

Introduction

L'envenimation ophidienne est un sérieux problème de santé dans le monde, plus de 125 000 décès ont été signalés par an à travers le monde (Chippaux *et al.*, 1997). Les espèces les plus retrouvées en Algérie sont : *Vipera lebetina* et *Cerastes cerastes*. Les morsures de *Vipera lebetina* sont très graves voire même mortelles, elles entraînent des hémorragies, des oedèmes et des myonécrose.

De nombreux travaux ont été réalisés sur le venin des *Viperidae* (Laraba- Djebari, 1984 ; Laraba- Djebari et Martin Eauclaire, 1990 ; Laraba- Djebari *et al.*, 1992 ; Laraba- Djebari *et al.* ; 1995 ; De-Faria *et al.*, 2001 ; Abib *et al.*, 2003). Ils ont montré que l'hémorragie, la myonécrose et l'œdème peuvent être la conséquence de l'action des kininogénases, d'hémorragines, de PLA₂ et de myotoxines. La complexité de la composition du venin rend difficile le traitement des envenimations. Actuellement le seul traitement spécifique est l'immunothérapie qui consiste en l'administration de fragments F(ab')₂ d'origine équine. L'amélioration de ce traitement nécessite la connaissance de la cinétique du venin dans les compartiments vasculaire et tissulaires de l'organisme.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet neutralisant d'un immun sérum expérimental constitué de fragments F(ab')₂ vis-à-vis des modifications physiopathologiques et immunologiques induites par le venin de *Vipera lebetina* en réalisant une étude pharmacologique, histologique et inflammatoire à différents temps en présence et en absence d'immunothérapie.

I- Problématique

Les envenimations vipérines constituent un réel problème de santé publique en Algérie où plusieurs cas de décès sont signalés chaque année. L'immunothérapie reste le seul traitement efficace.

En Algérie, le sérum commercialisé par l'Institut Pasteur est bivalent. Ce sérum est constitué de fragments F(ab')₂ obtenus après hyper immunisation de cheval par des doses croissantes du venin de *Vipera lebetina* et de *Cerastes cerastes*. L'amélioration de ce traitement nécessite la connaissance de la cinétique du venin dans les compartiments vasculaire et tissulaire de souris après envenimation expérimentale.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'efficacité de l'immunothérapie par une étude de la Biodistribution du venin, une étude de la réponse inflammatoire et une étude histologique complétée par le dosage des paramètres biochimiques.

Notre contribution a eu pour objectif d'étudier la biodistribution du venin de *Vipera lebetina* en présence et en absence d'immunothérapie, de doser certaines cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire tout en réalisant une approche histologique sur certains organes cibles afin d'essayer d'élucider les mécanismes physiopathologiques induits par le venin.

II- Matériel et Méthodes

II-1 Venins et animaux

- Le venin de *Vipera lebetina* sous forme lyophilisé est fourni par le laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie.
- Les souris mâles N'MERY (20 ± 2g) et les lapins albinos (2 ± 0,5 kg) sont fournis par l'annexe de l'Institut Pasteur d'Algérie (Kouba).

II- 2 Préparation et purification des fragments F(ab')₂ anti venin de *Vipera lebetina*

Afin de produire un immun sérum anti venin de *Vipera lebetina*, six lapins ont été immunisés avec des doses croissantes de venin. Les injections sont réalisées par voie sous cutanée au niveau de la peau dorsale de l'animal avec une semaine d'intervalle. Le venin est mélangé V/V avec l'adjuvant de Freund complet pour la première injection et l'adjuvant de Freund incomplet pour les deux injections qui suivent. Des prélèvements sanguins ont été effectués chaque semaine dans le but de contrôler le titre en anticorps par la technique ELISA simple. Les lapins sont sacrifiés une fois qu'ils auront produit un titre d'anticorps suffisamment élevé et constant.

Le sérum produit est précipité au sulfate d'ammonium et soumis à une hydrolyse enzymatique à la pepsine. Les fragments F(ab')₂ ainsi obtenu sont purifiés par immunoaffinité sur gel Sepharose CL-4B activé au BrCN et couplé au venin total de *Vipera lebetina* selon le protocole décrit par Ternynck et Avraméas, 1991.

Le contrôle de l'homogénéité de ces fragments a été réalisé par SDS- PAGE.

II-3 Préparation et titration de l'immunoconjugué constitué de fragments F(ab')₂ anti venin de *Vipera lebetina* couplé à la peroxydase et mise en place du test ELISA Sandwich

Dans le but d'étudier la biodistribution du venin de *Vipera lebetina* par ELISA sandwich, un conjugué constitué de fragments F(ab')₂ anti venin de *Vipera lebetina* a été préparé comme suit : 100 mg de peroxydase sont dissout dans 40,5 µl de glutaraldéhyde à 25% et 500 µl de tampon PBS (0,1 M pH 6,8). La préparation ainsi obtenue est laissée à température ambiante pendant 24 heures à l'abri de la lumière. Le lendemain, la préparation est filtrée à travers une colonne de chromatographie sur Sephadex G -25. Le gel sephadex G-25 est préalablement gonflé dans du tampon PBS (0,1 M pH 6,8) pendant 24 heures. La solution de peroxydase est éluée avec du tampon PBS (0,1 M pH 6, 8). La fraction colorée ainsi récupérée contenant la "peroxydase activée " est mélangée à une solution contenant 6 mg de fragments F (ab')₂. Le volume final du mélange est complété à 5 ml avec du tampon PBS puis un volume de tampon carbonate – bicarbonate est ajouté afin d'avoir une solution à 0,1 M. Le mélange précédant est mis sous agitation douce à 4°C durant une nuit à l'abri de la lumière. Après cette incubation, la glycine (0,1 M) est ajoutée, la nouvelle préparation est incubée de nouveau pendant 24 heures à 4°C. La préparation est ensuite dialysée contre le tampon PBS (0,1 M pH 6,8) durant toute une nuit en renouvelant le tampon toutes les heures pendant les trois premières heures. La solution est ensuite centrifugée à vitesse maximale pendant 10 min. Le surnageant récupéré est dilué avec un volume égal de glycérol. Le conjugué ainsi obtenu est titré par " ELISA simple" et conservé à 20°C.

L'étude de la Biodistribution du venin de *Vipera lebetina* est réalisé grâce à l'application du test ELISA sandwich. Une gamme de venin de *Vipera lebetina* allant de 10 ng à 120 ng/ml, ainsi que quatre dilutions du conjugué (1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/4000) ont été testées dans le but d'établir un protocole adapté du test " l'ELISA Sandwich " qui sera appliqué dans l'étude de la biodistribution du venin de *Vipera lebetina*.

Les concentrations du venin dans les différents compartiments de la souris en présence et en absence d'immunothérapie sont déduites à partir d'une courbe étalon.

