

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
HOUARI BOUMEDIENNE
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Thèse de Doctorat en Sciences

Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur

EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Biotechnologie et Santé

Par : CHELGHOUM Hayet

Sujet :

Etude de l'activité cytotoxique du venin de *Cerastes cerastes* et de ses constituants peptidiques : caractérisation des mécanismes impliqués

Soutenue publiquement, le 03/ 10/ 2018, devant le jury composé de:

M ^{me} TOUIL-BOUKOFFA Chafia	Prof. à l'USTHB	Présidente
M ^{me} LARABA-DJEBARI Fatima	Prof. à l'USTHB	Directrice de Thèse
M. OUMOUNA Mustapha	Prof. à l'UYFM, Médéa	Examinateur
M ^{me} AIT YOUNES Sonia	Prof. à l'Univ. Alger1	Examinatrice
M ^{me} OUSSEDIK-OUMEHDI Habiba	Prof. à l'USTHB	Examinatrice
M. CHERIFI Fatah (MCA)	Maitre de conférences A à l'USTHB	Examinateur

Année universitaire : 2017/2018

Résumé

La composition des venins de serpents montre une grande complexité et diversité qui est à l'origine d'un profil biochimique et toxicologique variable qui détermine un large éventail de manifestations cliniques. L'envenimation induite par le venin de *Cerastes cerastes* se caractérise par une myonécrose, une hémorragie, un œdème et une atteinte musculaire aiguë.

Cette étude porte sur l'évaluation des mécanismes d'initiation et du développement de la cytotoxicité du venin de *C. cerastes* ou de sa fraction peptidique. Afin de caractériser la cytotoxicité induite *in vivo* par le venin, des inhibiteurs de la NOS (L-NAME), de la COX 2 (Celecoxib), un antagoniste des récepteurs minéralocorticoïdes (Spironolactone) ainsi que la vitamine C ont été préalablement injectés. L'évaluation *in vitro* de la cytotoxicité, quant à elle a été réalisée sur un foie isolé, sur des PBMC humaines et sur des hépatocytes murins isolés.

Les résultats obtenus ont montré une importante infiltration cellulaire caractérisée par une augmentation significative des activités de la myéloperoxydase (MPO) et de l'éosinophile peroxydase (EPO). Ces résultats montrent également une importante activité oxydante du venin de *C. cerastes* et de sa fraction peptidique caractérisée par des taux élevés de nitrites résiduels et de peroxydation lipidique associés à une diminution significative de l'activité de la catalase et du taux du glutathion dans les sérums et les tissus. Ces résultats suggèrent l'implication de la NOS, de la COX et des récepteurs minéralocorticoïdes dans l'induction de l'inflammation et du stress oxydatif par le venin de *Cerastes cerastes*. La cytotoxicité *in vitro* du venin de *C. cerastes* semble être dose-dépendante. Le déséquilibre de la balance redox n'est cependant observé qu'à des doses élevées de venin.

Le venin de *Cerastes cerastes* semble avoir un effet cytotoxique direct sur les cellules et les tissus en altérant l'intégrité de la membrane, provoquant ainsi une fuite du contenu cellulaire. Cet effet cytotoxique peut conduire indirectement à une réponse inflammatoire accompagnée par un stress oxydatif. Il semble qu'un traitement précoce avec des anti-inflammatoires, des antioxydants et des antagonistes des récepteurs minéralocorticoïdes pourrait être utile pour la prise en charge des victimes envenimées.

Mots-clés : Venin, *Cerastes cerastes*, Réponse inflammatoire, Stress oxydatif, Cytotoxicité, Fraction peptidique, NOS, COX, Récepteurs minéralocorticoïdes.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB.

Tout d'abord, j'aimerais remercier le bon dieu le miséricordieux de m'avoir donné la force, le courage et la volonté pour réaliser ce travail.

Je tiens à remercier vivement **Professeur LARABA-DJEBARI Fatima**, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant la direction scientifique de mes travaux. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de sa grande compétence, de sa rigueur intellectuelle, de son dynamisme, et de son efficacité certaine que je n'oublierai jamais. Soyez assurée de mon attachement et de ma profonde gratitude.

J'exprime ensuite mon estime et mes remerciements aux membres de mon jury :

Pr TOUIL-BOUKOFFA Chafia ; étudiante en graduation puis en poste-graduation, j'étais très sensible à la chaleur de votre accueil et à votre humour et à la richesse de votre enseignement. Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver ici mes plus respectueux remerciements et l'expression de ma grande admiration.

