous le volume de 0,2 ml dans des canaux de 2 mm de large tracés à 10 mm des sources d'antigènes.

Les précipités qui se forment sont colorés au moyen d'une solution de lissamine ou d'un mélange de rhodamine lissamine [20].

2° Epuisement des anticorps antitoxine α dans le sérum antivenin de *N. nigricollis*.

Dans la seconde série d'expériences nous avons recours à la technique dite d'épuisement des anticorps précipitants. Cette méthode consiste à ajouter, sous le volume de 0,1 ml, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500 et 1 000 μ g (4) des divers venins, dont nous disposons, à des échantillons de 1 ml de sérum antivenin de *N. nigricollis* afin d'en épuiser éventuellement les antitoxines α . Chaque mélange, après un séjour de deux heures à la température du laboratoire (18-20° C), est conservé quarante-huit heures à + 4° C puis centrifugé pendant quinze minutes pour en éliminer le précipité.

(3) Les sérums antivenins d'*Huemachatus hemachates* et de *Naja naja philippinensis* nous ont été aimablement adressés par le Dr P. A. Christensen et le Dr E. Salafranca à qui nous exprimons nos remerciements.

(4) Quelques venins dont celui de *Naja naja* ont été ajoutés aux doses de 1 100, 1 200, 1 300 μ g.

On étudie ensuite, suivant la technique de précipitation d'Ouchterlony [31], l'action de la toxine α sur le sérum ainsi traité. La dose de 1,25 μg . sous le volume de 10 μl représente la plus petite quantité de toxine α capable de s'unir, en proportions équivalentes, aux anticorps spécifiques de cet antigène et de donner naissance, dans les préparations prises pour témoins, à un précipité arciforme, dense et d'un dessin net. Quant aux échantillons de sérum traités par les divers venins ils sont déposés sous le volume de 10 μl dans des puits creusés à cet effet. Les déplacements, vers la source de sérum, du précipité correspondant à l'antigène α , son affaiblissement ou sa disparition permettent d'apprécier le degré d'appauvrissement de l'antitoxine de référence en anticorps capables de se combiner à la toxine α et de conclure à la présence, ou à l'absence, d'un antigène analogue dans le venin ajouté au sérum. D'autre part, on vérifie que la disparition des anticorps antitoxine α n'est pas la conséquence d'une action protéolytique des venins sur les globulines sériques. Dans les conditions qui viennent d'être définies, ce contrôle consiste à traiter un immunosérum antidiphthérique par des quantités croissantes de chacun des venins sélectionnés. Le pouvoir précipitant spécifique de l'immunosérum ainsi traité est égal à celui de l'immunosérum conservé tel quel.

3° Analyse par immuno-électrophorèse.

L'analyse par immuno-électrophorèse, selon Grabar et Williams [17], dont les modalités ont été définies dans un précédent mémoire, puis dans une revue générale [6, 20] comporte l'emploi d'Agarose à 2 p. 100 et d'un tampon constitué par une solution de véronal/HCl (0,025 M; pH 8,6). La préparation est soumise pendant deux heures à un courant de 1,5 V/cm.

a) Dans le dessein de préciser la position des arcs de précipité correspondant aux analogues de la toxine α , nous avons recours à un artifice inspiré du procédé décrit par Heremans [19]. On répartit des volumes égaux d'une solution de venin dans quatre puits de 2 mm de diamètre, creusés dans un gel d'agarose identique au gel employé pour l'analyse par immuno-électrophorèse. Ces puits sont disposés le long d'un axe parallèle au bord anodique de la préparation et à quelques centimètres de ce bord. On soumet cette préparation à l'électrophorèse dans les conditions usuelles et, lorsque l'épreuve est terminée, quatre nouveaux puits de 2 mm de diamètre sont creusés respectivement à 22 mm du premier puits, à 23 mm du second, à 24 mm du troisième et à 25 mm du quatrième, chaque groupe de deux puits étant situé sur un axe perpendiculaire au précédent. Dans chacun des réservoirs fraîchement creusés on verse 5 μl d'une solution contenant 2,5 μg de toxine α . On introduit enfin, sous le volume de 0,2 ml, dans le premier des deux canaux ouverts de part et d'autre de chaque préparation, le sérum spécifique antivenin de *N. nigricollis* et, dans le second, un sérum spécifique du venin soumis à l'électrophorèse lorsque nous disposons d'un tel sérum.

Une comparaison des quatre diagrammes obtenus après coloration permet de sélectionner l'image sur laquelle une coalescence des arcs de précipité de l'antigène α et d'une antigène basique du venin examiné conduit à établir une relation immunologique entre ces deux substances.

b) Les venins dont un antigène possède un caractère commun avec la toxine α étant dénombrés, la question se pose de savoir si ces mêmes venins contiennent d'autres antigènes présentant des analogies entre eux. Pour répondre à cette question nous

procédons à une dernière expérience. Des préparations contenant 25 et 50 μg de venin de *N. nigricollis* sous le volume de 5 μl sont soumises à l'électrophorèse dans des conditions qui viennent d'être définies. Lorsque l'électrophorèse est terminée, on verse dans deux canaux creusés parallèlement dans le gel selon la technique usuelle, 0,2 ml du sérum de référence antivenin de *N. nigricollis* épuisé suivant le procédé décrit dans un précédent paragraphe. Les diagrammes obtenus sont alors comparés au diagramme d'une préparation témoin de venin de *N. nigricollis* révélée par l'immunsérum spécifique tel quel. L'absence d'une ou de plusieurs lignes de précipité dans les préparations soumises à cette comparaison démontre qu'il existe une relation immunologique entre les antigènes du venin de *N. nigricollis* dont la précipitation est inhibée et un certain nombre d'antigènes répartis dans les venins responsables de cette inhibition.

RESULTATS

I. — Analyse immunochimique par précipitation mutuelle des antigènes et des anticorps dans un gel

A. — Sélection des venins contenant un analogue de la toxine α du venin de *N. nigricollis*.

Dans les conditions de cette expérience, 7 parmi les 21 venins examinés contiennent un antigène précipité par les anticorps spécifiques de la toxine α du venin de *N. nigricollis*.

Ces venins sont ceux de :

Elapidae :

<i>Naja haje</i>	Afrique
<i>Naja melanoleuca</i>	Afrique : Guinée
<i>Naja nivea</i>	Afrique du Sud
<i>Haemachatus hemachatus</i>	Afrique du Sud
<i>Naja naja philippinensis</i>	Asie : Philippines
<i>Naja naja</i>	Asie : Cambodge

Viperidae :

<i>Echis carinatus</i>	Afrique : Ethiopie (5)
------------------------------	------------------------

Six de ces venins proviennent d'Elapidae africains et asiatiques; le septième est celui d'un Viperidae d'Ethiopie: *Echis carinatus*.

Cependant, nous avons constaté que deux échantillons de venin d'*E. carinatus* recueillis, l'un aux Indes et l'autre en Afrique, mais dont l'origine exacte ne nous est

5) Alors qu'un échantillon de venin de *Cerastes cerastes* provenant de Tunisie est dépourvu d'antigène comparable à l'antigène α , il ressort, au contraire, de l'étude d'un autre échantillon de venin de *Cerastes cerastes* recueilli en Algérie, que ce poison contient un composant précipitable par les anticorps antitoxine α du sérum antivenin de *Naja nigricollis* (fig. 7 de la pl. II). Disposant d'une très faible quantité de ce venin de *Cerastes*, il ne nous a pas été possible de répéter les expériences. Nous croyons utile cependant de rapporter les résultats de cette épreuve en nous abstenant de tout commentaire.

pas connue, ne contiennent pas d'antigènes analogues à la toxine α du venin de *N. nigricollis*.

Sur des préparations où les 7 venins qui viennent d'être énumérés sont soumis à l'analyse immunologique selon Ouchterlony, on observe une coalescence des précipités produits par la toxine α , d'une part, et les antigènes analogues des venins éprouvés, d'autre part (fig. I à VIII des pl. I et II). Toutes les conditions de l'épreuve étant les mêmes, ces différents systèmes précipitent à des distances qui varient avec chaque source de venins.