II-4 Etude de la Biodistribution du venin total de *Vipera lebetina*, dans le sérum et différent organe de souris en présence et en absence d'immunothérapie par le test ELISA Sandwich

Pour la réalisation de cette étude, 12 lots de souris (à raison de 12 souris/lot) ont été utilisés. Parmi ces 12 lots, un lot de souris témoin reçoit un volume de 100 µl de NaCl 0,9 % par voie s.c. et un autre lot témoin reçoit par voie i.p. une dose de 0,5 mg de fragments F(ab')₂/20g de souris. Les dix lots restants reçoivent une dose sublétales de venin (25µg / 20 g de souris) par voie s. c. Parmi ces dix lots, 2 lots recevront une injection intra péritonéale de F(ab')₂ (0,5 mg / 20 g de souris). L'administration de l'anti-venin est réalisée 30 min après l'envenimation et ces deux lots sont sacrifiés à 180 min et 1440 min après l'injection du venin. Les autres lots sont sacrifiés à des intervalles de temps différents : 30 min, 120 min, 180 min, 360 min, 1080 min, 1440 min, 2880 min et 4320 min.

La technique 'ELISA Sandwich' a été utilisée afin de quantifier le venin de *Vipera lebetina* dans le sérum et les organes (Cœur, poumon, foie, rein, rate, pancréas, estomac et site d'injection) de souris envenimées par une dose sublétales de venin (25 µg/20 g de souris).

Une microplaque de titration de 96 puits à fond plat est sensibilisée avec une solution de 5 µg/ml de fragments F(ab')₂ diluée dans un tampon carbonate- bicarbonate (0,1 M, pH 9,5). Après une incubation d'une nuit à 4° C, la microplaque est lavée avec un tampon PBS-Tween₂₀ 0,1 % (pH 7,4 ; 0,1M). la saturation des sites non spécifiques est réalisée par dépôt de 100 µl de PBS-lait écrémé 5 % par puits suivie d'une incubation à 37°C pendant une heure. Après lavage de la microplaque avec le même tampon, La gamme de venin de *Vipera lebetina*, préalablement préparée, les différents surnageants tissulaires ainsi que le sérum sont déposés en « duplicate » à raison de 100 µl par puits. La microplaque est incubée pendant une heure à 37°C. Le conjugué constitué de fragments F(ab')₂ anti-venin de *Vipera lebetina* couplé à la peroxydase diluée au 1/1000 est ensuite déposé. La microplaque est incubée de nouveau pendant 1 heure à 37°C puis lavée. La révélation de la réaction s'effectue par l'addition d'un chromogène O-Phénylène diamine dihydrochloride (OPD) (20 mg d'OPD + 11 ml de tampon phosphate 0,01 M pH 7,4 et 10 µl H₂O₂ 30 V). La réaction est arrêtée par addition de H₂SO₄ 2N après un développement à l'obscurité pendant 10 minutes. La lecture des absorbances est réalisée à 490 nm.

II-5 Etude de la réponse inflammatoire par le dosage des cytokines : IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 et TNF-α

Le dosage des cytokines (IL -1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, TNF-α) impliquées dans le processus inflammatoire de l'envenimation vipérine a été réalisé sur le modèle souris dans les mêmes conditions que les expériences de biodistribution et de dosage des différents paramètres biochimiques. Ce dosage est effectué par un test ELISA sandwich. Les cytokines sont captées par des anticorps monoclonaux spécifiques et l'addition d'anticorps biotinylés augmente l'affinité du complexe formé vis à vis de la streptavidine couplée à la peroxydase qui va quantifier ce complexe par l'ajout du substrat chromogène. Les microplaques sont préalablement sensibilisées avec un anticorps anti-cytokines à doser (IL1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, TNFα). Dans un premier temps les standards, ainsi que les échantillons sériques, sont déposés à raison de 50 µl par puits, en duplicate ainsi que les échantillons sériques. La microplaque est incubée à température ambiante pendant 1 heure de même que les anticorps biotinylés, déposés à raison de 50 µl par puits. Dans un second temps, après une série de lavages, 100 µl d'une solution contenant le conjugué (streptavidine-HRP) est déposé dans chaque puits. La microplaque est incubée de nouveau à température ambiante pendant 30 min. L'activité enzymatique est révélée par addition du substrat spécifique à l'enzyme : le TMB (le 3-3'. 5-5' Tétraméthyl Benzidine) à raison de 100 µl

par puits. La réaction se développe pendant 30 min à l'obscurité puis une solution d'arrêt est ajoutée (100 µl par puits).

L'intensité de la réaction colorée est mesurable en densité optique à 450 nm. Elle est directement proportionnelle à la quantité de cytokine présente dans les échantillons et les standards.

Ces étapes sont communes pour le dosage de toutes les cytokines sauf pour l'IL-1β et TNF-α ou les anticorps biotinylés sont incubés en même temps que les standards et les échantillons sériques pendant 2 heures.

II-6 Etude histologique des effets physiopathologiques du venin de *Vipera lebetina* avant et après immunothérapie

L'étude histologique a été réalisée sur le rein afin de déterminer les effets physiopathologiques induit par une dose sublétales du venin de *Vipera lebetina* injectée par voie sous cutanée. Cette étude a été réalisée dans les mêmes conditions que la Biodistribution et le dosage des cytokines.

L'étude histologique a été complétée par le dosage des paramètres biochimiques (Glycémie, Urée, Cholestérol, triglycérides et Créatinine).

III- Résultats et Discussion

III-1 Purification des fragments F (ab')₂ par chromatographie d'affinité sur gel de Sepharose CL-4B activé au BrCN et couplé au venin total de *Vipera lebetina*

La chromatographie d'affinité est une chromatographie d'adsorption dans laquelle la spécificité d'interaction entre un ligand lié par covalence à un support inerte et une protéine soluble est très importante. Dans le but de purifier des fragments F (ab')₂ spécifiques dirigés contre le venin de *Vipera lebetina*, une série de douze chromatographies a été réalisée après avoir déposé 100 UDO/ml de l'échantillon.

Après couplage du gel de Sepharose CL 4B activé au BrCN avec le venin de *Vipera lebetina*, le rendement ainsi que la quantité du venin couplé ont été calculés tableau 1.

Tableau 1 : Rendement et quantité du venin liée après couplage du gel Sepharose CL 4B au venin de *Vipera lebetina*.

Rendement (%)		95,2
Quantité de venin couplée	En UDO/ml de gel	0,199
	En mg/ml de gel	1,12

Le profil chromatographique révèle la présence de trois pics protéiques (figure 1).