Je suis très honoré à remercier **Monsieur Pr. OUMOUNA Mustapha**, de la faculté des sciences, à l'université de Médéa, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être membre de mon jury de thèse. Vous avez guidé mes premiers pas à l'université de blida avec bienveillance. Je tiens à vous assurer de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt que vous portez à ce travail.

Pr. AIT-YOUNES Sonia, est aussi chaleureusement remerciée pour avoir accepté de faire partie de ce jury, pour l'intérêt qu'elle a manifesté à l'égard de ma thèse. Qu'elle soit assurée de ma vive reconnaissance.

J'adresse aussi mes remerciements au **Pr. OUSSEDIK-OUMEHDI Habiba**, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail. Qu'elle soit assurée de ma vive reconnaissance. Sa rigueur scientifique et sa gentillesse seront toujours une référence pour moi.

Dr. CHERIF Fatah, je voudrais vous remercier pour vos conseils constructifs et vos encouragements consécutifs et pour l'honneur que vous me faites, en acceptant d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici, l'expression de ma sincère gratitude.

Mes sincères remerciements vont aussi à **ma mère**, mes sœurs, mes frères, mes beaux-frères, mes neveux et Nadia (CCU) qui, avec cette question récurrente, « **quand est-ce que tu vas soutenir ?** », bien qu'angoissante, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final.

Je remercie très chaleureusement mon mari, **Mohamed**, pour sa grande patience, son encouragement et surtout pour son soutien moral ininterrompu et ses nombreux conseils tout le long de la préparation de cette thèse

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pendant l'élaboration de ma thèse et à tous les membres de l'équipe « Biochimie des biomolécules : mode d'action, immunothérapie et immunodiagnostic » LBCM, FSB, USTHB. Je remercie plus spécialement : *Amina, Hadjer, Imène, Nadja, Samia et Wafa.*

Mes remerciements s'adressent également à tous mes collègues à l'université Saad Dahlab de BLIDA, plus spécialement *Atika.*

Un grand Merci aux personnes qui ont cru en moi et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je dédie ce travail à toute ma famille ; ma mère, mes enfants Anes et Adem, mon marie, mes frères, mes sœurs, celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse.

A la mémoire de mon père ...

Sommaire

Introduction

1	Rappels bibliographiques	4
1.1	Venins de serpents	4
1.1.1	Enzymes des venins de serpents	4
1.1.1.1	Phospholipases A ₂	4
1.1.1.2	Protéinases	6
1.1.1.3	Hyaluronidase	12
1.1.1.4	L-amino-acide oxydase	12
1.1.1.5	Phosphoestérases	14
1.1.1.6	Acétylcholinestérases	14
1.1.2	Protéines non enzymatiques des venins de serpents	14
1.1.2.1	Neurotoxines	15
1.1.2.2	Cytotoxines	17
1.1.2.3	Myotoxines	17
1.1.2.4	Sarafotoxines	18
1.1.2.5	Désintégrines	18
1.2	Physiopathologie de l'envenimation ophidienne	19
1.2.1	Domages tissulaires locaux	21
1.2.1.1	Inflammation	21
1.2.1.2	Myotoxicité	21
1.2.1.3	Hémorragie locale	23
1.2.1.4	Hydrolyse des composants de la matrice extracellulaire	23
1.2.1.5	Dérmonécrose	23
1.2.2	Effets systémiques	23
1.2.2.1	Troubles cardiovasculaires et hémostatiques	23
1.2.2.2	Lésions rénales aiguës	25
1.3	Réponse inflammatoire	25
1.3.1	Phase vasculaire	29
1.3.2	Phase cellulaire	29
1.3.3	Phase de réparation	29
1.4	Stress oxydant	30

