

LE CONTROLE DES VENINS DE SERPENTS

UTILISES EN HOMEOPATHIE

Chantal DAVID-ETEVE

Pharmacien, Expert-analyste, Directeur Contrôle Qualité

Laboratoires BOIRON, 20 rue de la Libération, 69110 Ste-Foy-Les-Lyon (FRANCE)

MOTS-CLES

Venins de serpents - contrôle - Bothrops lanceolatus - Cobra - Coluber aspis - Coluber berus - Coluber lanceolatus - Coluber russelli - Crotalus horridus - Crotalus mutus - Elaps corallinus - Lachesis muta - Micrurus corallinus - Naja naja - Naja nigricollis - Naja tripudians - Vipera berus - Vipera torva - Vipera aspis - Vipera daboia - Vipera redi - Vipera russelli - Electrophorèse - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS - Isoélectrofocalisation - Densitométrie.

RESUME

Le contrôle qualitatif des venins est nécessaire afin d'éviter toute erreur préjudiciable sur leur origine. C'est dans ce but que nous avons cherché à obtenir des profils électrophorétiques pouvant être utilisés comme témoins pour ces contrôles.

L'isoélectrofocalisation (IEF) ou l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS) se montrent bien adaptées à un contrôle de qualité de solutions protéiques complexes comme les venins. Elles allient les avantages de rapidité d'exécution, de simplicité de manipulation, de précision recherchée dans toutes techniques modernes. Elles sont résolutive et reproductible si les conditions opératoires sont respectées (température, temps de migration).

L'établissement d'un profil électrophorétique permet une identification sans équivoque puisque chaque espèce a un protéinogramme différent et la confrontation des résultats d'IEF ou de SDS avec la mention portée sur l'étiquette suffit, en général, pour que l'on soit assuré de la provenance du venin.

L'emploi d'un densitomètre permet une comparaison plus aisée des "électrophorégrammes" obtenus, notamment lorsqu'une superposition des tracés est possible.

Les procédés électrophorétiques couplés à la lecture densitométrique correspondent bien aux exigences d'un laboratoire de contrôle.

I. INTRODUCTION

Les venins occupent une place tout à fait spéciale parmi les médicaments homéopathiques tirés de substance d'origine animale.

Si *Lachesis muta* est considéré comme un polychreste puisqu'il est l'un des soixante principaux remèdes sur les 2500 matières premières utilisées en Homéopathie, les autres venins sont de prescriptions moins courantes et parfois même presque inexistantes. Cela s'explique par le fait que les prescriptions reposent sur des pathogénésies anciennes ou même seulement sur des cas d'envenimations.

II. LES ESPECES ETUDIÉES : LEUR CLASSIFICATION ET LEUR REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Il existe en Homéopathie une vingtaine d'espèces différentes. Dans cette étude, nous ne vous présenterons que les venins les plus couramment prescrits :

- Les serpents corail (sous famille des Elapinae)
 - Micrurus corallinus*
 - Elaps corallinus* Merem
 - Cobra corail (Amérique)

- Les cobras (sous famille des Elapinae)
 - Naja naja* ou *naja tripudians*
 - Naja naja* Linnaeus
 - Cobra commun ou serpent à lunette (Inde)

 - Naja nigricollis*
 - Naja nigricollis* Reinhardt
 - Cobra noir ou cobra cracheur (Afrique)

- Les vipères (sous famille des Viperinae)
 - Vipera berus* ou *vipera torva*
 - Coluber berus* Linnaeus
 - Vipère commune d'Europe ou Péliade (Europe)

 - Vipera aspis* ou *vipera redi*
 - Coluber aspis* Linnaeus
 - Vipère aspic (Europe)

 - Vipera russelli* ou *Vipera daboia*
 - Coluber russelli* Shaw
 - Vipère de Russel (Inde)

- Les crotales (sous famille des Crotalinae : Amérique du Nord, Amérique du Sud
Asie)

Crotalus horridus

Crotalus horridus Linnaeus

Serpent à sonnette ou Crotale des bois

Bothrops lanceolatus

Coluber lanceolatus Lacépède

Vipère jaune de la Martinique ou Vipère fer de lance

Lachesis muta

Crotalus mutus Linnaeus

Lachesis mutus ou Surucucu

III. PROBLEME DE DENOMINATIONS DE VENINS UTILISES EN HOMEOPATHIE

De nombreux problèmes entourent les serpents que ce soit au niveau de leur classification, de la composition chimique de leur venin, de leur dénomination et de leur contrôle.