Le premier pic majoritaire, est obtenu en utilisant comme tampon d'élution du PBS (0,1 M pH 7,4) et correspond aux protéines sériques non immuno-globuliniques (telle que l'albumine), n'ayant aucune affinité avec les protéines du venin total de *Vipera lebetina* couplées à la colonne. Ces protéines pourraient correspondre aux protéines sériques n'ayant pas été éliminées au cours des étapes de la précipitation (Laraba-Djebari et Hammoudi-Triki, 1998).

La variation du pH de 7,4 (PBS 0,1 M) à 3 (glycine 0,1 M) a permis l'obtention d'un second pic représentant les fragments F (ab')₂ de moyenne affinité pour le venin, car à ce pH acide la liaison Antigène - Anticorps est déstabilisée.

Le troisième pic, est obtenu en diminuant le pH du tampon glycine (0,1 M) jusqu'à 2. Il représente les fragments F (ab')₂ de haute affinité au venin de *Vipera lebetina*.

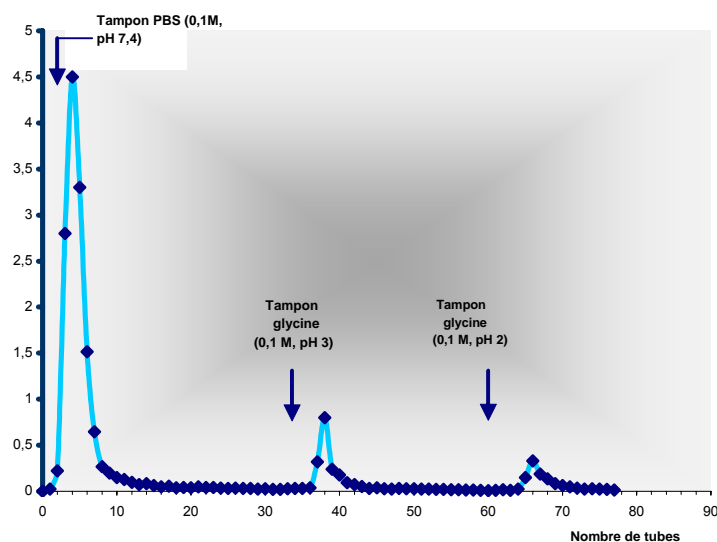


Figure 1 : Purification de fragments F(ab')₂ anti venin de *Vipera lebetina* par chromatographie d'affinité sur gel Sepharose CL-4B activé au BrCN et couplé au venin de *Vipera lebetina*.

III-2 Contrôle de l'homogénéité des fragments F (ab')₂ issus de la chromatographie d'immuno - affinité

L'analyse électrophorétique des fragments F (ab')₂ issus de la chromatographie d'affinité, est réalisée afin de contrôler leur pureté. L'électrophorèse réalisée sur gel de polyacrylamide à 12,5 % en présence de SDS, révèle l'existence de plusieurs bandes d'intensité différentes. Le poids moléculaire des fragments F (ab')₂ spécifiques au venin de *Vipera lebetina* (moyennes affinités) ainsi que le sérum précipité et pepsiné est estimé à partir d'une courbe étalon représentant le logarithme du poids moléculaire en fonction du Rf en utilisant les différents marqueurs de Poids moléculaires. L'électrophorégramme révèle l'existence de plusieurs bandes qui correspondent aux différents échantillons sériques. La fraction constituant les fragments F (ab')₂ de moyenne affinité est composée d'une bande majeure de 96 kDa, qui correspondrait aux chaînes lourdes clivées par la pepsine et aux chaînes légères des IgG.

III-3 Etude de la Biodistribution du venin de *Vipera lebetina* en présence et en absence d'immunothérapie

L'étude de la Biodistribution du venin de *Vipera lebetina* dans les différents compartiments de la souris (tissulaires et vasculaire) en présence et en absence d'immunothérapie a été réalisée sur

des souris mâles (20 ± 2 g) par le test ELISA sandwich après avoir préparé un conjugué constitué de fragments $F(ab')_2$, antivenin de *Vipera lebetina* couplé à la peroxydase.

III-3.1 Détermination du titre en anticorps du conjugué spécifique au venin total de *Vipera lebetina* par le test ELISA simple

Le test ELISA permet l'estimation quantitative d'un antigène ou un anticorps spécifique dans un liquide biologique. Ce test nous a permis d'estimer le titre en anticorps du conjugué antivenin de *Vipera lebetina*, préparé à partir des fragments $F(ab')_2$ de lapins. Ce conjugué présente un titre de 51 200 qui nous renseigne sur la spécificité élevée de ces fragments vis-à-vis du venin de *Vipera lebetina* (Figure 2).

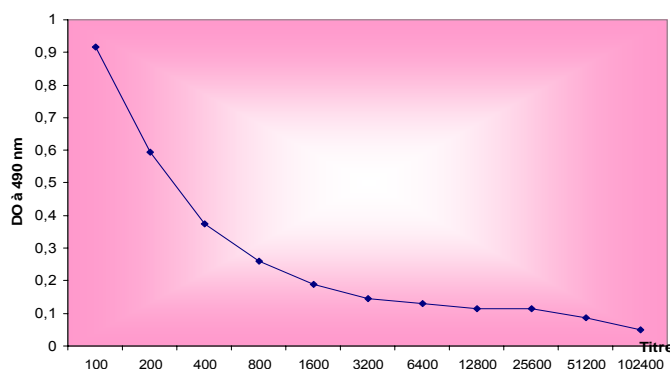


Figure 2 : Détermination du titre en anticorps du conjugué composé de fragments $F(ab')_2$ anti-venin de *Vipera lebetina* couplé à la peroxydase.

Afin de quantifier le venin de *Bothrops*, un conjugué constitué de fragments $F(ab')_2$ antivenin de *Bothrops* a été constitué et le titre a été estimé à 3200 (Chavez-Olortegui *et al.*, 1997) (tableau 2).

Tableau 2 : Comparaison des titres de quelques conjugués

Conjugué	Titre déterminé par ELISA simple	Références
Anti-venin de <i>Vipera lebetina</i> couplé à la peroxydase	51200	Nos résultats
Anti-venin de <i>Cerastes cerastes</i> couplé à la peroxydase	12 800	Chérifi, 2004
Anti-venin de <i>Tityus serrulatus</i> couplé à la peroxydase	3200	Chavez-Olortegui <i>et al.</i> , 1994
Anti-venin de <i>Bothrops</i> couplé à la peroxydase	3200	Chavez-Olortegui <i>et al.</i> , 1997

La comparaison entre les différents titres de conjugués, montre que notre conjugué a un titre en anticorps très élevé.

III-3.2 Mise au point du test ELISA sandwich pour quantifier le venin dans le sérum et organes de souris envenimées

Le test ELISA sandwich a été mis au point afin de quantifier le venin de *Vipera lebetina* dans les différents compartiments : vasculaire et tissulaires de souris envenimées avec une dose sublétales (25 µg/ 20 gde souris) de ce venin. Ce test est calibré en utilisant une courbe étalon établie grâce à l'utilisation d'une gamme de concentrations de venin allant de 10 à 120 ng/ml.