Dans un autre ordre de faits, on constate que le dessin arciforme de certains de ces précipités ne présente ni la finesse ni la densité des images obtenues lorsque les systèmes précipitants sont constitués par un mélange, en proportions optimales, d'antigène α et d'anticorps spécifiques (*balanced reaction*, selon Ouchterlony [31]). Tel est le cas du venin de *N. naja*, par exemple. Lorsque la dose d'épreuve de ce venin est infé-

TABLEAU II. — Relations antigéniques entre la toxine α du venin de *Naja nigricollis* et les antigènes analogues à cette toxine (mises en évidence par la précipitation mutuelle des antigènes et des anticorps selon Ouchterlony).

CARACTÈRES DE L'ARC DE PRÉCIPITÉ CORRESPONDANT A L'ANTIGÈNE α	ORIGINE ET DOSE OPTIMALE DE VENIN	CARACTÈRES DE L'ARC DE PRÉCIPITÉ CORRESPONDANT AUX ANTIGÈNES ANALOGUES A L'ANTIGÈNE α
Arc fin, précipité dense	<i>Naja naja</i> 35 μ g	Arc épais, aux contours estompés; précipité peu dense; coalescence
Arc fin, précipité dense	<i>Naja nivea</i> 35 μ g	Arc fin, précipité dense; coalescence
Arc fin, précipité dense	<i>Naja haje</i> 25 μ g	Arc fin, précipité dense; coalescence
Arc fin, précipité dense	<i>Naja melanoleuca</i> 12,5-25 μ g	Arc fin, précipité dense; coalescence
Arc fin, précipité dense	<i>Naja naja philippinensis</i> 10 μ g	Arc aux contours peu précis, précipité peu dense; coalescence
Arc fin, précipité dense	<i>Haemachatus hemachatus</i> 12,5-25 μ g	Arc relativement mince, aux contours légèrement estompés, précipité peu dense; coalescence
Arc fin, précipité dense	<i>Echis carinatus</i> (Éthiopie) 60 μ g	Arc fin, précipité dense; coalescence
Arc fin, précipité dense	(témoin) <i>Naja nigricollis</i> 25 μ g	Arc fin, précipité dense; coalescence

rieure à 35 μg on remarque au point où les précipités entrent en coalescence une prolongation de l'arc correspondant à la toxine α , en d'autres termes un «éperon» selon la terminologie usuelle [30, 24]. En réalité ces images sont celles de faux éperons qui disparaissent lorsque la dose de venin d'épreuve atteint un optimum (Ouchterlony [30]; Korngold et Van Leeuwen [24]).

Nous groupons dans le tableau II les résultats de cette première série d'expériences.

B. — Inhibition du phénomène de la précipitation spécifique de la toxine α du venin de *N. nigricollis*.

Les résultats de cette seconde série d'expériences (planche IV) confirment ceux de la première. Ils permettent d'établir une classification fondée sur l'étude comparative des quantités minimales de chacun des venins sélectionnés dont l'addition à l'immunsérum de référence antivenin de *N. nigricollis* épuise les anticorps qui précipitent spécifiquement la toxine α (tableau III).

Dans les conditions de cette expérience les venins de *Dendroaspis*, de *Bungarus*, de *Pseudechis*, de *Notechis*, d'*Oxyuranus*, de *Vipera*, de *Cerastes* (6), de *Bitis* et d'*Agkistrodon*, selon toute apparence, sont sans effet.

Il apparaît que le venin de *N. naja philippinensis*, à dose égale, épuise trois fois plus d'anticorps antitoxine α dans un volume défini de sérum de référence que le venin de *N. nigricollis*.

Toutes les conditions d'expérience étant les mêmes, le venin de *N. naja* à forte dose (1 000 μg) ne fixe qu'une partie des anticorps antitoxine α . Il faut ajouter 1 200 μg de ce venin par ml du sérum de référence pour épuiser ces anticorps. Les venins de *N. haje* et de *N. melanoleuca* se comportent comme celui de *N. nigricollis*. Quant au venin d'*E. carinatus* d'Éthiopie, son pouvoir d'épuiser les anticorps antitoxine α est relativement faible.

II. — Analyse par immunoélectrophorèse

A. — Identification des antigènes analogues à la toxine α du venin de *N. nigricollis*.

Suivant la technique que nous avons décrite dans un précédent paragraphe, cette identification est fondée sur la coalescence totale ou partielle des précipités de toxine α et d'un antigène révélé par l'analyse immunoélectrophorétique des venins sélectionnés au cours de la première série d'expériences.

Réunis sur les planches III et III bis, les photographies des préparations soumises à cette épreuve démontrent que les antigènes homologues de la toxine α du venin de

(6) Parmi tous les venins que nous avons rassemblés, deux échantillons de venin de *Cerastes cerastes*, l'un provenant d'Algérie, l'autre de Tunisie ont été soumis à cette épreuve. L'échantillon provenant de Tunisie est sans effet; au contraire, l'échantillon provenant d'Algérie, mélangé au sérum antivenin de *N. nigricollis* à la dose de 4 mg/ml, semble diminuer la teneur en anticorps antitoxine α si on en juge par l'affaiblissement du précipité qu'il forme avec la toxine et par le déplacement de la ligne de précipité vers la source d'anticorps.

TABLEAU III. — Quantités minimales de venin nécessaire à l'épuisement des anticorps antitoxine α du sérum antivenin de *Naja nigricollis* (*)

ORIGINE DU VENIN (FAMILLE)	ESPÈCE	POIDS DE VENIN EN μg PAR ml DE SÉRUM	POIDS DE VENIN ÉTUDIÉ/POIDS DE VENIN DE <i>N. nigricollis</i> (PAR ml DE SÉRUM)
<i>Elapidae</i> d'Afrique	<i>Naja haje</i>	200	0,8
	<i>Naja nigricollis</i>	250	1
	<i>Naja melanoleuca</i>	250	1
	<i>Haemachatus hemachates</i>	400	1,6
	<i>Naja nivea</i>	500	2
<i>Elapidae</i> d'Asie	<i>Naja n. philippinensis</i>	80	0,32
	<i>Naja naja</i>	1 200	> 4
<i>Viperidae</i>	<i>Echis carinatus</i> (d'Éthiopie)	1 000	4

(*) Nous rappelons que la dose d'épreuve de toxine α est 1,25 μg et que l'immunsérum tel quel ou l'immunsérum épuisé est versé dans la cupule appropriée sous le volume de 10 μl .

N. nigricollis appartient au groupe des antigènes cathodiques des venins de *N. haje*, *Haemachatus hemachates*, *N. nivea*, *N. melanoleuca*, *N. naja*, *philippinensis* et *E. carinatus* d'Éthiopie.

Dans les conditions de l'épreuve, les vitesses respectives du déplacement de ces antigènes sont très voisines.

B. — Mise en évidence de divers antigènes analogues dans la série des venins sélectionnés.

L'analyse immunoélectrophorétique du venin de *N. nigricollis* définit un diagramme composé de trois groupes principaux d'antigènes que précipite sélectivement le sérum spécifique [4 à 6]. Le premier comporte une protéine sensiblement isoélectrique à pH 8,6: la phospholipase A dont le précipité arciforme est désigné par la lettre A. Le second, appelé groupe B, rassemble les antigènes qui se déplacent lentement vers la cathode et dont les charges électriques sont voisines: estérases, facteurs accélérateurs et inhibiteurs de la coagulation sanguine, hémolysine directe... Le troisième est constitué par les protéines cathodiques les plus rapides dont nous désignons les précipités respectivement par les symboles C, D₁, D₂ et D₃. Le précipité correspondant à D₃ étant la toxine α .

Lorsqu'on substitue au sérum de référence antivenin de *N. nigricollis* les échantillons du même sérum, dont les anticorps sont épuisés suivant le procédé que nous avons décrit, le diagramme des antigènes présente les modifications que voici: non seulement

TABLEAU IV. — Inhibition de la précipitation sérique spécifique des différents antigènes du venin de *N. nigricollis*.