III.1. Historique de la classification des venins

Les serpents appartiennent à l'embranchement des VERTEBRES et à la classe des REPTILES.

Au XIXème siècle des essais de classification des serpents ont été proposés :

1837 SCHLEGEL classe les serpents en deux catégories : les venimeux et les non venimeux.

1855 LACEPEDE développe l'histoire naturelle des serpents

1896 BOULENGER classe les serpents selon les relations anatomiques existants entre :

- . l'appareil venimeux
- . le type de dent ou crochet
- . les caractères craniens

Cette classification est aujourd'hui abandonnée car elle ne correspondait pas à des unités naturelles et a été la cause de nombreuses erreurs de systématique, notamment la confusion entre les genres *Lachesis* et *Bothrops* (ANTHONY - 1960).

Au cours des trente dernières années plusieurs classifications furent établies basées sur un ensemble de caractères morphologiques internes et externes tels que l'appareil dentaire, organes génitaux, organes sensoriels (l'oeil), appareil pulmonaire.

Selon HOGE et al. (1978, 1979) ces classifications sont incomplètes, faute d'examiner un nombre suffisant de représentants.

HOGE, directeur de l'Institut de Butantan, élève les serpents au rang d'ordre et le divise en 3 sous-ordres et propose une nouvelle classification.

III.2. Nomenclature des venins de serpents utilisés en Homéopathie

La Pharmacopée française ne cite aucun venin pour préparations homéopathiques.

La Pharmacopée homéopathique allemande cite *Lachesis mutus* et *Naja naja* ou *Naja tripudians* et préconise l'électrophorèse par isofocalisation avec indication de normes de contrôle.

La Pharmacopée homéopathique américaine donne la description, l'habitat et la technique de préparation des solutions mères de *Lachesis muta*, *Crotalus horridus*, *Naja tripudians* et *Elaps corallinus*. Elle se voit attribuer le synonyme de *Crotalus durissus* pour *Crotalus horridus* alors qu'il s'agit de deux espèces différentes.

La Pharmacopée indienne pour sa part donne la description, la distribution et la préparation de *Lachesis muta*, *Crotalus horridus*, *Naja tripudians* et *Vipera torva*. Les dénominations communes indiquées pour *Vipera torva* sont German viper et Russell's viper. *Vipera torva* n'est pas une dénomination officielle et pourrait

être synonyme de *Vipera berus* et *Vipera aspis* puisque ces espèces sont européennes et qu'on les trouve notamment en Allemagne. Russell's viper correspondrait à *Vipera russellii* ce qui paraît être confirmé par une partie de la distribution et la description. Il semble plus logique que la Pharmacopée homéopathique indienne traite d'une espèce asiatique mais l'on peut supposer également qu'il s'agit d'un mélange des trois espèces.

Ces problèmes de dénominations et synonymies se rencontrent également à travers de nombreux écrits scientifiques. Le terme de trigonocéphale désignait autrefois les serpents à tête triangulaire, c'est pourquoi *Lachesis muta* était appelé Trigonocéphale à losanges, ce qui pouvait entraîner des confusions avec *Trigonocephalus mutus* (PHYSALIX 1922), serpent totalement différent, de taille beaucoup plus modeste et originaire de Ceylan. De même, la vipère commune est très souvent rencontrée pour qualifier *Vipera aspis* alors que c'est le synonyme de *Vipera berus*.

Bothrops lanceolatus a eu de nombreux équivalents *Bothrops atrox*, *Bothrops jararaca* ou *Bothrops jararacussu*. Il n'a été individualisé des autres espèces brésiliennes qu'en 1928 par VEILLARD, ce qui a été confirmé par HOGE en 1952. Ceci explique pourquoi l'Institut de Butantan fournissait autrefois sous le nom de *Bothrops lanceolatus* une espèce brésilienne : *Bothrops atrox* (ANTHONY 1962).