Quatre dilutions du conjugués ont été testées : 1/1000, 1/2000, 1/3000 et 1/4000 vis-à-vis de la gamme de venin par ELISA sandwich. Après de nombreuses mises au point et le calcul du coefficient de corrélation, nous avons pu estimer la linéarité de ce test. Les résultats obtenus montrent que la dilution du conjugué au 1/1000, donne une meilleure linéarité et réactivité vis-à-vis de la gamme de venin choisie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9724$ (Figure 3).

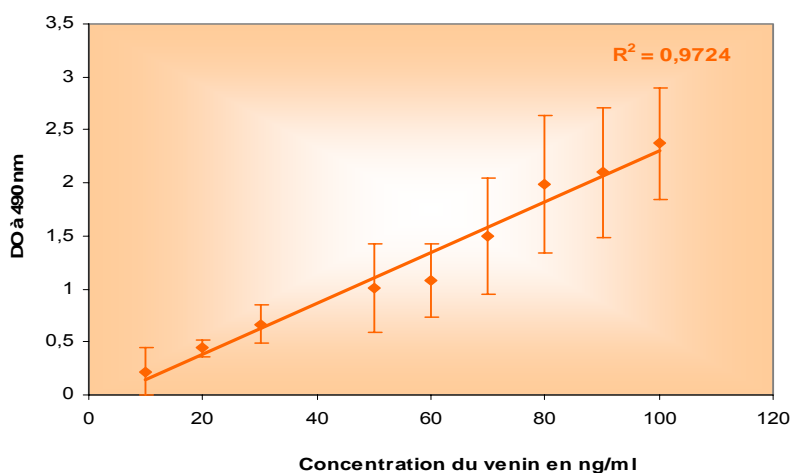


Figure 3 : Courbe étalon du conjugué anti venin de *Vipera lebetina* réalisée par ELISA simple.

III-3.3 Etude de la Biodistribution du venin de *Vipera lebetina* dans le sérum, site d'injection et les différents compartiments tissulaires de la souris avant et après immunothérapie

La concentration du venin dans le sérum, le site d'injection et les différents organes a été estimée à partir d'une courbe étalon du venin de *Vipera lebetina* établie préalablement par ELISA sandwich. La gamme d'étalonnage comprend onze points avec des concentrations allant de 10 à 120 ng/ml.

Les résultats obtenus après une envenimation expérimentale avec une dose sublétales (25 µg/20 g de souris), montrent que la répartition du venin du site d'injection vers les différents compartiments vasculaire et tissulaires est rapide (tableau 3). Après 30 min d'envenimation expérimentale nous enregistrons un taux élevé au niveau du site d'injection (118 ng/ml), sérum (98,8 ng/ml), rein (89,9 ng/ml) et foie (33 ng/ml). Dans les autres organes, la répartition du venin est plus tardive puisque les concentrations maximales ne sont retrouvées qu'après 6 heures d'envenimation.

Le taux du venin de *Vipera lebetina* décroît progressivement au niveau du site d'injection, jusqu'à atteindre une concentration de 88 ng/ml, et augmente parallèlement dans les différents compartiments tissulaires et dans le sérum avec un pic de 109 ng/ml enregistré à 6 heures. Une forte concentration du venin est retrouvée dans le cœur (69,1 ng/ml). Ceci peut être expliqué par les perturbations du système cardiovasculaire engendrées par les protéines du venin de serpents. La concentration du venin diminue lentement en fonction du temps au niveau des différents organes :

cœur, foie, poumon et rein. De faibles concentrations ont été détectées dans l'estomac, le pancréas et la rate dans un ordre décroissant (Tableau 3).

Tableau 3 : Biodistribution du venin de *Vipera lebetina* dans le sérum, le site d'injection et différents compartiments tissulaires de souris envenimées avec une dose sub létale, déterminée par ELISA sandwich.

Temps	30 min	3 heures	6 heures	24 heures	48 heures
Echantillons					
sérum	98,8 ± 24,2	102 ± 33,6	109 ± 32,4	100 ± 19	23,3 ± 15
Site d'injection	118 ± 11,9	103,3 ± 14,2	94,5 ± 21,2	88 ± 23,1	12,82 ± 12
Cœur	22,2 ± 8,03	65 ± 4,40	69,5 ± 10,6	62,2 ± 13	8,25 ± 4,1
poumon	31,2 ± 2,58	72,4 ± 13,8	88,9 ± 18,5	85 ± 4,44	5,72 ± 0,1
Foie	33 ± 1,72	68,8 ± 1,39	74,4 ± 5,82	72,3 ± 10	17,93 ± 1
Rein	89,9 ± 17,7	92 ± 14,4	99,9 ± 18,7	94,33 ± 19,1	14,82 ± 2
Rate	12,24 ± 1,17	28 ± 2,28	35,5 ± 3,77	22,5 ± 3,9	0,73 ± 0
Pancréas	18,53 ± 2,27	45 ± 3,29	51,1 ± 3,54	32,2 ± 2,1	0,12 ± 0
Estomac	33,3 ± 4,8	51,2 ± 11,2	41 ± 10,14	22,2 ± 5,66	0
Cerveau	0	0	0	0	0

Le taux maximal du venin dans l'estomac a été retrouvé à 3 heures avec une concentration de 51,2 ng/ml alors qu'au niveau de la rate et du pancréas, les taux maximums n'ont été enregistrés qu'après 6 heures d'envenimation avec des concentrations de 35,5 ng/ml et 51,1 ng/ml respectivement.

La lente élimination du venin de *Vipera lebetina*, peut être la conséquence de la masse élevée de ces constituants, ce qui fait qu'ils diffusent lentement dans les différents compartiments tissulaires de la souris.

Aucune trace de venin n'a été décelée au niveau du cerveau. Ceci serait dû à la présence de la barrière hémato-encéphalique (Revelo *et al.*, 1996 ; Selvanayagam *et al.*, 1999).

Les résultats obtenus sur la cinétique du venin de *Vipera lebetina*, permettent de conclure que ce dernier se distribue assez rapidement car 30 minutes après son injection par voie sous cutanée, il est détecté dans le sérum et la majorité des organes de la souris. Ces résultats renseignent également sur la lente élimination de ce venin.

Le pouvoir neutralisant des fragments F(ab')₂ (46,25 mg/Kg) injectés par voie intrapéritonéale après 30 minutes d'envenimation a été également testé. Les résultats montrent que le pouvoir neutralisant des fragments F(ab')₂ est meilleur après 24 heures de leurs injections car la concentration du venin a diminué considérablement dans les différents compartiments de la souris (tableau 4). Ceci est probablement dû au court délai (30 min) de l'administration de l'antivenin. Il y a une meilleure neutralisation quand le temps écoulé entre l'envenimation et l'administration de l'antivenin est court et cela indépendamment de la dose de venin injectée (Bessalem *et al.*, 2002 ; Krifi *et al.*, 2002).