ORIGINE DU VENIN INHIBITEUR		DOSES DES DIFFÉRENTS VENINS (*) CAPABLES D'ÉPUISER LES ANTICORPS SPÉCIFIQUES DES DIVERS ANTIGÈNES DU VENIN DE <i>N. nigricollis</i> (**)				
Famille	Espèce	A	B	C	(D ₁ +D ₂)	D ₃ (antigène α)
Elapidae d'Afrique	<i>N. nigricollis</i>	500	—	250	250	250
	<i>N. haje</i>	— (***)	—	250	500	250
	<i>N. melanoleuca</i>	—	—	—	750	250
	<i>N. nivea</i>	—	—	500	500	entre 250 et 500
	<i>H. hemachates</i>	—	—	750	1 000	500
Elapidae d'Asie	<i>N. naja philippinensis</i>	—	—	—	—	100
	<i>N. naja</i>	—	—	750	750	entre 750 et 1 000 (très net affaiblisse- ment du précipité obtenu avec l'antigène α)
Viperidae	<i>Echis carinatus</i>	—	—	—	—	1 000

(*) En µg/ml de sérum antivenin de *N. nigricollis*.
(**) La dose de venin de *N. nigricollis* soumise à l'analyse par immuno-électrophorèse est de 25 µg.
(***) Les traits indiquent que les venins ajoutés au sérum de référence dans la proportion de 1 000 µg/ml n'épuisent pas les anticorps capables de former avec les antigènes considérés des complexes insolubles.

sur toutes les préparations l'arc correspondant à l'antigène D₃, c'est-à-dire à la toxine α, n'apparaît pas mais encore d'autres arcs y font parfois défaut. Les résultats d'une de nos expériences sont rassemblés dans le tableau IV (planche III *ter*, figure a, b, c, d, e).

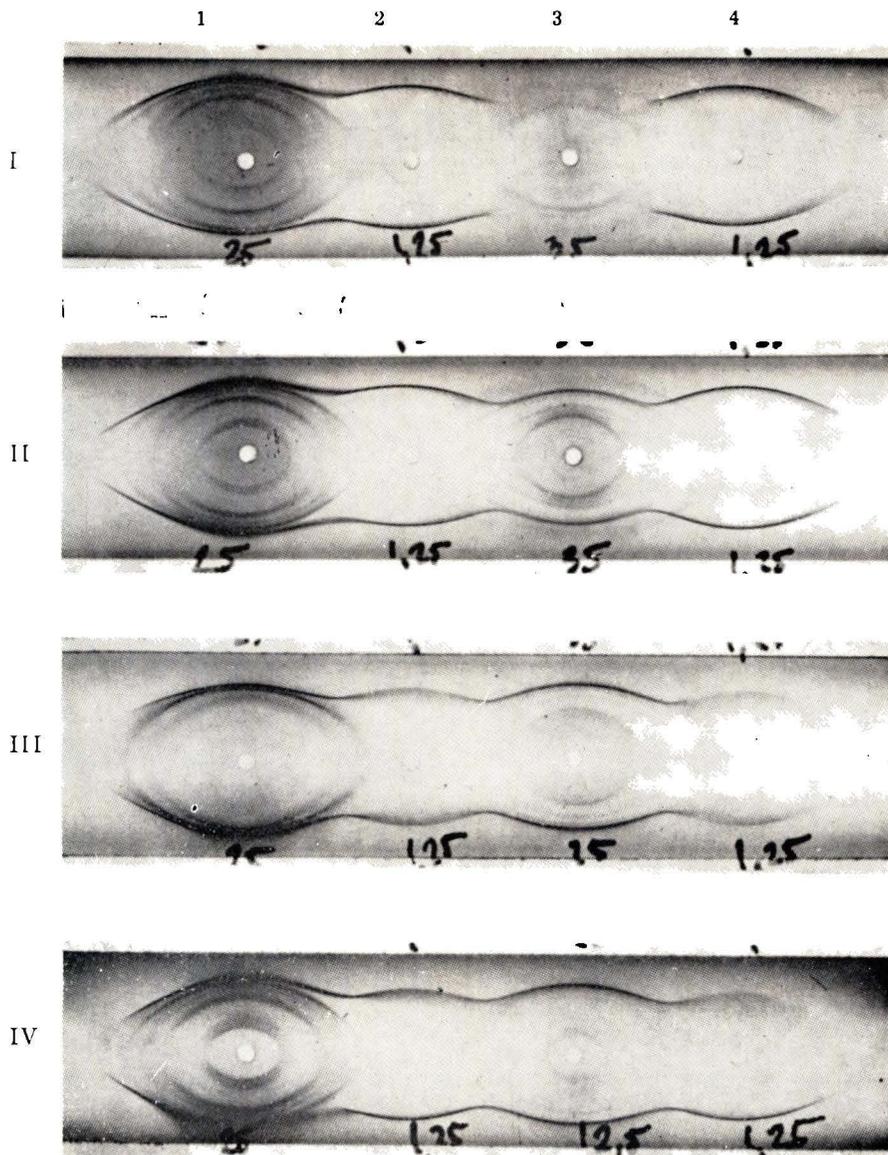


PLANCHE I

Dans toutes les préparations le sérum utilisé est le sérum de référence antivenin de *Naja nigricollis*. I: venin de *Naja nigricollis*. — 2 et 4: toxine α . — 3: venins dont l'origine est indiquée par les chiffres romains suivants: I: venin de *Naja naja*; II: venin de *Naja nivea*; III: venin de *Naja haje*; IV: venin de *Naja melanoleuca*; V: venin de *Naja naja philippinensis*; VI: venin d'*Haemachatus hemachates*; VII: venin d'*Echis carinatus carinatus* (Ethiopie); VIII: venin de *Cerastes cerastes* (Algérie).

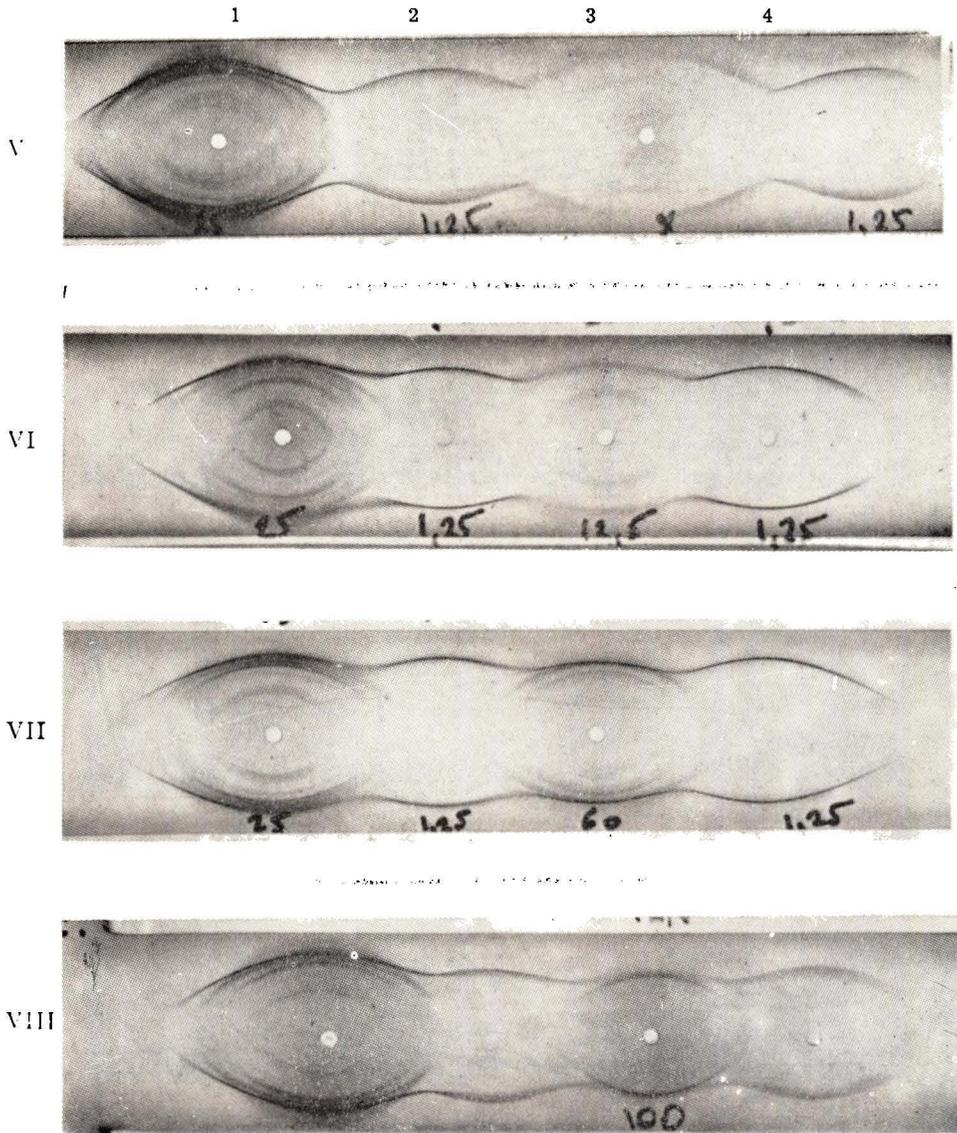


PLANCHE II.