Pour *Lachesis*, il a été reçu *Lachesis lanceolatus*, nom qui désignait autrefois *Bothrops lanceolatus*, il faut donc faire attention à la commande. Quand on demande *Lachesis muta*, il est important de préciser *Lachesis muta muta* et ne pas commander *Lachesis muta*, car il s'agit le plus souvent de plusieurs espèces de *Lachesis muta*. On ne doit pas non plus commander *Crotalus horridus durissus* puisqu'il s'agit de deux espèces différentes.

Il est donc très important de connaître l'origine géographique de la souche et c'est la première préoccupation de nos laboratoires. Nous avons choisi un fournisseur de venins non seulement pour la qualité de ses produits mais aussi parce qu'il est capable de nous fournir pour chaque venin, une fiche signalétique complète où figure l'origine de l'animal et les renseignements concernant l'espèce commandée, le mode de prélèvement du venin et son traitement.

IV. CONTROLE ANALYTIQUE DES VENINS DE SERPENTS UTILISES EN HOMEOPATHIE

Autrefois nos laboratoires d'analyse effectuaient un certain nombre d'essais généraux inspirés des travaux de SCHINDLER (1967) (NETIEN et al. 1980).

IV.1. Test de ralentissement de coagulation du jaune d'oeuf

Il devait y avoir coagulation à 90° d'une émulsion de 10 ml de jaune d'oeuf en moins de 10 min :

- essai positif d'inhibition de coagulation pour Lachesis mutus 4CH
- essai positif pour naja jusqu'à la 3e et 4e centésimale
- essai négatif pour Crotalus horridus même au delà de 30 min

IV.2. Test d'hémolyse

On utilise une solution de globules rouges de boeuf, lavés au chlorure de sodium et, après centrifugation, on fait une solution à 1 %.

- Hémolyse totale en 10 min pour Vipera berus jusqu'en 4CH
- Hémolyse totale en 30 min pour Naja tripudians 3DH et 4DH
- Hémolyse totale en 20 h pour Lachesis muta 6DH

Ces tests permettaient d'identifier les venins d'une manière générale mais ne permettaient pas de les différencier et c'est pour cette raison que nous avons été amené à effectuer des analyses biochimiques des venins.

IV.3. Analyses biochimiques des venins de serpents

Les venins sont constitués de protéines souvent à haut poids moléculaire et sont très riches en enzymes. La comparaison par analyses biochimiques des venins de serpents d'une même famille ou de deux familles différentes a pu être faite grâce aux travaux effectués dès 1983 et 1984 par les Professeurs Louis DEBOURCIEU et Jean RAYNAUD (Faculté de Pharmacie de Lyon) et à travers les thèses de leurs étudiants en fin d'études pharmaceutiques Noëlle MONIN-VEYRET (1985), Odile ROLLAND (1989), Frédéric DORANDEU (1990).

Ces travaux portent non plus sur l'analyse d'un des constituants comme la plupart des travaux antérieurs mais sur l'ensemble des constituants protéiques des venins et principalement sur les venins utilisés en Homéopathie.

Nos laboratoires ont adoptés les techniques électrophorétiques, techniques simples de contrôle qualité et qui permet une vérification de l'identité des souches reçue et de leur qualité.

IV.3.1. Électrophorèse par focalisation isoélectrique

Le principe général de l'électrofocalisation a été établi par SVENSSON en 1962 et précisé par VESTERBERG de 1966 à 1973 (MONIN-VEYRET, 1985). La charge nette d'une molécule ampholyte, protéine par exemple, dépend du pH du tampon de dissolution. Il existe une valeur de pH pour laquelle la charge nette de la molécule sera nulle, ce pH définit alors le pHi au point isoélectrique de la molécule. Il est possible de réaliser un gradient de pH stable et linéaire grâce à des mélanges complexes d'ampholines par exemple.