Tableau 4 : Effets des anticorps sur la distribution du venin de *Vipera lebetina*

Echantillon	Site d'injection	Sérum	Rein	Foie	Poumon	Cœur	Pancréas	Rate	Estomac	Cerveau
Temps										
Venin+ F(ab') ₂ (3 h)	94,4 ± 12,66	88 ± 15	72 ± 25,1	61,5 ± 22	53,3 ± 18,2	44 ± 10,1	21,2 ± 6,1	23,3 ± 8	32,1 ± 4,47	0
Venin 3 h	103,3 ± 14,2	102 ± 33,6	92 ± 14,4	68,8 ± 1,39	72,4 ± 13,8	65 ± 4,40	45 ± 3,29	28 ± 2,28	51,2± 11,2	0
Venin+ F(ab') ₂ (24 h)	49,9 ± 7,09	52,2 ± 22	44,4 ± 12	38 ± 5,56	25 ± 6,66	18,9 ± 2,3	12,5 ± 1,53	13,2 ± 1	8,2 ± 0,9	0
Venin 24 h	88 ± 23,1	100 ± 19	94,33 ± 19,1	72,3 ± 10	85 ± 4,44	62,2 ± 13	32,2 ± 2,1	22,5 ± 3,9	22,2 ± 5,66	0

L'administration des fragments F(ab')₂ 30 minutes après l'injection du venin a permis une neutralisation quasi-totale dans la plus part des organes (tableau 4). La concentration du venin diminue jusqu'à atteindre de très faibles valeurs au niveau du cœur, du poumon, de la rate, du pancréas et de l'estomac. La neutralisation est meilleure quand le temps écoulé après l'administration de l'antivenin est long, car les fragments F(ab')₂ provoquent une redistribution du venin en déplaçant les constituants du venin fixés sur les sites spécifiques des organes cibles. Ceci suggère qu'il y a formation d'immuns complexes entre les constituants du venin et les fragments F(ab')₂. Ces derniers se dissocient au bout de 24 heures, libérant ainsi les constituants du venin qui provoquent une nouvelle distribution du venin.

Parmi les travaux ayant montré l'importance du court délai dans l'efficacité de l'immunothérapie, nous citons : les travaux de Silamut *et al.*, (1990) ; Revelo *et al.*, (1996) ; Theakston *et al.*, (1996) ; Krifi *et al.*, (2002) et Hammoudi-Triki et Laraba-Djebari (2003).

III-4 Etude des effets du venin de *vipera lebetina* sur la production des cytokines dans le sérum de souris en présence et en absence d'immunothérapie

L'envenimation de souris par voie sous cutanée avec une dose sublétales (25 µg/20 g de souris) du venin de *vipera lebetina* a induit le déclenchement d'une réponse inflammatoire corrélée par la synthèse d'une multitude de cytokines pro inflammatoires (IL-6, IL-1β et TNF-α) et anti inflammatoire (IL-4) (Figure 4 et 5).

Le venin provoque une augmentation rapide et précoce du TNF-α. En effet à 6 heures d'envenimation, un premier pic est observé avec une concentration de 147 pg/ml, suivi d'un second qui apparaît à 24 heures avec une concentration de 122,5 pg/ml s'annulant au bout de 48 heures (Figure 4). L'apparition de l'IL-1β est plus tardive. Elle n'apparaît qu'à partir de 3 heures avec un pic de 60 pg/ml, mais la valeur la plus significative est enregistrée à 24 heures avec une concentration de 186,66 pg/ml. La cinétique d'apparition de l'IL-6 dans le sérum des souris envenimées par une dose sublétales du venin de *vipera lebetina* se traduit par un pic à 3 heures. Cette concentration diminue à des intervalles de temps postérieur. Un deuxième pic est observé à 24 heures avec une concentration maximale de 1306,6 pg/ml. L'IL-1β et l'IL-6 sont des cytokines multifonctionnelles ; elles participent dans des réactions inflammatoires aiguës et modulent la fonction des lymphocytes β et T durant le processus inflammatoire (Heinrich *et al.*, 1990). Elles sont considérées comme des marqueurs de gravité et leur taux plasmatique est extrêmement élevé et souvent corrélé avec la sévérité de l'envenimation (Sofer *et al.*, 1996 ; Meki *et al.*, 1998 ; D'Suze *et al.*, 2003 ; Fukuhara *et al.*, 2003).

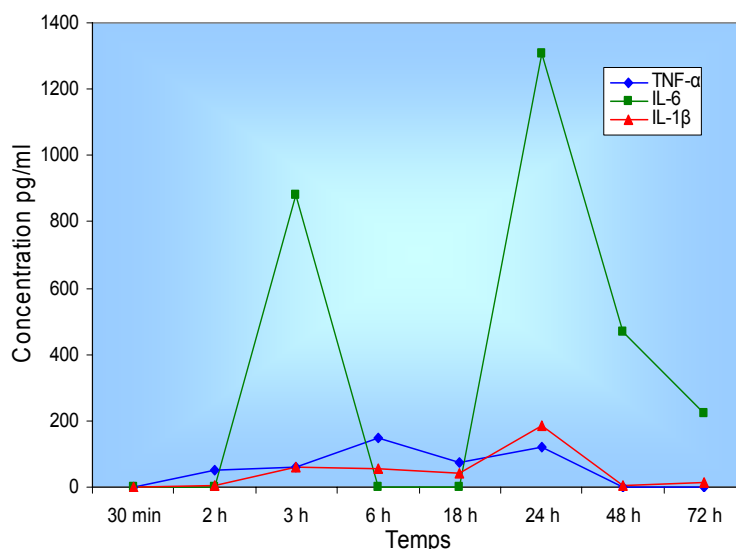


Figure 4 : Cinétique d'apparition des cytokines pro inflammatoires : TNF-α, IL-6 et IL-1β dans le sérum de souris envenimées par une dose sublétales du venin de *Vipera lebetina*.

Parallèlement à la production des cytokines pro inflammatoires, l'injection d'une dose sublétales du venin de *Vipera lebetina* a induit également la libération de cytokines anti inflammatoires telle que l'IL-4. Cette dernière est apparue dans le sérum des souris envenimées dès les premières minutes de l'injection du venin avec un pic de concentration de 120 pg/ml à 30 minutes. Un deuxième pic a été enregistré à 24 heures avec une concentration de 92,5 pg/ml.

L'IL-4 inhibe la production des cytokines pro inflammatoire et des médiateurs de l'inflammation tels que les prostaglandines, l'oxyde nitrique et les leukotriènes, réduisant ainsi l'intensité des manifestations pathologiques observées lors des envenimations.