1.5	Récepteurs minéralo-corticoïdes (RM)	33
2	Matériel et méthodes	37
2.1	Matériel	37
2.1.1	Matériel biologique	37
2.1.1.1	Venin de <i>Cerastes cerastes</i>	37
2.1.1.2	Fractions F3 et D3	37
2.1.1.3	Animaux	37
2.1.2	Matériel non biologique	37
2.2	Méthodes	38
2.2.1	Etude <i>in vivo</i> de la cytotoxicité	38
2.2.1.1	Evaluation de la cinétique de l'inflammation et du stress oxydatif induits <i>in vivo</i> par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	38
2.2.1.2	Caractérisation pharmacologique de la cytotoxicité induite <i>in vivo</i> par le venin de <i>C. cerastes</i>	38
2.2.1.3	Etude de la cytotoxicité de la fraction hautement toxique D3	39
2.2.2	Etude <i>in vitro</i> de la cytotoxicité	39
2.2.2.1	Isolement et culture du foie	39
2.2.2.2	Isolement et culture des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) humaines	40
2.2.2.3	Isolement et culture des hépatocytes	40
2.2.3	Evaluation de l'infiltration des cellules inflammatoires	41
2.2.3.1	Evaluation de l'activité de l'éosinophile-péroxydase	41
2.2.3.2	Evaluation de l'activité de la myéloperoxydase	41
2.2.4	Etude de la balance oxydative	41
2.2.4.1	Evaluation des biomarqueurs pro-oxydants	41
2.2.4.2	Evaluation des biomarqueurs antioxydants	42
2.2.5	Analyse histologique	43
2.2.6	Analyse spectrale UV-visible de la fraction D3	43
2.2.7	Analyse statistique	43
3	Résultats et discussion	44
3.1	Evaluation <i>in vivo</i> de la cytotoxicité induite par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	44
3.1.1	Infiltration des cellules inflammatoires induite par le venin de <i>C. cerastes</i>	44
3.1.2	Déséquilibre redox induit par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	47
3.1.3	Effet du venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur le myocarde et les parenchymes pulmonaire, rénal et hépatique	52

3.2	Caractérisation pharmacologique de la cytotoxicité, de l'inflammation et du stress oxydatif induits par le venin de <i>C. cerastes</i>	54
3.2.1	Evaluation de l'implication des récepteurs minéralocorticoïdes dans la cytotoxicité, l'inflammation et le stress oxydatif induits par le venin de <i>C. cerastes</i>	54
3.2.1.1	Evaluation de l'implication des récepteurs minéralocorticoïdes dans la cytotoxicité induite par le venin de <i>C. cerastes</i>	54
3.2.1.2	Evaluation de l'implication des récepteurs minéralocorticoïdes dans l'inflammation induite par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	56
3.2.1.3	Evaluation de l'implication des récepteurs minéralocorticoïdes dans le stress oxydatif induit par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	59
3.2.1.4	Evaluation de l'effet de la spironolactone sur les altérations tissulaires induites par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	62
3.2.2	Evaluation de l'implication de la Cyclo-oxygénase 2 dans la cytotoxicité, l'inflammation et le stress oxydatif induits par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	64
3.2.2.1	Evaluation de l'implication de la Cyclo-oxygénase 2 dans la cytotoxicité induite par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	64
3.2.2.2	Evaluation de l'implication de la Cyclo-oxygénase 2 dans l'inflammation induite par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	64
3.2.2.3	Evaluation de l'implication de la Cyclo-oxygénase 2 dans le stress oxydatif induit par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	66
3.2.2.4	Evaluation de l'effet du celecoxib sur les altérations tissulaires induites par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	70
3.2.3	Evaluation de l'implication de la NO synthase dans la cytotoxicité, l'inflammation et le stress oxydatif induits par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	73
3.2.3.1	Evaluation de l'implication de la NO synthase dans la cytotoxicité induite par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	73
3.2.3.2	Evaluation de l'implication de la NO synthase dans l'inflammation induite par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	73
3.2.3.3	Evaluation de l'implication de la NO synthase dans le stress oxydatif induit par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	75
3.2.3.4	Evaluation de l'effet du L-NAME sur les altérations tissulaires induites par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	80
3.2.4	Evaluation de l'effet de la vitamine C sur la cytotoxicité, l'inflammation et le stress oxydatif induits par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	81
3.2.4.1	Evaluation de l'effet de la vitamine C sur la cytotoxicité induite par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	81
3.2.4.2	Evaluation de l'effet de la vitamine C sur l'inflammation induite par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	84
3.2.4.3	Evaluation de l'effet de la vitamine C sur le stress oxydatif induit par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	87