Sous l'action d'un champ électrique, des migrations se produisent en direction des électrodes, le gradient de pH se constitue et chaque type moléculaire se focalise à son pHi, les plus faibles valeurs sont anodiques, les plus élevées sont cathodiques.

L'électrofocalisation est donc une électrophorèse dans un gradient de pH qui permet la migration séparative des molécules chargées, ainsi que la concentration de chaque espèce lors de son immobilisation au pHi.

Une fixation à l'acide sulfosalicylique et trichloracétique permet la précipitation des protéines et l'élimination des ampholytes porteurs.

La coloration se fait au bleu de Coomassie. La décoloration des plaques dans le mélange solvant Méthanol - acide acétique ou éthanol - acide acétique.

* Méthodologie

Nous avons utilisé des plaques LKB prêtes à l'emploi constituées d'une couche mince de gel de polyacrylamide imprégné d'ampholines, permettant la réalisation d'un gradient pH compris entre 3,5 et 9,5. La cuve est thermostatée à + 4°C. Les électrodes de platine de part et d'autre de la plaque de gel sont en contact avec des baguettes de feutre imprégnées d'une solution d'acide phosphorique 1M pour l'anode et de soude 1M pour la cathode.

Les venins sont reconstitués à la concentration de 4 mg/ml en tampon tris-(hydroxyméthyl)aminométhanol 0,05M ajusté à pH 6,8 avec une solution d'acide chlorhydrique 1N et déposés sur la plaque au début de l'expérimentation.

Les dépôts de 15 µl sont appliqués à l'aide de rectangles de papier filtre à 1 cm de la cathode sur une ligne perpendiculaire à l'axe de migration.

La migration dure environ 1h sous un voltage de 1400 volts. Une microélectrode est déplacée de l'anode à la cathode et mise en contact avec la plaque tous les 5 mm. Elle permet de mesurer les points isoélectriques avant de faire la fixation de la plaque. Après cette mesure, il est nécessaire de faire migrer à nouveau pendant une dizaine de minutes. Cette solution précipite les protéines et permet aux ampholines de diffuser hors du gel.

Après rinçage, les plaques sont colorées au Bleu de Coomassie puis décolorées. Elles sont ensuite passées dans une solution de conservation et peuvent ainsi être photographiées et conservées.

Il est important de respecter la durée de migration et les temps de coloration et de décoloration des plaques.

* Résultats (IEF)

Les protéinogrammes retenus sont ceux où le plus grand nombre de bandes a été dénombré à la suite d'une meilleure coloration des protéines ou de coloration de fond. Chaque fois un échantillon appelé témoin a été déposé. Ce témoin est un venin de référence tel *Lachesis muta*, toujours le même, au cours de l'expérimentation et permet de contrôler la reproductibilité de la manipulation : contrôle d'une bonne migration par la persistance des bandes d'une plaque à l'autre, comparaison de coloration par rapport aux autres plaques et repérage de la position de l'anode et de la cathode en cas de doute lorsque l'on a retiré les plaques de l'appareil.

Les bandes sont classées de 1 à 7 par ordre d'intensité croissante (figure 1), les bandes diffuses même larges ne sont pas retenues car elles ne ressortent pas suffisamment par rapport au fond.

Une lecture densitométrique complète la lecture visuelle (figure 2), ce qui permet la superposition de différents lots et d'effectuer les études de stabilité des venins d'une année à l'autre (figure 3).

On peut généralement dénombrer de 10 à 30 bandes d'intensité dont certaines très fines mais d'intensité maximale. Ce nombre et leur répartition de l'anode à la cathode varie en fonction de la famille de l'espèce et même de la sous-espèce. De façon schématique on peut dire que le nombre va de :

- 0 à 10 chez les Elapidae
- 10 à 20 chez les Viperinae
- 20 à 30 chez les Crotalinae

On constate donc une augmentation du nombre de bandes, donc du nombre de constituants protéiques en accord avec l'évolution de la famille, la sous-famille des crotalinae étant la plus évoluée.

L'absence totale de bandes s'explique par une mauvaise conservation.