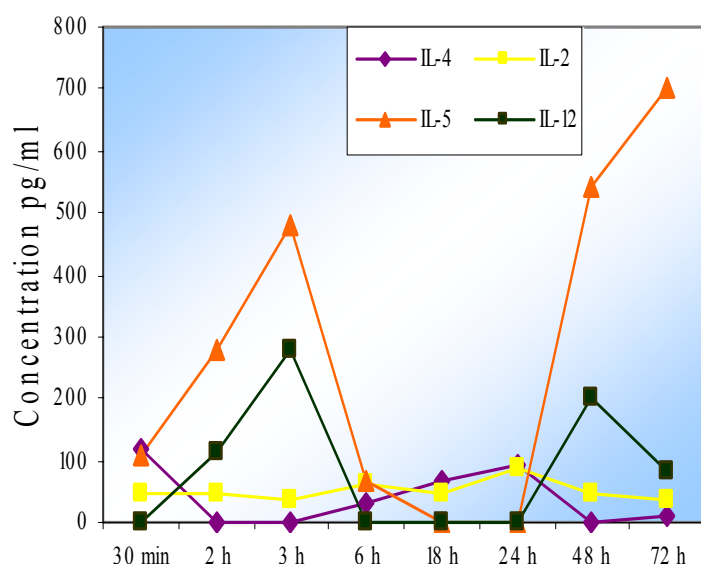


Figure 5 : Cinétique d'apparition des cytokines : IL-4, IL-5, IL-2 et IL-12 dans le sérum de souris envenimées avec une dose sublétalement du venin de *Vipera lebetina*

Toutes les cytokines étudiées présentent une cinétique biphasique. La première phase correspond probablement à une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Le venin, considéré comme un antigène protéique, est capté par des cellules spécialisées (CPA), ingéré puis dégradé en peptides dans les lysosomes. Ces derniers s'associent aux molécules du complexe d'histocompatibilité de classe II. Le complexe ainsi formé est exposé sur la membrane des CPA, puis il est reconnu par le récepteur du lymphocyte T CD4⁺ de type Th1. Ainsi activées, les cellules T produisent l'IL-2 et l'IFN- γ , qui vont stimuler à leur tour la synthèse d'autres cytokines afin d'amplifier la réponse inflammatoire en augmentant la production des cytokines pro inflammatoires telles que : l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α . La diminution des concentrations des cytokines au cours de la première phase est probablement due, d'une part à la présence des cytokines anti inflammatoires telles que l'IL-4 et l'IL-10 qui inhibent leur production ou bien à la libération des glucocorticoïdes produits suite à la cascade d'évènements enclenchée par ces mêmes cytokines à l'origine d'une boucle de rétro inhibition impliquant l'axe neuro- endocrinien, d'autre part. La saturation des sites récepteurs à la surface des cellules ou bien la diminution de leur expression, peut également expliquer la diminution de la production de ces cytokines. La deuxième phase qui se caractérise le plus souvent par l'apparition d'importantes concentrations de la plupart des cytokines est probablement due à la libération d'autres substances activatrices comme certains médiateurs qui peuvent diminuer ou augmenter l'activité des cytokines en fonction des cellules cibles. Ainsi l'IL-4 induit la production de l'IL-6 par les cellules endothéliales et les lymphocytes β , alors qu'elle inhibe la production de l'IL-6 et des autres cytokines par les macrophages.

L'immunothérapie qui a consisté en l'injection par voie intrapéritonéale, de fragments F(ab')₂ 30 minutes après l'envenimation semble avoir une capacité à neutraliser les effets provoqués par les toxines circulantes du venin de *Vipera lebetina* (Figure 6).

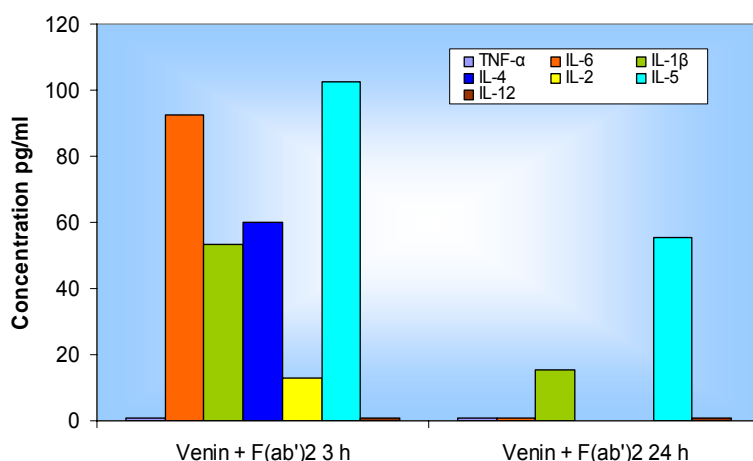


Figure 6 : Quantification des cytokines sériques chez la souris envenimées par une dose sublétales du venin de *Vipera lebetina* après neutralisation par les fragments F (ab')₂ spécifiques.

Trois heures après l'injection de l'antivenin, le taux du TNF- α , IL-12 et IL-2 est quasiment nul, alors que nous retrouvons des quantités importantes de l'IL-6, IL-1 β , IL-4 et IL-5 dans le sérum. Par contre après 24 heures, la concentration de toutes les cytokines s'est annulée sauf pour IL-1 β et IL-5.

Ces résultats permettent de déduire d'une part, l'importance du court délai entre l'injection du venin et l'administration de l'antivenin et d'autre part, le bon pouvoir neutralisant des fragments F (ab')₂.

III-5 Etude histopathologique des effets du venin de *Vipera lebetina* avant et après immunothérapie

L'analyse histologique de la zone corticale du rein témoin ayant reçu 100 μ l d'eau physiologique par voie cutanée montre que le parenchyme rénal a une architecture conservée composée de glomérules et de tubules contournés normaux, non altérés avec des noyaux bien distincts et un revêtement épithélial préservé (Figure 7A). Les résultats de l'examen microscopique du parenchyme rénal révèlent que l'hémorragie apparaît dès les premières minutes de l'envenimation.