Voir légende de la planche I.

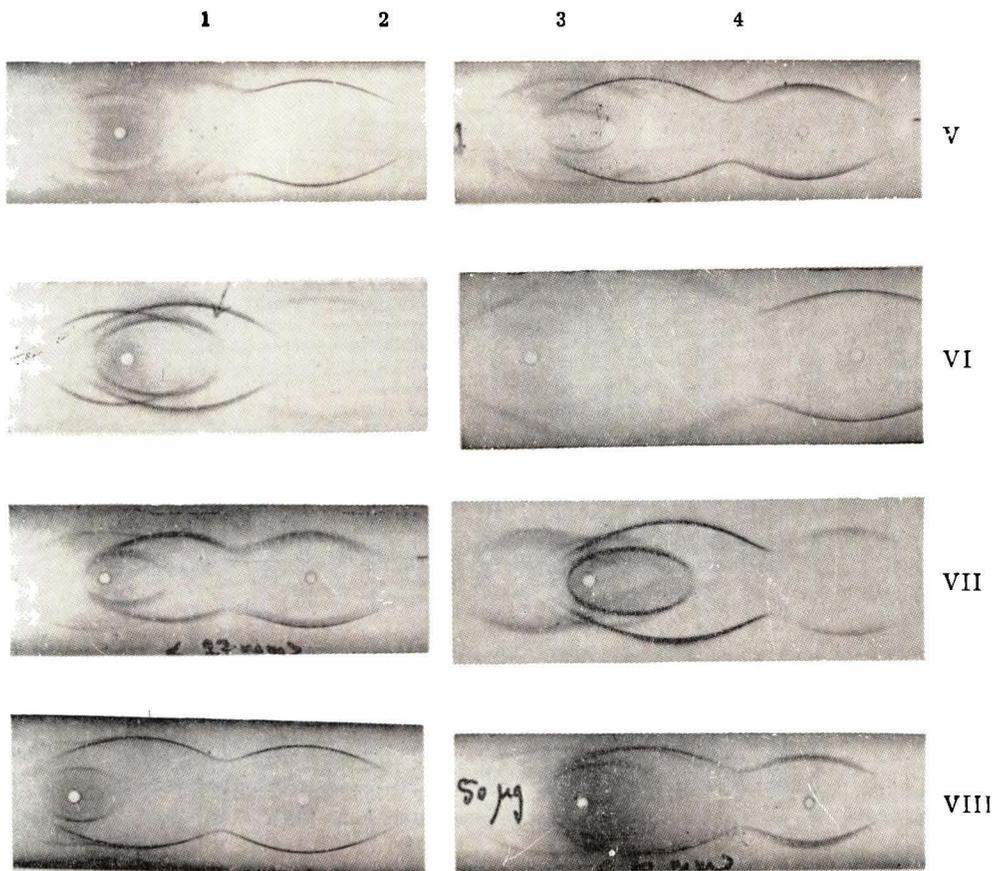


PLANCHE III

*Analyse immunoelectrophorétique des venins
selon la technique d'Heremans [19].*

I: venins de: I: *N. naja* (sérum antivenin de *N. nigricollis*); II: *N. naja* (sérum antivenin de *N. naja*); III: *N. nivea* (sérum antivenin de *N. nigricollis*); IV: *N. haje* (sérum antivenin de *N. nigricollis*); V: *N. melanoleuca* (sérum antivenin de *N. nigricollis*); VI: *N. naja philippinensis* (sérum antivenin de *N. nigricollis*); VII: *N. naja philippinensis* (sérum antivenin de *N. naja philippinensis*); VIII: *H. hemachates* (sérum antivenin de *N. nigricollis*). — 2: toxine α .

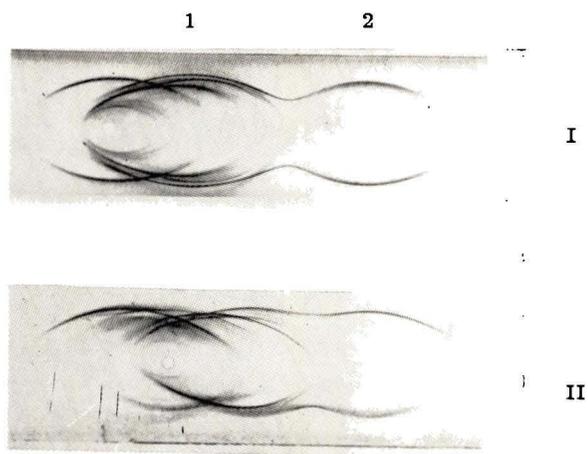


PLANCHE III bis

*Analyse immunoélectrophorétique des venins
selon la technique d'Heremans [19].*

I: venin de: I: *Naja nigricollis* (sérum antivenin de *Naja nigricollis*); II: *Echis carinatus a*] (sérum antivenin d'*Echis carinatus*); b] (sérum antivenin de *Naja nigricollis*). —
2: toxine α .

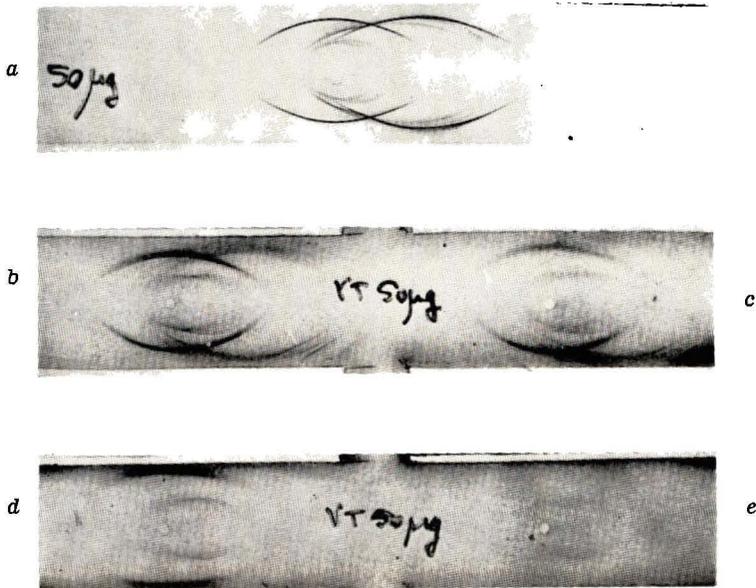


PLANCHE III *ter*

Analyse immunoelectrophoretique des venins: épuisement du sérum de référence anti-venin de N. nigricollis par le venin de N. nigricollis. (Dans tous les puits: 50 µg de venin de N. nigricollis.)

a) sérum tel quel; b) sérum traité par le venin de N. nigricollis à raison de 50 µg/ml; c) sérum traité par le venin de N. nigricollis à raison de 100 µg/ml; d) sérum traité par le venin de N. nigricollis à raison de 250 µg/ml; e) sérum traité par le venin de N. nigricollis à raison de 500 µg/ml.