IV.3.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (Laurylsulfate de sodium)

Cette technique est basée sur la détermination de la masse molaire d'une protéine.

Les protéines sont séparées d'après leur comportement dans un milieu réticulé ou poreux donc en fonction de leur volume spatial. Cette masse molaire ne peut être déterminée qu'en ayant recours à un système étalon contenant des protéines de masse molaire connue.

Le gel de polyacrylamide est le résultat de la polymérisation de monomères d'acrylamide en longues chaînes, qui sont ensuite réunies pour former une structure réticulée. Un gel de polyacrylamide est caractérisé par sa concentration en monomères (T % m/V, en général g/100 ml) et son pourcentage d'agent de réticulation (C % m/m parfois exprimé en % C bis). Plus la concentration en polyacrylamide est forte (T), plus les mailles du tamis sont fines.

Nous avons utilisé un gel de séparation présentant une porosité uniforme c'est-à-dire sans gradient de concentration de polyacrylamide, bien que l'usage de gels en gradient de concentration se soit répandu tant dans le domaine de la simple séparation analytique que dans la détermination de la masse molaire de protéines dénaturées ou non.

* Méthodologie

Nous avons utilisé l'appareil NOVEX - Model 3540 et une cuve X cell de même marque dans laquelle nous plaçons des plaques de gel de tris-glycérine à 14 % ou 16 %, c'est-à-dire pouvant permettre la séparation de protéines de poids molaires de 200 k Daltons à 2,5 k Da. L'électrolyte utilisé dans les chambres anodique et cathodique est le solvant tris-glycine SDS dilué au 1/10.

Les dépôts sont de 10 à 20 μ l à l'intérieur des puits du gel. Les échantillons de venins sont mis en solution dans le tampon tris-chlorhydrique à pH 6,8 et dilués au demi avec le tampon tris-glycine SDS. Certains ont été réduits au mercapto-méthanol, d'autres non. La réduction favorise une meilleure résolution analytique dans la plupart des cas.

La migration s'effectue (de la cathode vers l'anode) en appliquant une tension de 175 volts pendant environ 1 h 30.

Les tracés des densitogrammes ont été réalisés grâce aux densitomètres Schimadzu CS-9000 avec une lecture à 600 nm.

* Résultats

Le témoin est un témoin de protéine de poids molaire, de 200 k Daltons à 2,5 k Da.

Une lecture densitométrique à 600 nm complète la lecture visuelle (figure 4).