A 30 minutes de l'envenimation, des foyers hémorragiques intraglomérulaires et intertubulaires ont été observés. Cette hémorragie est due à la présence des cellules érythrocytaires. Quelques noyaux hypertrophiques ont été également observés. Cependant les tubules rénaux contournés restent conservés (Figure 7B). Après 3 heures d'envenimation, il y a présence d'hémorragie corticale qui se traduit par la présence d'hématies dans les compartiments intra et intertubulaires. Les tubules paraissent gonflés avec certains noyaux pycnotiques. Il faut noter également une légère augmentation du nombre des glomérules en rapport probablement à une hyperplasie des cellules endothéliales (augmentation du nombre des cellules) (Figure 7C). Ces altérations s'intensifient et évoluent après 24 heures et 48 heures d'envenimation. Une envenimation de 24 heures avec cette même dose semble évoluer vers une nécrose importante qui provoque une réduction de la taille des glomérules. De ce fait l'espace de Bowman semble être plus large accompagné d'une tuméfaction des tubes contournés distaux et proximaux. Même la zone médullaire présente des altérations oedématisées avec la présence de quelques foyers hémorragiques (Figure 7D). Au bout de 48 heures d'envenimation, le venin de *Vipera lebetina* engendre sur cette même zone corticale des modifications morphologiques et des troubles d'ordre vasculaires caractérisés essentiellement par

une persistance du nombre élevé de glomérules, l'apparition d'atrophie glomérulaire diffuse, une perturbation de l'architecture glomérulaire avec réduction de l'espace mésangial. Certains tubules présentent des signes de dégénérescence, une hypertrophie des noyaux, une vasodilatation et une invasion des globules rouges (Figure 7E). Cette vasodilatation active peut avoir comme conséquence le passage des globules rouges dans l'espace urinaire (hématurie) (Cabanne et Bonenfant, 1986).

Des altérations semblables ont été observées, selon certains auteurs, dans le cas de lésions rénales dues à des agents toxiques. Une nécrose aigue du revêtement des tubes proximaux a été également observée (Cabanne et Bonenfant, 1986 ; Soe-Soe *et al.*, 1990). Le gonflement des tubules, phénomène provoqué par le venin de *Vipera lebetina*, semble être provoqué aussi après l'action de plusieurs types de venins tels que le venin de *Bothrops moojeni*, *Bothrops insularis* (Boer Lima *et al.*, 1999) et *Vipera palestina* (Ickowicz *et al.*, 1996).

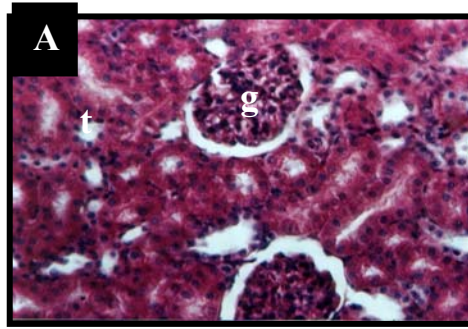
L'injection intrapéritonéale des anticorps à des souris ayant reçu une dose sub létale du venin de *Vipera lebetina*, engendre un rétablissement partiel des altérations observées.

Après 3 heures de traitement, quelques effets ont été neutralisés dont l'hémorragie diffuse. Par contre les glomérules restent toujours en nombre élevé avec une légère régression de l'hyperplasie.

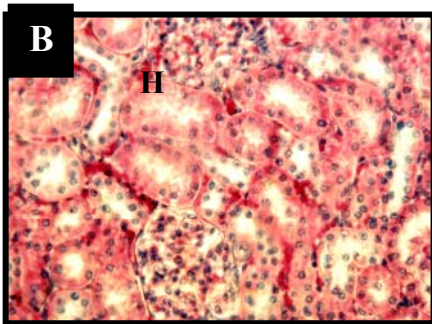
Au bout de 24 heures de traitement, la structure du parenchyme rénal est conservée, comportant toujours un nombre élevé de glomérules avec une diminution importante de l'hyperplasie endothéliale glomérulaire, des foyers hémorragiques notamment interstitielles.

Revelo *et al.*, (1996) ont trouvé des résultats semblables. En effet l'administration d'un antivenin spécifique au venin de *Tityus serrulatus* révèle une faible neutralisation au niveau du rein et du poumon.

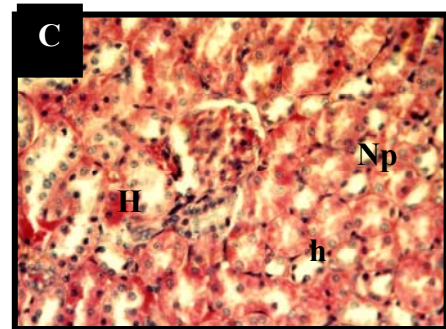
Le venin de *Vipera lebetina* a provoqué également une variation des différents paramètres biochimiques. Le taux de glucose dans le sang a subi des variations importantes et précoces avant de se normaliser. Un premier pic est observé dès la trentième minute d'envenimation, avec un maximum de 1,48 g/l suivi d'un second pic apparaissant à 18 heures avec une concentration de 1,38 g/l avant de normaliser à 24 heures. Cette hyperglycémie pourrait être due à une hypersécrétion hormonale ou à une perturbation de la sécrétion de l'insuline.



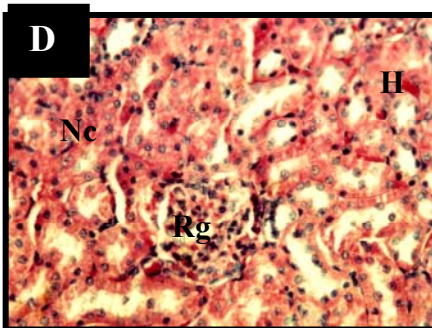
Parenchyme rénal témoin



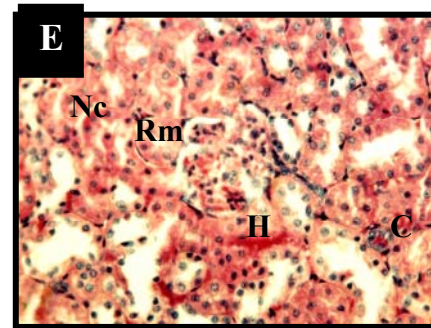
Souris envenimées avec une dose sublétales (25 µg) du venin pendant 30 min



Souris envenimées avec une dose sublétales (25 µg) du venin pendant 3 h



Souris envenimées avec une dose sublétales (25 µg) du venin pendant 24 h



Souris envenimées avec une dose sublétales (25 µg) du venin pendant 48 h

Figure 7 : Altération du parenchyme rénal de souris après injection d'une dose sublétales (25 µg) du venin de *Vipera lebetina* par voie sous cutanée.

Coloration : Hématoxyline - Eosine

H : hémorragie ; Rm : réduction mésangiale ; Rg : réduction glomérulaire ; Nc : nécrose ; Np : noyaux pycnotiques ; h : hypertrophie ; g : glomérule ; t : tubule.

Conclusion

Le travail que nous avons réalisé a eu pour objectif d'étudier certains effets physiopathologiques, immunologiques et biochimiques induits par le venin de *Vipera lebetina*.

Cette étude a permis d'une part la mise au point d'un test immuno-enzymatique permettant la quantification du venin dans l'organisme après la préparation d'un immuno conjugué spécifique.