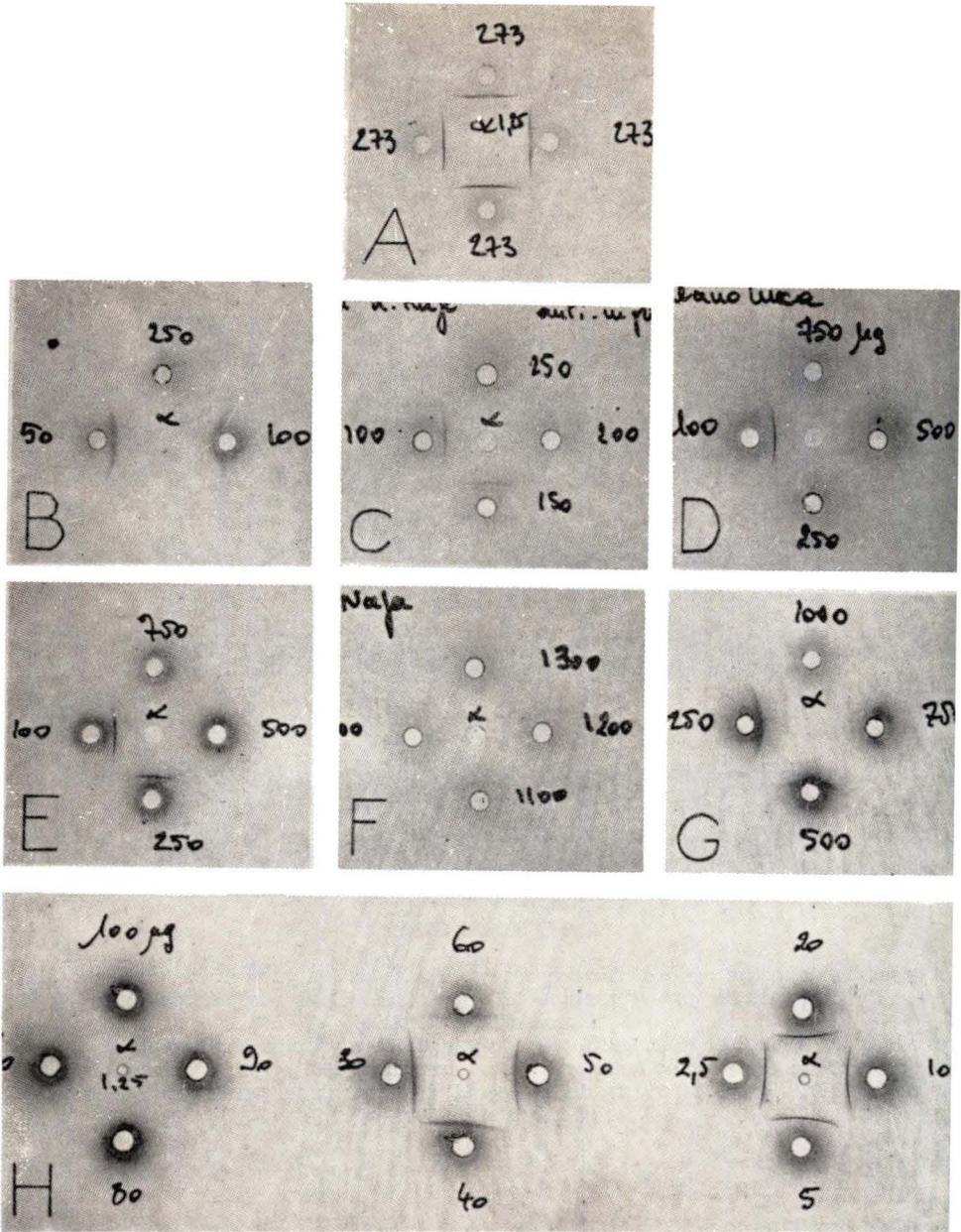


PLANCHE IV

Epuisement des anticorps spécifiques de la toxine α contenus dans le sérum de référence antivenin de *Naja nigricollis* par les venins de: B: *N. nigricollis*; C: *N. haje*; D: *N. melanoleuca*; E: *N. nivea*; F: *N. naja*; G: *Echis carinatus*; H: *N. naja philippinensis*; A: témoin: toxine α dans le puits central; sérum de référence antivenin de *Naja nigricollis* dans les puits périphériques.

DISCUSSION ET CONCLUSION

1° Vingt échantillons de venins de différentes espèces de serpents ont été examinés. Parmi ceux-ci, 7 contiennent des antigènes qui précipitent au contact des anticorps antitoxine α d'un sérum antivenin de *N. nigricollis* pris pour sérum de référence. Cette observation conduit à conclure que la constitution chimique de ces antigènes est voisine de celle de la toxine α récemment découverte dans le venin de *N. nigricollis* [4 à 7, 12, 21] et dont la constitution chimique a été définie par Karlsson, Eaker et Porath [21]. Quatre de ces venins proviennent d'Elapidae d'Afrique (*N. melanoleuca*, *N. nivea*, *Haemachatus hemachates*, *N. haje*), deux sont sécrétés par des Elapidae d'Asie (*N. naja* et *N. naja philippinensis*, et un par un Viperidae d'Afrique (*E. carinatus* d'Ethiopie).

Si la présence de protéines analogues dans les venins de serpents appartenant à une même famille est un phénomène banal, l'existence de protéines de constitution très voisine dans un venin de Viperidae, *E. carinatus* d'Ethiopie, et dans un venin d'Elapidae, *N. nigricollis*, surprend l'observateur. En effet, ni les venins de 5 autres Viperidae examinés, ni celui d'*A. rhodostoma*, le seul poison de Crotalidae dont nous disposons, ne contiennent un antigène immunologiquement comparable à la toxine α . Fait plus étonnant encore, deux échantillons de venins d'*E. carinatus* provenant l'un d'Afrique du Sud (7) et l'autre des Indes (8) semblent dépourvus d'un antigène de cette nature. L'observation que nous rapportons suggère trois hypothèses:

a) Le venin d'*E. carinatus* d'Ethiopie est un produit accidentellement mélangé au cours de la récolte à un venin d'Elapidae qui contient une protéine analogue à la toxine α .

b) Les sécrétions venimeuses de tous les *E. carinatus* contiennent un antigène analogue à la toxine α , mais cet antigène est présent en très faible quantité dans les venins des reptiles appartenant à certaines populations d'*Echis* et, de ce fait, n'est décelable dans les conditions de notre expérience que dans un échantillon de venin.

c) Seuls les serpents appartenant à quelques populations d'*E. carinatus* élaborent un antigène de composition comparable à la toxine α . La présence de cet antigène dans leur venin est un caractère héréditaire qui les apparente à certains Elapidae.

Jusqu'à plus ample informé, nous nous abstenons d'émettre une opinion définitive. Cependant, la présence constante, dans tous les échantillons de venins d'*E. carinatus* d'Ethiopie recueillis depuis 1960, d'une toxine dont l'action a toujours été neutralisée par l'immunsérum antivenin de *N. nigricollis*, plaide en faveur des deux dernières hypothèses. Dans le même ordre d'idées, les recherches de Moura Gonçalves ont démontré que le venin de *Crotalus terrificus terrificus* du Sud brésilien contient une protéine basique de faible poids moléculaire: la crotamine toxique pour le système nerveux des mammifères. Au contraire, le venin des mêmes crotales capturés au nord du Brésil ne contient pas de crotamine [28, 29]. Schenberg, d'autre part, a constaté que la composition antigénique du venin prélevé sur de nombreux *Bothrops neuwiedi* varie d'un reptile à un autre. Les variations sont telles, cependant, que les venins examinés peuvent être répartis dans cinq groupes immunologiques parfaitement distincts [37]. Confirmant des observations anciennes de Picado [36] et de Vellard [44] ces recherches démontrent

(7) Echantillon adressé par le Dr P. A. Christensen du *South African Institute for Medical Research* à Johannesburg.

(8) Echantillon adressé par le Dr P. J. Deoras de l'Institut Haffkine (Bombay).

que des serpents appartenant à la même espèce peuvent élaborer des venins dont la constitution diffère. La question se pose alors de savoir si les sécrétions venimeuses des *E. carinatus* possèdent des propriétés biochimiques distinctes suivant l'origine géographique des reptiles dont elles proviennent.