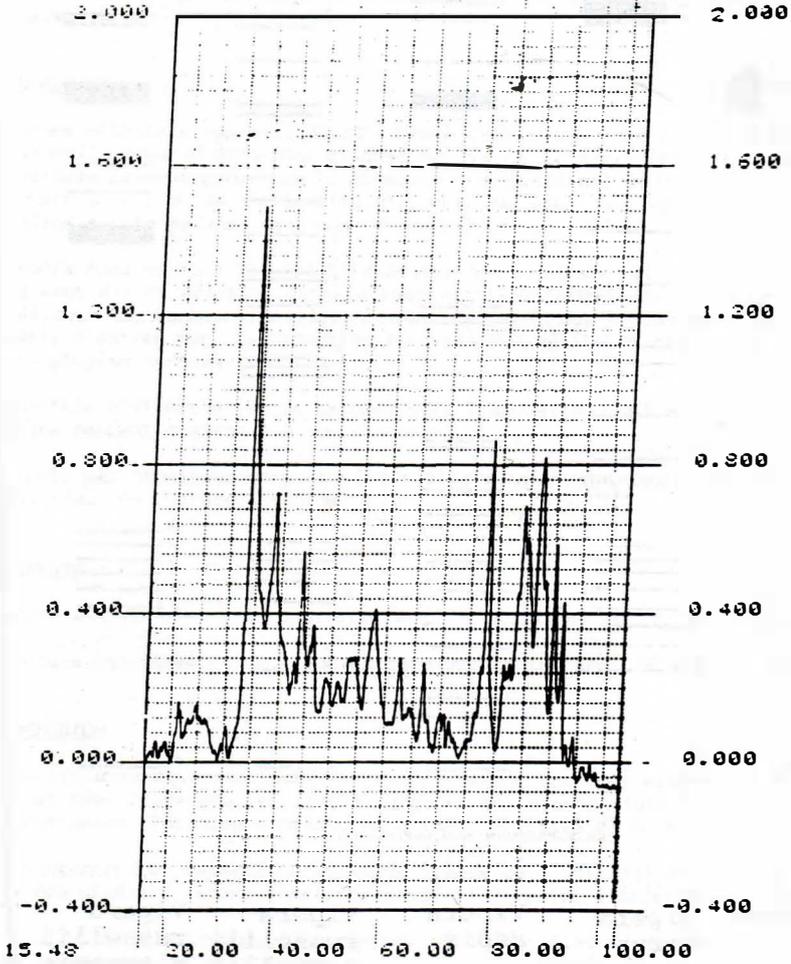
V. CONCLUSION

Les protéinogrammes constituent en quelque sorte les "empreintes digitales" des venins au même titre que les chromatogrammes sur couche mince de silice pour les teintures-mères d'origine végétale ou animale utilisée en homéopathie.

Les électrophorèses permettent la surveillance de l'identité et de la qualité de la matière première venant confirmer ainsi la garantie d'origine du fournisseur.

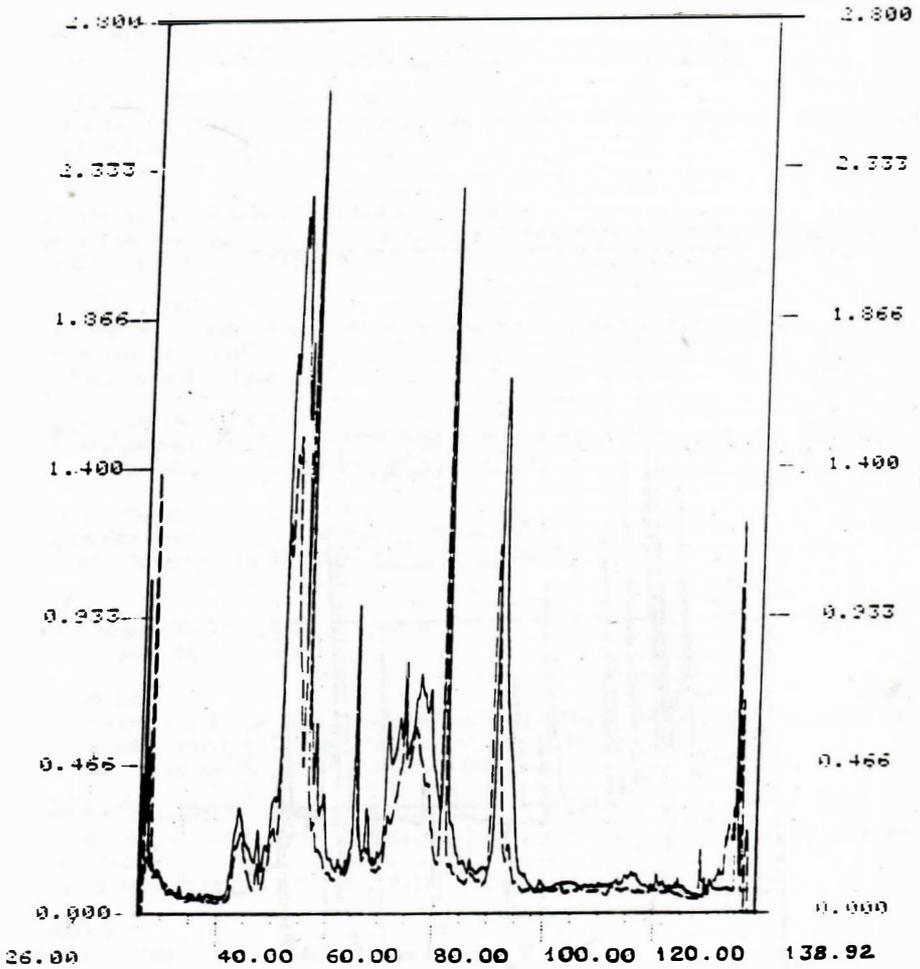
Enfin, le profil électrophorétique permet une identification sans équivoque puisque chaque espèce a un protéinogramme différent. L'électrophorèse peut être complétée par une lecture densitométrique intéressante pour l'appréciation de la préemption des souches des venins.