3.2.4.4	Evaluation de l'effet de la vitamine C sur les altérations tissulaires induites par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	90
3.3	Etude de la cytotoxicité de la fraction peptidique hautement toxique D3.....	92
3.3.1	Analyse spectrale UV-visible de la fraction D3.....	92
3.3.2	Evaluation <i>in vivo</i> de la cytotoxicité de la fraction peptidique D3	92
3.3.2.1	Infiltration des cellules inflammatoires induite par la fraction peptidique D3.....	92
3.3.2.2	Déséquilibre redox induit par la fraction peptidique D3	95
3.4	Evaluation <i>in vitro</i> de la cytotoxicité induite par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	95
3.4.1	Effet du venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur le foie isolé.....	95
3.4.2	Effet cytotoxique du venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur des PBMC humaines.....	99
3.4.3	Effet cytotoxique du venin de <i>C. cerastes</i> sur des hépatocytes murins isolés .	101
	Discussion générale	104
	Conclusion et perspectives	108
	Références bibliographiques	109

Liste des tableaux

Tableau I: Quelques PLA2 isolées à partir du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	6
Tableau II : Différentes métalloprotéinases purifiées à partir du venin de <i>Cerastes cerastes</i> .	9
Tableau III : Différentes sérines protéinases purifiées à partir du venin de <i>Cerastes cerastes</i> .	10
Tableau IV : Différentes L-amino-acide oxydases purifiées à partir du venin de <i>Cerastes cerastes</i> .	13
Tableau V: Activités toxiques des principales familles de protéines des venins de serpents	19

Liste des figures

Figure 1: Organisation structurale des différentes classes de métalloprotéinases de serpents.	7
Figure 2: Schéma représentant les voies de biosynthèse des métalloprotéinases	8
Figure 3 : Schéma des sites d'action des SVSPs et des voies physiologiques de coagulation, fibrinolytique et de l'agrégation plaquettaire.	11
Figure 4: Diversité des cibles pharmacologiques des neurotoxines présentes dans les venins	16
Figure 5: Taux de toxines dans le venin des <i>Viperidae</i> et des <i>Elapidae</i>	20
Figure 6 : Dommages tissulaires induits localement par les venins de serpents	22
Figure 7 : Différences structurales et fonctionnelles entre les métalloprotéinases de venins de serpents SVMPs P-I et P-III	24
Figure 8 : Pathogénèse de l'hémorragie systémique induite par les molécules des venins de serpents.	26
Figure 9 : Facteurs impliqués dans le choc cardiovasculaire caractéristique des envenimations sévères.	27
Figure 10 : Action des toxines de venins de serpents sur différents systèmes du corps Humain.	28
Figure 11: Différentes espèces réactives de l'oxygéné (ERO) et action des antioxydants régulateurs de leur production.	32
Figure 12 : Effets bénéfiques de l'antagonisme des récepteurs minéralocorticoïdes (MR) dans différentes pathologies.	36
Figure 13: Effet d'une DL50 du venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur l'activité enzymatique de l'éosinophile peroxydase.	45
Figure 14: Effet d'une DL50 du venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur l'activité enzymatique de la myéloperoxydase.	46
Figure 15: Effet d'une DL50 de venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur le taux des nitrites résiduels.	48
Figure 16: Effet d'une DL50 de venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur le taux de malondialdéhyde.	49
Figure 17: Effet d'une DL50 du venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur l'activité enzymatique de la catalase.	50

Figure 18 : Effet d'une DL50 de venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur le taux de glutathion réduit.	51
Figure 19 : Altérations histologiques induites par le venin de <i>Cerastes cerastes</i> au niveau du myocarde et des parenchymes hépatique, pulmonaire et rénal	53
Figure 20 : Evaluation de l'effet de la spironolactone sur la toxicité induite <i>in vivo</i> par le venin de <i>Cerastes cerastes</i> .	55
Figure 21 : Evaluation au niveau sérique de l'effet de la spironolactone sur l'activation des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles par le venin de <i>Cerastes cerastes</i> .	57
Figure 22 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet de la spironolactone sur l'inflammation induite par le venin de <i>Cerastes cerastes</i> .	58
Figure 23 : Evaluation au niveau sérique de l'effet de la spironolactone sur le stress oxydatif induit par le venin de <i>Cerastes cerastes</i> .	60
Figure 24 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet de la spironolactone sur le stress oxydatif induit par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	61
Figure 25 : Evaluation de l'effet de la spironolactone sur les altérations tissulaires induites par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	63
Figure 26 : Evaluation de l'effet de celecoxib sur la toxicité induite <i>in vivo</i> par le venin de <i>Cerastes cerastes</i> .	65
Figure 27 : Evaluation au niveau sérique de l'effet du celecoxib sur l'activation des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	67
Figure 28 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet du celecoxib sur l'inflammation induite par le venin de <i>Cerastes cerastes</i> .	68
Figure 29 : Evaluation au niveau sérique de l'effet du celecoxib sur le stress oxydatif induit par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	69
Figure 30 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet du celecoxib sur le stress oxydatif induit par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	71
Figure 31 : Evaluation de l'effet du celecoxib sur les altérations tissulaires induites par le venin de <i>Cerastes cerastes</i> .	72
Figure 32 : Evaluation de l'effet du L-NAME sur la toxicité induite <i>in vivo</i> par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	74
Figure 33 : Evaluation au niveau sérique de l'effet du L-NAME sur l'activation des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles par le venin de <i>Cerastes cerastes</i> .	76