Si nous exceptons provisoirement la sécrétion venimeuse d'*E. carinatus*, nous constatons que les venins dont un antigène précipite en présence des anticorps spécifiques de la toxine α sont produits par des Elapidae dont les venins possèdent des propriétés paralysantes. Il convient, cependant, de remarquer que les résultats d'une sélection de cette nature dépendent de deux facteurs: la sensibilité de la méthode à laquelle on a recours et la qualité de l'immunsérum pris pour échantillon de référence. Nous entendons par «qualité», la richesse de l'immunsérum en anticorps spécifiques des différents déterminants antigéniques portés par la toxine α , les proportions respectives de ces anticorps et leur affinité pour les déterminants correspondants.

2° La réaction de précipitation dans un gel conduit à établir une relation d'analogie entre certains constituants des venins de serpents appartenant à des espèces diverses et la toxine α isolée du venin de *N. nigricollis*; mais elle démontre que plusieurs de ces antigènes possèdent une individualité immunochimique. En effet, dans les conditions expérimentales que nous avons exposées, la plupart des analogues de la toxine α et cette toxine donnent naissance à des précipités coalescents denses, dont les limites sont précises (se reporter aux figures II, III, IV, de la planche I correspondant aux diagrammes des venins de *N. nivea*, *N. haje* et de *N. melanoleuca*). Selon toutes probabilités la composition de ces antigènes et leur structure offrent de grandes ressemblances. Au contraire, la faible densité de certains précipités autorise à admettre que les anticorps spécifiques de la protéine α ne sont pas adaptés d'une manière rigoureuse aux déterminants antigéniques de tous les analogues de cette protéine (se reporter aux figures I et V des planches I et II correspondant aux diagrammes des venins de *N. naja* et de *N. naja philippinensis*).

Des faits du même ordre ont été rapportés par Moloney et Aprile [27] et par Berson et Yallow [3] au cours de leurs recherches comparatives sur l'antigénicité des insulines d'origines diverses.

L'apparition d'un «éperon» au-delà de la région où les précipités de toxine α et d'un antigène de même nature entrent en coalescence a été l'objet d'une discussion dans un précédent paragraphe. La disparition de ces éperons lorsque la dose de venin varie, confirme les faits décrits par Ouchterlony [30], par Korngold [23], puis par Korngold et Van Leeuwen [24].

3° Les résultats des expériences fondées sur la méthode générale d'épuisement des anticorps corroborent ceux des précédentes épreuves de précipitation. Sur la planche IV nous avons réuni les photographies des préparations les plus caractéristiques correspondant aux essais d'épuisement des anticorps antitoxine α contenus dans l'immunsérum de référence antivenin de *N. nigricollis*.

Si nous nous reportons au tableau III, nous constatons que des poids égaux ou voisins de venins de *N. nigricollis* et *N. melanoleuca* ont une action identique. A faible dose ces venins épuisent complètement les anticorps antitoxine α de l'immunsérum de référence. Pour obtenir le même effet, il faut employer une quantité plus grande de venins d'*H. hemachates*, de *N. nivea* et d'*E. carinatus*.

Quant aux deux venins de serpents d'Asie, ils possèdent des propriétés qui ont

attiré notre attention. A la dose de 1 000 $\mu\text{g/ml}$ de sérum de référence, quantité maximale de réactif habituellement utilisée dans ces essais d'épuisement, le venin de *N. naja* ne fixe qu'une partie des anticorps antitoxine α . Ce phénomène se traduit, sur les préparations de contrôle, par un déplacement du précipité correspondant à l'antigène α vers la source d'anticorps, et par une diminution de la densité de ce précipité. Cependant l'immunsérum de référence perd totalement la propriété qu'il possède de précipiter spécifiquement l'antigène α lorsqu'on le traite par une plus grande quantité de venin de *N. naja* (1 200 $\mu\text{g/ml}$). Quant au venin de *N. naja philippinensis*, il épuise, à très faible dose les anticorps antitoxine α du même immunsérum. Il faut, en effet, trois fois moins de venin de *N. naja philippinensis* que de venin de *N. nigricollis* pour obtenir ce résultat. Si on admet que la constitution de la toxine α et celle de l'antigène analogue contenu dans le venin de *N. naja philippinensis* sont voisines, on est autorisé à penser qu'un poids déterminé de ce venin contient trois fois plus d'antigène ou trois fois plus de déterminants antigéniques capables de réagir avec les anticorps précipitants, spécifiques de la toxine α , qu'un même poids de venin de *N. nigricollis*.

Une étude comparative de la toxine α et de son équivalent, actuellement en voie d'extraction du venin de *N. naja philippinensis*, apportera d'utiles informations dans cet ordre de faits.

Il nous paraît utile, à la fin de ce paragraphe, d'attirer l'attention sur l'aspect du précipité de toxine α et de son antitoxine. La concavité de l'arc dessiné par ce précipité est, en effet, orientée vers la source d'anticorps. Cette disposition est conforme à l'observation de Korngold et Van Leuwen [25] selon laquelle le précipité engendré dans un gel par un complexe d'antigène et d'anticorps, s'incurve vers la source d'anticorps lorsque le poids moléculaire de l'antigène est inférieur à celui de la globuline précipitante (planche IV, figures A à H).

4° L'analyse électrophorétique suivant Heremans [19] permet de définir, sur les diagrammes révélés par l'immunsérum de référence, la position des précipités correspondant aux antigènes immunologiquement comparables à la toxine α du venin de *N. nigricollis* [8]. Dans les conditions de notre expérience, ces antigènes émigrent à des vitesses voisines vers la cathode et se comportent tous, par conséquent, comme des protéines basiques [planches III et III bis (9)].

5° Le diagramme obtenu par l'analyse immunoélectrophorétique du venin de *N. nigricollis* présente d'importantes modifications lorsque le sérum de référence antivenin de *N. nigricollis* est privé de certains anticorps par la technique d'épuisement que nous avons décrite. Dans ces conditions, non seulement la protéine α ne précipite plus mais d'autres antigènes encore ne sont plus décelables. Il est ainsi démontré que les venins de

(9) Considérant l'interprétation des diagrammes définis par la méthode d'Heremans [19] plus aisée que celle des diagrammes obtenus par l'application de la technique de diffusion double, sur laquelle est fondée notre première expérience, nous avons tenté d'appliquer ce procédé à l'analyse quantitative de la toxine α dans l'échantillon de venin de *N. nigricollis* dont nous disposons.

En respectant les conditions définies au paragraphe 3 du chapitre consacré aux méthodes, cette analyse consiste à soumettre à l'électrophorèse une série de préparations contenant une dose constante de venin de *N. nigricollis*, à verser ensuite sur chaque préparation, dans des puits creusés à cet effet, des quantités croissantes de toxine α puis à introduire l'immunsérum de référence antivenin de *N. nigricollis* dans les canaux tracés selon la technique usuelle. Dans ces conditions la toxine α séparée des autres consti-

N. haje, de *N. nivea*, d'*H. hemachates*, de *N. melanoleuca*, de *N. naja* et de *N. nigricollis* contiennent, indépendamment d'un antigène qui précipite au contact des anticorps spécifiques de la toxine α , un certain nombre d'antigènes distincts qui réagissent avec les anticorps correspondants du sérum antivenin de *N. nigricollis*.

La méthode de filtration sur les Sephadex étant fondée sur l'exclusion des protéines suivant l'ordre décroissant de leur masse moléculaire, nous sommes conduits à admettre, en rapprochant ces résultats des informations rapportées dans un précédent mémoire [6], que les antigènes communs au venin de *N. nigricollis* et aux venins dont l'énumération précède, sont représentés, dans les conditions de notre expérience, par les protéines venimeuses dont la masse moléculaire est la plus faible. Cependant aucune conclusion ne peut être tirée du fait que le sérum antivenin de *N. nigricollis*, traité par des venins d'origines différentes, à la dose maximale de 1000 $\mu\text{g/ml}$, conserve un pouvoir précipitant à l'égard d'un certain nombre d'antigènes du venin de *N. nigricollis*.