FIGURE 2



TRACE DENSITOMETRIQUE DU PROTEINOGRAMME IEF
DE LACHESIS MUTA

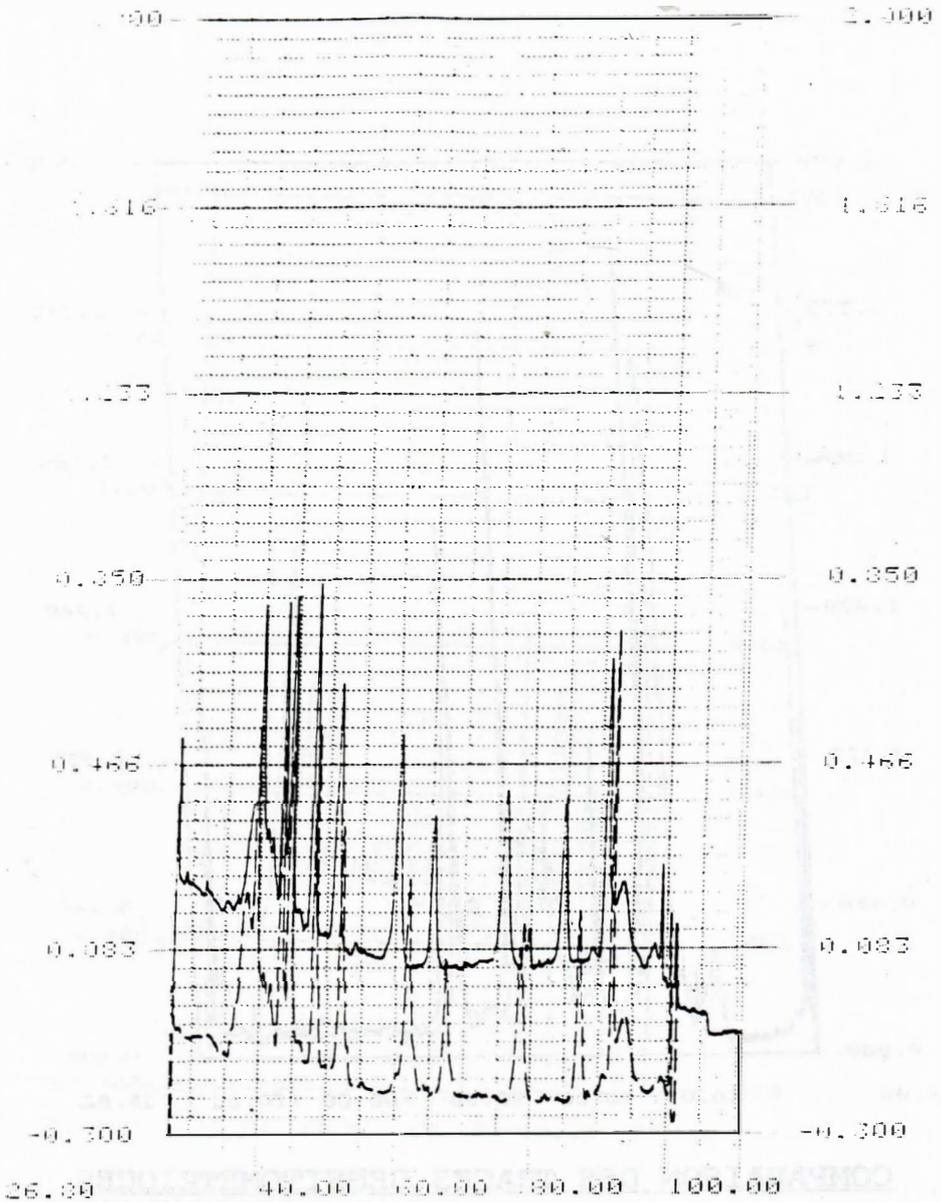
FIGURE 3



COMPARAISON DES TRACES DENSITOMETRIQUES
DES PROTEINOGRAMMES DE 2 BOTHROPS LANCEOLATUS

IEF

FIGURE 4



**TRACE DENSITOMETRIQUE DE L'ELECTROPHORESE SDS
DU VENIN DE SERPENT VIPERA ASPIS REDUIT**

BIBLIOGRAPHIE

ANTHONY J.