Figure 34 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet du L-NAME sur l'inflammation induite par le venin de <i>Cerastes cerastes</i> .	77
Figure 35 : Evaluation au niveau sérique de l'effet du L-NAME sur le stress oxydatif induit par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	78
Figure 36 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet du L-NAME sur le stress oxydatif induit par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	79
Figure 37 : Evaluation de l'effet du L-NAME sur les altérations tissulaires induites par le venin de <i>Cerastes cerastes</i> .	82
Figure 38 : Evaluation de l'effet de la vitamine C sur la toxicité induite <i>in vivo</i> par le venin de <i>Cerastes cerastes</i> .	83
Figure 39 : Evaluation au niveau sérique de l'effet de la vitamine C sur l'activation des polynucléaires neutrophiles et eosinophiles par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	85
Figure 40 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet de la vitamine C sur l'inflammation induite par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	86
Figure 41 : Evaluation au niveau sérique de l'effet de la vitamine C sur le stress oxydatif induit par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	88
Figure 42 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet de la vitamine C sur le stress oxydatif induit par le venin de <i>Cerastes cerastes</i>	89
Figure 43 : Evaluation de l'effet de la vitamine C sur les altérations tissulaires induites par le venin de <i>Cerastes cerastes</i> .	91
Figure 44 : Analyse spectrale de la fraction D3	93
Figure 45 : Réponse inflammatoire induite par la fraction D3	94
Figure 46 : Evaluation des biomarqueurs pro-oxydants après administration de la fraction D3	96
Figure 47 : Evaluation des biomarqueurs antioxydants après administration de la fraction D3	97
Figure 48 : Effets du venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur le foie isolé	98
Figure 49 : Effets du venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur les PBMC	100
Figure 50 : Effets du venin de <i>Cerastes cerastes</i> sur les hépatocytes murins.	102

Liste des abréviations

COX : Cyclooxygénase
DL50 : Dose Létale 50
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMH : Dose Minimale Hémorragique
DMN : Dose Minimale Nécrotique
EPO : Eosinophile Peroxydase
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
FAD: Flavine Adenine Dinucléotide
FMN: Flavine Mononucleotide
GSH : Glutathion S-H
IC50 : Inhibitrice Concentration 50
LAAO : L-Amino Acides Oxydases
LDH : Lactate Déshydrogénase
MDA : Malondialdhyde
MEC : Matrice Extracellulaire
MM : Masse Moléculaire
MPO : Myéloperoxydase
NO : Nitric Oxide
NOS : NO synthase
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAF : Platelet Activating Factor
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS : Phosphate Buffer Solution
PGE2 : Prostaglandine E2
PLA2 : Phospholipases A₂
PN : Polynucléaire Neutrophile
RG : Récepteur des Glucocorticoïdes
RM : Récepteurs Minéralocorticoïdes
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
SVF : Sérum du Veau Fœtal
SVMP : Snake Venom Metalloproteases
TNF- α : Tumoral Necrosis Factor alpha
UDO : Unité de Densité Optique

Introduction

Introduction

Les envenimations ophidiennes sont accidentelles et constituent une urgence médicochirurgicale. Chaque année dans le monde, les envenimations ophidiennes touchent jusqu'à 1,8 à 2,7 millions de personnes et causent de 81410 à 137880 de décès et laissent jusqu'à 400 000 de victimes avec des séquelles fonctionnelles graves et permanentes (Chippaux, 1998; Kasturiratne *et al.*, 2008; Kasturiratne *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2017). Les données épidémiologiques restent très réduites car les personnes mordues ne se déplacent pas toujours vers les centres de santé (Gutiérrez *et al.*, 2017). L'envenimation ophidiennes est actuellement reconnues par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en tant que maladies tropicales négligées, elle développe une stratégie visant à réduire les blessures et les décès causés par l'envenimation et à améliorer la prise en charge des victimes (Chippaux, 2017).