En résumé, l'analyse immunochimique d'un certain nombre de venins de serpents a permis de déceler dans plusieurs de ces poisons caractérisés par leur action paralysante, des antigènes précipitables par les anticorps spécifiques de la toxine α extraite du venin de *N. nigricollis* [4, 5, 2]. Ces antigènes ont une propriété commune: lorsqu'on les soumet à l'action du courant électrique ils se comportent comme des substances basiques. Or les recherches développées par Tazieff-Depierre et Pierre [43] démontrent que la toxine α provoque des paralysies comparable à celles que produisent les curares vrais, substances caractérisées par la présence de radicaux basiques.

La question se pose de savoir s'il existe une relation entre les antigènes analogues à la toxine α et les propriétés paralysantes des venins qui les contiennent. Entreprises depuis peu, l'extraction de ces substances et l'étude du mécanisme de l'intoxication qu'elles provoquent apporteront une réponse.

Dans un autre ordre de faits, les ressemblances immunologiques qui viennent d'être établies autorisent à penser que les mêmes substances et la toxine α portent des déterminants antigéniques communs ou de structure voisine. Cependant, en raison de la faible masse moléculaire de la toxine α [21] on admettra que le nombre des sites antigéniques portés par chaque molécule de cette protéine est faible.

Une première série de recherches fondées sur les résultats d'une analyse quantitative par la précipitation spécifique, nous enseigne, en effet, que dans la zone réactionnelle dite d'équivalence, la toxine α et l'antitoxine précipitées sont entre elles dans le rapport moléculaire de 2 à 3, lorsque l'antitoxine est en léger excès (expériences inédites). Il apparaît ainsi, jusqu'à plus ample informé, que le nombre minimal des déterminants antigéniques portés par une molécule de toxine α peut être estimé à trois.

tuants du venin par le courant électrique précipite suivant un arc qui entre en coalescence avec le précipité de toxine pure introduite dans chaque préparation à titre d'élément de comparaison. Lorsque ces précipités denses et bien limités s'étendent tous deux à des distances égales de la source d'anticorps, nous concluons que les deux sources d'antigène diffusent les mêmes quantités de toxine α . Ce résultat est obtenu lorsqu'on compare, sur la même préparation, les précipités produits par 25 μg de venin de *N. nigricollis*, d'une part, et par 2 μg de toxine α , d'autre part. On en déduit que le venin contient 8 p. 100 de toxine. Ce procédé de mesure doit être considéré cependant comme très approximatif car la diffusion de la toxine au cours de l'électrophorèse et les variations d'épaisseur du gel sont de nature à influencer sur les résultats.

L'étude comparative des antigènes que nous désignerons désormais par l'expression: «antigènes du groupe α » nous incite à rappeler les importantes recherches menées parallèlement par Karlsson, Eaker et Porath [13, 21], d'une part, et par Tamiya, Arai et Sato [39 à 41], d'autre part, sur la constitution chimique de la toxine α et sur celle des érabutoxines A et B extraites par les expérimentateurs japonais du venin d'un Hydrophiidae: *Laticauda semifasciata*. Il ressort de ces recherches que les trois protéines étudiées ont une constitution chimique voisine. Composées d'une unique chaîne de 61 résidus d'acides aminés dont les replis sont maintenus par quatre ponts disulfures, riches en acides aminés basiques, contenant les uns et les autres un seul résidu tyrosyl, ces substances comportent un certain nombre de séquences semblables. Or, entre la toxine α et les érabutoxines, qui possèdent les mêmes propriétés paralysantes [40, 43], des réactions immunologiques croisées ont récemment été observées (expériences inédites faites en collaboration avec N. Tamiya).

Les analogies ainsi établies entre la toxine curarisante du venin de *N. nigricollis* et les érabutoxines du venin de *Laticauda semifasciata* suggèrent qu'une extension des recherches chimiques, immunologiques et pharmacologiques dont ces toxines font l'objet, aux antigènes du groupe α décrits dans ce mémoire, apportera un ensemble d'informations indispensables à l'étude des relations qui existent entre la composition, la structure, la toxicité et l'antigénicité de ces substances. Elle conduira, d'autre part, à établir entre serpents producteurs d'antigènes du groupe α des liens de parenté définis par l'analyse chimiques de ces antigènes. Elle permettra, enfin, de préciser dans quelle mesure ces liens de parenté correspondent à ceux que définissent les classifications usuelles fondées essentiellement sur des caractères morphologiques.

RESUME

Les propriétés antigéniques de la toxine α du venin de *N. nigricollis*, protéine basique de faible poids moléculaire, ont été l'objet des deux précédentes publications. Fondées sur les résultats de ces premières recherches, les expériences que nous rapportons dans ce mémoire comportent une analyse immuno-chimique de vingt échantillons de venin d'Elapidae, de Viperidae et de Crotalidae. Sept, parmi ces venins, contiennent des antigènes basiques qui précipitent au contact des anticorps antitoxine α . Ces sept venins sont ceux de: *N. haje*, *N. melanoleuca*, *N. nivea*, *N. naja*, *H. hemachates*, *N. naja philippinensis* et *E. carinatus* (échantillon provenant d'Ethiopie).

Si la méthode de précipitation dans un gel, l'immunoélectrophorèse et la technique d'épuisement des anticorps antitoxine α d'un immunosérum de référence conduisent à établir des relations immunologiques entre ces antigènes et la toxine α , elles démontrent dans certains cas, cependant, que les anticorps spécifiques de la toxine α ne sont pas adaptés d'une manière rigoureuse aux déterminants antigéniques des protéines dont nous avons entrepris l'étude.

SUMMARY

Immunological properties of α toxin, a basic low molecular weight protein from *N. nigricollis* venom, have been established in previous researches.

New series of experiments bring to the conclusion that 7 out of 20 samples of snake venoms from different origins (*N. haje*, *N. melanoleuca*, *N. nivea*, *H. hemachates*,

N. naja, *N. naja philippinensis* and *E. carinatus*) contain an « α -like» antigen.

According to results of various precipitation tests, it has been observed that specific anti α toxin antibodies are not always strictly adapted to the antigenic determinants of « α like» proteins.

ADDENDUM. — Des expériences entreprises depuis le mois d'octobre 1968 dans les mêmes conditions que celles dont nous exposons les résultats dans ce mémoire, nous permettent de conclure que le venin de *Naja naja oxiana* d'Iran contient un antigène basique analogue à la toxine α du venin de *Naja nigricollis*, ce qui porte à huit le nombre des venins de serpents dans lesquels nous avons mis en évidence, par les procédés d'analyse immuno-chimique, une substance comparable à cette toxine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AHUJA (M.L.). The specificity of antivenomous sera with special reference to sera prepared with venoms of Indian and South African snakes. *Ind. J. med. Res.*, 1935, **22**, 479-484.
- [2] ARTHUS (M.). De la spécificité des sérums antivenimeux. Sérum anticobraïque, antithropique et anticrotalique. Venins de *Lachesis lanceolatus*, de *Crotalus terrificus* et de *Crotalus adamanteus*. *C. R. Acad. Sci.*, 1911, **153**, 1504-1507.
- [3] BERSON (S. A.) and YALLOW (R. S.) Species-specificity of human antibeef, pork, insulin serum. *J. clin. Invest.*, 1959, **28**, 2017-2025.
- [4] BOQUET (P.), IZARD (Y.), JOUANNET (M.) and MEAUME (J.). First international symposium on animal toxins. Atlantic City, april 9-11, 1966. Edited in *Animal toxins*, Pergamon Press, N. Y., 1967, 293-298.
- [5] BOQUET (P.), IZARD (Y.), JOUANNET (M.) et MEAUME (J.). Etude de deux antigènes toxiques du venin de *Naja nigricollis*. *C. R. Acad. Sci.*, 1966, **262**, 1134-1137.
- [6] BOQUET (P.), IZARD (Y.), JOUANNET (M.) et MEAUME (J.). Recherches biochimiques et immunologiques sur le venin des serpents. — I. Essais de séparation des antigènes du venin de *N. nigricollis* par filtration sur Sephadex. *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, **111**, 719-732.
- [7] BOQUET (P.), IZARD (Y.), MEAUME (J.) et JOUANNET (M.). Recherches biochimiques et immunologiques sur le venin des serpents. — II. Etude des propriétés enzymatiques et toxiques des fractions obtenues par filtration du venin de *N. nigricollis* sur Sephadex. *Ann. Inst. Pasteur*, 1967, **112**, 213-235.
- [8] CALMETTE (A.). Contribution à l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'empoisonnement. *Ann. Inst. Pasteur*, 1894, **8**, 275-291.
- [9] CHRISTENSEN (P. A.) South african snake venoms and antivenoms. South african Institute for Medical research Edit., Johannesburg, S. A., 1955, 1-129.
- [10] CHRISTENSEN (P. A.) First international symposium on animal toxins. Atlantic City, april 9-11, 1966. Edited in *Animal toxins*, Pergamon Press, edit., N. Y., 1967, 223.
- [11] DETRAIT (J.). Thèse Doctorat en Pharmacie, 1962, 1-153.
- [12] DETRAIT (J.), IZARD (Y.) et BOQUET (P.). Séparation par électrophorèse des constituants toxiques des venins de *N. naja* et de *N. nigricollis*. *C. R. Soc. Biol.*, 1959, **153**, 1722-1724.
- [13] EAKER (D.) and PORATH (J.). The amino acid sequence of a neurotoxin from *Naja nigricollis*. *Japan J. Microbiol.*, 1957, **2**, 353-355.
- [14] GITHENS (T. S.). The polyvalency of crotalidic antivenoms. — IV. Antineurotic, anticoagulant and antiproteolytic actions. *J. Immunol.*, 1941, **42**, 149-159.
- [15] GITHENS (T. S.) and BUTZ (L. W.). Venoms of north american snakes and their relationship. *J. Immunol.*, 1929, **16**, 71-80.
- [16] GITHENS (T. S.) and O.C WOLFF (A.). The polyvalency of crotalidic antivenins. — II. Comparison of polyvalent crotalidic antivenom with monovalent *Crotalus D. durissus* antivenin. *J. Immunol.*, 1939, **37**, 41-45.
III. Mice as test animals for study of antivenins. *J. Immunol.*, 1939, **37**, 47-51.