"Considérations sur la systématique des serpents à l'usage des médecins homéopathes"

Ann. Hom. Fr. 1962, 10, 839-846

BOULENGER G.A.

Catalogue of Snakes of the British Museum 1896, I à IV, p. 1-727

DEBOURCIEU L., CHAPERON N., RAYNAUD J. (1983)

"Comparaison de venins de deux vipéridées LACHESIS MUTUS et CROTALUS HORRIDUS par électrofocalisation"

Ann. pharm. fr. 41 (1), 87-92

DEBOURCIEU L., CHAPERON N., RAYNAUD J. (1984)

"Comparaison des venins de trois espèces du genre Vipera par électrofocalisation"

Ann. pharm. fr. 42 (5) 479-485

DORANDEU F. (1990)

"Venins de six Viperidae : profils électrophorétiques et activité agrégante plaquettaire in vitro"

Thèse doct. pharm., Lyon, 1990

HOGUE A.R., ROMANO HOGUE S.A.R.W.L.

"Poisonous snakes of the world. I. Check list of the pit vipers

Mem. Inst. Butantan, 1978-1979a, 42-43, 179-310

HOGUE A.R., ROMANO HOGUE S.A.R.W.L.

"Sinopse das serpientes peçon hentes do Brasil"

Mem. Inst. Butantan 1978-1979b, 42-43, 373-496

LACEPEDE H.

Oeuvres complètes, histoire naturelle

Furnes Paris, 1855, 1, 668 p

MONIN-VEYRET N.

"Contribution à l'étude chimiotaxonomique et pratique (contrôles d'identité et de qualité) des principaux venins de serpents utilisés en Homéopathie"

Thèse doct. état ès Sc. pharm., Lyon, 1985

NETIEN G., TRAISNEL M., VERAINE A. (1980)

Galénica 16 - Médicaments homéopathiques - Notions pratiques de pharmacie homéopathique

Technique et Documentation, éd., Paris, 452p

PHYSALIX M.

"Animaux venimeux et venins"

Masson ed. Paris, 1922, 656 p

PICHON-PRUM N., DEBOURCIEU L.,
"Comparaison des venins de deux Elapidae : NAJA NAJA et NAJA NIGRICOLLIS"
Ann. pharm. fr. 48 (2) 87-93

PICHON-PRUM N., ROLLAND O., DEBOURCIEU L. (1990)
"Apport de l'électrofocalisation à la systématique du genre AGKISTRODON
(Crotalinae)"
Biochemical systematics and Ecology 18 (4) 281-286

ROLLAND O. (1989)
"Contribution chimiotaxonomique et pratique des venins de scorpions, de lézards et
de serpents"
Thèse doct. Etat ès Sc. pharm., Lyon, 1989

SCHINDLER H.
"Vorschläge für das neue deutsche homöopathische Arzneibuch"
Buchdruckerei Ungeheuer Ulmer Eds Ludwisburg, 1967, 10, 583-594
9, 522-524

SCHLEGEL H.
"Essai sur la physionomie des serpents"
Les serpents venimeux, 1937, 2, 1-160

SVENSSON H.
"Isoelectric fractionation analysis and characterization of ampholytes in natural
pH gradients"
Acta Chem. Scand. 1962, 16, 2, 456-466

VESTERBERG O., SVENSSON H.
"Isoelectric fractionation analysis and characterization of ampholytes in natural
pH gradients"
Acta Chem. Scand. 1966, 20, 5, 820-834

VESTERBERG O.
"Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels"
Bioch. Biophys. Acta, 1972, 257, 11-19