Les venins de serpents sont composés d'enzymes telles que les phospholipases A₂ (PLA₂), les métalloprotéases (SVMP), les serines-protéinases et les L-aminoacides oxydases (LAAO), qui induisent des effets physiopathologiques tels que l'inflammation, la myotoxicité, l'hémorragie, la coagulation, l'œdème, la cytotoxicité, la génotoxicité et l'apoptose cellulaire. Les composants du venin peuvent agir de façon directe au niveau du site de morsure, la participation des médiateurs endogènes contribue également à l'induction des lésions tissulaires (Voronov *et al.*, 1999). Ces médiateurs sont produits en réponse à plusieurs stimulus inflammatoires qui pourraient être le lien entre le stress oxydatif et l'inflammation (Caimi *et al.*, 2008).

La réponse inflammatoire ; induite lors des envenimations ophidiennes; est responsable de l'évolution des altérations tissulaires par la génération excessive de médiateurs pro-inflammatoires (Laraba-Djebari et Chérifi, 2014). Le statut redox joue un rôle central dans le contrôle de la fonction des cellules immunitaires. Il s'agit non seulement du maintien de l'intégrité et de la fonctionnalité des lipides membranaires, des protéines cellulaires et des acides nucléiques, mais aussi du contrôle de la transduction du signal et de l'expression des gènes dans les cellules immunitaires (Petricevich, 2010).

Le stress oxydatif est généralement défini comme un déséquilibre entre les médiateurs oxydants et antioxydants dans les cellules et les tissus. Le déséquilibre redox entraîne la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) toxiques, y compris les radicaux superoxydes et hydroxyles (Nanda *et al.*, 2007). La génération excessive de ERO lors de l'envenimation par les venins de serpents permet la libération des dérivés de la peroxydation

lipidique conduisant à des lésions cellulaires (Adibhatla et al., 2003). Plusieurs études rapportent le rôle du stress oxydatif dans le développement des pathologies chroniques, les altérations dues au stress oxydatif seraient impliquées dans l'initiation ou dans l'évolution de nombreux désordres métaboliques et tissulaires (Lykkesfeldt et Svendsen, 2007). L'aldostérone, le ligand naturel de récepteurs minéralo-corticoïdes, est produit également par les cellules immunitaires infiltrées et regroupées dans les tissus endommagés. L'hyperproduction de l'aldostérone induit des dommages tissulaires et une augmentation de l'expression de plusieurs gènes associés au stress oxydatif (Chadwick et al., 2015; Chadwick et al., 2016b).

La connaissance de la composition du venin de *Cerastes cerastes*, ainsi que celle des effets provoqués par ses constituants, est utile pour une meilleure prise en charge des victimes de morsures. L'étude des molécules non enzymatiques a élargi non seulement la compréhension de la toxicité des venins de serpent mais également la compréhension des relations structure-fonction des protéines. Dans de nombreux cas, leur caractérisation a conduit au développement de puissants outils de recherche, de techniques de diagnostic et de médicaments pharmaceutiques (McCleary et Kini, 2013).

Les composés naturels peuvent représenter un adjuvant précieux à l'immunothérapie utilisée dans les cas de morsures de serpents, en vue d'atténuer les effets locaux et systémique de l'envenimation (Oliveira et al., 2016). L'investigation de la relation entre l'apport en vitamines et la gravité de l'envenimation ainsi que l'interaction entre les vitamines et les molécules enzymatiques des venins de serpents semblent être nécessaire car les vitamines sont des molécules étroitement liées à la performance des fonctions enzymatiques que ce soit des enzymes endogènes présentes dans les organismes ou bien des composants enzymatiques, telles que les phospholipases et les protéases présentes dans les venins de serpents