- [17] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A.). Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **17**, 67-74.
- [18] GRASSET (E.) and ZOUTENDYK (A.). A comparative investigation into the antigenic properties of detoxicated Indian and African venoms and the cross action exerted by the respective antivenenes. *Trans. Roy. Soc. Med. Hyg.*, 1935, **28**, 391-398. The antigenic characteristics and relationship of heterologous antivenomous sera. *Trans. Roy. Soc. Med. Hyg.*, 1933, **30**, 347-354.
- [19] HEREMANS (J.). Les globulines sériques du système γ . Masson et Cie, édit., Paris, 1960.
- [20] JOUANNET (M.). L'analyse immunoélectrophorétique appliquée aux venins de serpents. *Toxicon*, 1938, **5**, 191-199.
- [21] KARLSSON (E.), EAKER (D. L.) and PORATH (J.). Purification of a neurotoxin from venom of *Naja nigricollis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, **127**, 505-520.
- [22] KELLAWAY (Ch.). Snake venoms. — I. Their constitution and therapeutic applications. *Bull. John's Hopk. Hosp.*, 1937, **60**, 1-17. II. — Their peripheral action. *Bull. John's Hopk. Hosp.*, 1937, **60**, 18-39. III. — Immunity. *Bull. John's Hopk. Hosp.*, 1939, **60**, 159-177.
- [23] KORNGOLD (L.). Immunological cross-reactions studied by the Ouchterlony gel diffusion technique. *J. Immunol.*, 1956, **77**, 119-122.
- [24] KORNGOLD (L.) and VAN LEEUWEN (G.). Immunological cross-reactions studied by the Ouchterlony gel diffusion technique. — II. The reactions of different antisera with one antigen. *Intern. Arch. Allergy. appl. Immunol.*, 1960, **17**, 352.
- [25] KORNGOLD (L.) and VAN LEEUWEN (G.). The effect of the antigen's molecular weight and the curvature of the precipitating line by the Ouchterlony technique. *J. Immunol.*, 1957, **78**, 172.
- [26] MINTON (S.). Paraspecific protection by elapid and sera snake antivenins. *Toxicon*, 1937, **5**, 47-55.
- [27] MOLONEY (P. J.) and APRILE (M. A.). On the antigenicity of insulin: Flocculation of insulin-anti-insulin. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1959, **37**, 793-800.
- [28] MOURA-GONCALVES (J.). Purification and properties of crotamine. In venoms. E. Buckley et N. Porges, édits., AAAS n° 44, Washington, 1956, 261-274.
- [29] MOURA GONCALVES (J.) y VIEIRA (L. G.) Estudos sobre venenos de serpentes Brasileiras. — I. Analise eletrophoretica. *An. Acad. Brazil. Cienc.*, 1954, **22**, 141.
- [30] OUCHTERLONY (O.). Antigen-antibody reactions in gels. — IV. Types of reactions in coordinated system of diffusion. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 1953, **32**, 231-240.
- [31] OUCHTERLONY (O.). *In vitro* method testing the toxin producing capacity of diptheria bacteria. *Acta. path. microbiol. Scand.*, 1948, **25**, 186-191.
- [32] OUCHTERLONY (O.). Gel-diffusion techniques. Colloquium der gesellschaft für physiologische chemie, april 1964, Mosbach/Baden. Spring Verlag, Berlin, 1965, 13-25.
- [33] OUDIN (J.). Méthode d'analyse immunochimique par précipitation spécifique en milieu gélinif. *C.é R. Acad. Sci.*, 1946, **222**, 115-116.
- [34] OUDIN (J.). L'analyse immunochimique qualitative, méthode par diffusion des antigènes au sein de l'immunsérum précipitant gélosé. *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **75**, 109-129.
- [35] OUDIN (J.). La diffusion en milieu gélinifié appliquée à l'analyse immunochimique. *Allergology*, 1962, 319-338.
- [36] PICADO (T. C.). Serpentes venenosas de Costa Rica. Sus venenos seroterapia anti-ofidica. San José, Costa Rica, 1931, 1-129.
- [37] SCHENBERG (S.). Immunological (Ouchterlony method) identification of intra subspecies qualitative differences in snake venom composition. *Toxicon*, 1963, **1**, 67-75.
- [38] SCHLOSSBERGER (H.). Die europaischen und mediterranen Ottern und ihre Gifte. Behringwerk mitteilungen, 1936, **7**, 1-362.
- [39] TAMIYA (N.) and ARAI (H.). Studies on sea-Snake venoms: Crystallization of erabutoxins "a and b" from *Laticauda semifasciata* venom. *Biochem. J.*, 1966, **99**, 624-630.

- [40] TAMIYA (N.), ARAI (H.) and SATO (S.). Studies on sea snake venoms: crystallization of erabutoxins "a" from *Laticauda semifasciata* venom and of laticotoxin "a" from *Laticauda Laticauda* venom. First Intern. Symp. in animal toxins. Atlantic City, 1966. Edité in *Animal toxins*, Pergamon Press, N. Y., 1967- 249-258.
- [41] TAMIYA (N.) and SATO (S.). Studies on sea snake venoms: Structure and function of crystalline toxins from sea snakes *Laticaudinae*. *Seventh. Intern. Congress. Biochem. Hakone symposium*, août 1967, Tokyo. abt., 497.
- [42] TAYLOR (J.) and MALLICK (S. M. K.). Observations on the neutralization of the "hemorrhagin" of certain viper venoms by antivenin. *Ind. J. med. Res.*, 1935, **23**, 121-130.
- [43] TAZIEFF-DEPIERRE et PIERRE (J.). Action curarisante de la toxine de *Naja nigricollis*. *C. R. Acad. Sci.*, 1933, **263**, 1785-1788.
- [44] VELLARD (J.). Variations géographiques du venin de *Bothrops atrox* L. *C. R. Acad. Sci.*, Paris. 1937, **204**, 1339.
Propriétés du venin des principales espèces de serpents du Vénézuéla. *Ann. Inst. Pasteur*, 1938, **60**, 511-548.
Variations géographiques du venin de *Crotalus terrificus*. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 463-464.