Les résultats de la Biodistribution du venin de *Vipera lebetina* injecté par voie sous cutanée ont montré :

- Une distribution rapide du venin dans les compartiments vasculaire et tissulaires de souris.
- les cibles majeures de ce venin semblent être : le cœur, le foie, le rein et le poumon.
- Une élimination lente du venin de *Vipera lebetina* en comparaison à sa distribution.

L'administration des fragments $F(ab')_2$ par voie intra péritonéale 30 minutes après envenimation a permis de réduire et de neutraliser la quasi-totalité des effets induits par ce venin.

D'autre part, l'étude de la réponse inflammatoire par le dosage de quelques cytokines et l'étude des paramètres biochimiques ont permis de montrer l'implication du venin dans l'inflammation et les différents désordres métaboliques.

De plus l'étude histologique a permis la mise en évidence des altérations tissulaires causées par le venin de *Vipera lebetina*. Ces altérations sont d'ordre vasculaire et tissulaire allant de l'hémorragie à l'œdème et à la nécrose.

L'immunothérapie a permis la neutralisation des effets physiopathologiques du venin de *Vipera lebetina*. Les résultats de cette neutralisation sont meilleurs lorsque les souris sont sacrifiées plusieurs heures après l'injection de l'antivenin car les organes étudiés retrouvent un aspect quasi normal après 24 heures de son administration.

Références bibliographiques

- Abib, H., Laraba-Djebari, F. (2003). Effect of ^{60}Co gamma radiation on toxicity and haemorrhage, myonecrotic and edema-forming activities of *Cerastes cerastes* venom. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* **81**: 1141-1147.
- Bessalem, S., Hammoudi, D., Laraba-Djebari, F. (2002). Biodistribution du venin d'*Androctonus australis hector* et modifications histopathologiques du pancréas. *Toxines et recherche biomédicale, Edition scientifique et médicale* : 236-242.
- Boer-Lima, P.A., Gontijo, J. A. R., Gruz. Höfling, M. A. (1999). Histological and functional renal alteration caused by *Bothrops noojenu* snake venom in rats. *Am .J. Trop .Med. Hyg.* **61**: 698-705.
- Cabanne F and Bonenfant J. L (1986) Anatomic pathology: principe de pathologie générale, de pathologie spéciale et d'anatomopathologie. Edition Maloine, les presses de l'université de Laval, Quebec : 1022-1052.
- Chavez-Olortegui, C., Fonseca, S. C., Dias, M. M., Campolina, D., Amaral, C. F. S., Diniz, C. R. (1994). ELISA for the detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus*. *Toxicon* **32**:1649-1656.
- Chavez-Olortegui C., Kalapothakis E., Ferreira A. M., Ferreira A. P and Diniz C. R. (1997) Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* **35**: 213-221.
- Chérifi F. (2004). Etude pharmacologique et biodistribution du venin de *Cerastes cerastes* dans les différents compartiments tissulaires de la souris envenimée. *Thèse de Magister, HSTHB, Alger*. P 125-135.
- Chippaux, J.P., Goyffon, M. (1997). Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* **36** (6): 823-846.
- De Faria L., Antunes, bon C. et Lobo De Araujo A. (2001). Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* venom. *Toxicon* **39**: 825-830.
- D'Suze G., Monceda S., Gonzalez C., Sevcik C., Aguilar V and Alagon A. (2003) Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. *Toxicon* **41**: 367-375.
- Fukuhara Y. D. M., Reis M. L., Dellalibera-Joviliani R., Cunha F. Q. C and Donadi E. A. (2003) Increased levels of IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon* **41**: 49-55.

- Hammoudi, D., Laraba-Djebari, F. (2003). Application du test ELISA pour la quantification du venin d'*Androctonus australis hector* dans les sérums de personnes et rats envenimés avant et après immunothérapie. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **96** (4) : 297-301.
- Heinrich C. P., Castell J. V and Andus T. (1990) Intrleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* **265**: 621-636.
- Ickowicz M., Shulov A. et Naor D. (1996). The effect of *Vipera palestina* venom on the thymus, lymph nodes and kidneys. *Toxicon* **3**: 305-306.
- Krifi, M.N., Miled, K., Abderrezek, M., El-Ayeb, M. (2002). Effects of antivenom on *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion venom pharmacokinetics: Towards an optimization of antivenom immunotherapy in a rabbit model. *Toxicon* **40**: 811-819.
- Laraba-Djebari, F. (1984). Contribution à l'étude structurale et biochimique de la phospholipase A₂ du venin de la vipère *Cerastes cerastes*. *Thèse de Magister, USTHB, Alger.* 72 p.
- Laraba-Djebari, F., Martin-Eauclaire, M. F. (1990). Purification and characterization of PLA₂ from *Cerastes cerastes* (Horned viper) snake venom. *Toxicon* **34**(23): 145-146.
- Laraba-Djebari, F., Martin-Eauclaire, M. F., Marchot, P. (1992). A fibrinogen-clotting serine proteinase from *Cerastes cerastes* (Horned viper) venom with arginine-esterase and amidase activities, Purification - characterization and kinetic parameter determination. *Toxicon* **30** (11): 1399-1410.
- Laraba-Djebari, F, et Martin-Eauclaire, M. F., Maucco, G., Marchot. P. (1995). Afaâcytin an α β -fibrinogenase from *Cerastes cerastes* (Horned viper) venom, activates purified factor X and induces serotonin release from human blood platelets. *Eur. J. Biochem* **233** : 756-765.
- Laraba-Djebari, F., Hammoudi, D. (1998). Utilisation de la fraction toxique majoritaire isolée à partir du venin d'*Androctonus australis hector* dans la valorisation du sérum antiscorpionique. *Archives de l'Inst. Pasteur d'Algérie*, **T62**: 254-266.
- Revelo, M.P., Bambierra, E. A., Ferreira. A. P., Diniz, C.R., Chavez-Olortegui, C. (1996). Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion and effects of scorpion antivenom. *Toxicon* **34**: 1119-1125.
- Selvanayagam, Z., Gnanavendhan, S.G., Ganch, K. A., Rajagopal, D., Subba rao, P.V. (1999). ELISA for the detection of venoms from four medically important snakes of India. *Toxicon* **37**: 757-770.
- Silamut, S. M., Parker, C.G., Lollar, P. (1990). Differential proteolytic activation of factor VIII-von Willebrand factor complex by thrombin. *Porc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 6508-6512.
- Soe-Soe., Than-Than., Khin-Ei-Han. (1990). The nephrotoxic action of Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. *Toxicon* **28** (5): 461-467.
- Theakston, R. D. G. (1996). Snake bite: The kinetics of envenoming and therapy. *Eds C. Bon and M. Goyffon. Envenoming and their treatments. Fondation Marcel Merieux.*

- Thernynck I., Avrameas S. (1991). Techniques immunoenzymatiques. Edition SNSERM. P 108.