La présente étude est focalisée sur la cytotoxicité du venin de *Cerastes cerastes*, elle comporte quatre principaux volets : i) L'évaluation *in vivo* de la cytotoxicité du venin par détermination de la cinétique de l'inflammation et de stress oxydant dans les différents organes (cœur, poumons, reins et foie). Cette cinétique a été confirmée par l'étude de la cytotoxicité de la fraction peptidique non enzymatique de faible poids moléculaire du venin et par la culture *in vitro* du foie isolé en absence et en présence du venin. ii) La caractérisation des mécanismes impliqués dans la cytotoxicité du venin et la détermination de la relation entre la cytotoxicité, l'inflammation et le stress oxydant. iii) La mise en évidence de l'implication des récepteurs minéralocorticoïdes dans la cytotoxicité, l'inflammation et le

stress oxydant induits par le venin de *C. cerastes*. iv) L'évaluation des effets toxiques direct et indirect du venin et détermination de l'origine du stress oxydant (cellules inflammatoires ou non inflammatoires) par l'évaluation *in vitro* de la cytotoxicité du venin sur les cellules mononucléaires humaines du sang périphérique (PBMC) et des hépatocytes murins.

Afin de réaliser ce travail, une étude de la cytotoxicité *in vivo* a été entreprise en injectant une dose équivalente à une DL50 du venin de *Cerastes cerastes* par voie intrapéritonéale en absence et en présence d'inhibiteurs de la COX2 (celecoxib), de la NOS (L-NAME), de l'antagoniste des récepteurs minéralo-corticoïdes (spironolactone) ainsi que la vitamine C. L'étude du processus inflammatoire a été évaluée par l'identification des populations cellulaires infiltrées au niveau tissulaire (cœur, poumon, rein et foie). Le statut oxydatif est aussi abordé par l'évaluation des taux du monoxyde d'azote (NO), du malondialdhyde (MDA), du glutathion réduit (GSH) et par estimation de l'activité de la catalase. Cette étude a été complétée par une analyse histologique des différents tissus.

L'étude entreprise *in vitro* sur l'effet cytotoxique de venin de *C. cerastes* a été évaluée par estimation de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) et des paramètres pro et anti-oxydants.

Rappels bibliographiques

1 Rappels bibliographiques

1.1 Venins de serpents

Les venins des serpents sont produits dans les glandes venimeuses issues de l'évolution des glandes salivaires labiales vers une fonction venimeuse. Les produits de sécrétion s'accumulent dans les canaux de ces glandes. La quantité de venin dans chaque glande varie entre 15 et 800 mg de produit sec (Oussedik-Oumehdi, 2007).

Les envenimations présentent des tableaux cliniques très divers au vu de la complexité de la composition des venins. La grande majorité des composés toxiques contenus dans les venins de serpents est de nature protéique (90% du poids sec). Les venins de serpents sont riches en enzymes notamment protéolytiques qui exercent une véritable pré-digestion vue que la glande à venin dérive d'une glande salivaire annexe au tube digestif (Chippaux, 2002). En plus des protéines, des substances de faible masse moléculaire de nature peptidique (acides aminés, peptides) et non peptidique (lipides, nucléosides, carbohydrates, le zinc, le magnésium, le fer ou le cobalt) contribuent également aux effets pharmacologiques des venins de serpents (Rivière et Bon, 1999).

1.1.1 Enzymes des venins de serpents

Les venins de serpents contiennent de nombreux enzymes aux spécificités très variées ; jouant un rôle important dans la digestion des proies, en contribuant à l'action toxique du venin et/ou en augmentant les effets pharmacologiques du venin. Il existe six principales catégories d'enzymes : les phospholipases, les protéases, les L-amino acide oxydases, les hyaluronidases, les acétylcholinestérases et les phosphoestérases.

1.1.1.1 Phospholipases A₂

Le pancréas des mammifères et les venins de serpents et d'abeilles constituent la source la plus importante de phospholipases A₂ (PLA₂, EC 3.1.1.4), (Nishida *et al.*, 1985). Les PLA₂ des venins de serpents présentent une masse moléculaire qui varie entre 13 à 18 kDa.

La phospholipase A₂ forme une super famille d'estérases qui hydrolyse spécifiquement la liaison ester d'acyle à la position sn-2 des phospholipides membranaires pour produire de l'acide arachidonique et des lysophospholipides libres (Burke et Dennis, 2009). Cet acide gras libre peut être métabolisé par oxydation par la cyclooxygénase et la lipooxygénase pour produire des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires tels que les

prostaglandines, les thromboxanes, les prostacyclines, les leucotriènes et les lipoxines. L'autre produit de la PLA₂, le lysophospholipide sert de substrat pour la synthèse des facteurs d'activation plaquettaire (Diaz et Arm, 2003). Les précurseurs libérés suite à l'activation des PLA₂ induisent la production de divers intermédiaires lipidiques radicalaires ainsi que la production de radicaux hydroxyle et superoxyde (Mathisen et al., 2007; Kim et al., 2008). Les radicaux libres générés sont impliqués dans la peroxydation des lipides des membranes des organites altérant ainsi la fluidité de la membrane, la perméabilité ionique, l'activité enzymatique membranaire et la signalisation cellulaire (Keller et Mattson, 1998; Uchida et al., 1999; Imai et al., 2000; Blanc et al., 2007; Miguel et al., 2009). Les peroxydes lipidiques et les espèces réactives d'oxygène qui sont générés, par leur capacité à activer la PLA₂, activent encore plus le processus inflammatoire (Adibhatla et Hatcher, 2008; Mohamed et al., 2010).

En plus de leur activité enzymatique, les PLA₂ possèdent des propriétés hémolytiques, en interagissant avec d'autres cibles protéiques (Chippaux, 2002; Faure et Goyffon, 2010). Les effets de cette superfamille sont en effet très variés. Elles agissent à plusieurs niveaux de la coagulation et en particulier sur la transformation de prothrombine en thrombine, l'agrégation plaquettaire, la transmission neuromusculaire, le système cardiovasculaire ainsi qu'au niveau de la réaction inflammatoire (Chippaux, 2002; Koh et al., 2006; Larréché et al., 2008b).

Selon leur origine, leur masse moléculaire, leur homologie de séquence, le nombre de ponts disulfures et leurs effets pathologiques, les PLA₂ sont divisées en 16 groupes, dont six correspondent aux PLA₂ sécrétoires (sPLA₂) (Dennis et al., 2011). Les sPLA₂ de venins sont classés en trois types principaux, le type I (purifié à partir des venins d'*Elapidae* et d'*Hydrophidae*), le type II (purifié à partir des venins de *Crotalidae* et *Viperidae*) et le type III (purifié à partir des venins d'abeilles). Les PLA₂ de type II peuvent être subdivisés en PLA₂-Asp-49 et PLA₂-Lys-49. La PLA₂-Asp-49 présente une forte activité enzymatique et contient un résidu aspartyl au niveau du site de liaison du calcium, alors que la PLA₂-Lys-49 présente une faible activité enzymatique et contient un résidu lysyl à la position 49 (Ownby et al., 1999; Câmara et al., 2003).

Plusieurs PLA₂ ont été purifiées à partir du venin de *C. cerastes* (Tableau I)

Tableau I: Quelques PLA₂ isolées à partir du venin de *C. cerastes*, modifié de (Cherifi, 2011).

Molécules	Masse moléculaire (kDa)	activités biologiques	Références biologiques
ccl-PLA ₂	14,5	Hémolytique	Djebari et Martin-Eauclaire, 1990
CC-PLA ₂ -1	13,737	Anti-agrégante et anti-tumorale	Zouari-Kessentini et al., 2009
CC-PLA ₂ -2	13,705	Anti-agrégante et anti-tumorale	Zouari-Kessentini et al., 2009
CC2-PLA ₂	13,53	Anti-agrégante et proinflammatoire	Chérifi et al., 2014

1.1.1.2 Protéinases

Les protéinases des venins de serpents représentent un groupe hétérogène de protéines enzymatiques de masse moléculaire variable de 15 à 380 kDa (Wisner et al., 2001). Certaines protéases exercent des effets activateurs ou inhibiteurs sur les mécanismes hémostatiques (Alexander et al., 1988). D'autres agissent de manière non spécifique en hydrolysant les protéines de la matrice extracellulaire (la fibronéctine, le collagène et la laminine) (Labib et al., 1981). Ces enzymes exercent également des activités arginine hydrolase et amidase (Laraba-Djebari et al., 1992). Parmi les protéinases, nous distinguons les métalloprotéinases et les serines protéinases.

1.1.1.2.1 Métalloprotéinases

Les métalloprotéinases des venins de serpents (SVMP) sont organisées en trois classes basées sur la présence ou l'absence de domaines non protéinases tels qu'observés via des transcrits d'ARNm et des protéines isolées à partir du venin. La classe PI contient uniquement un domaine métalloprotéinase ; La classe PII contient le domaine métalloprotéinase et le domaine de désintégrine; et la classe PIII contient un domaine riche en cystéine en plus des deux domaines précédents. Cette classification peut être subdivisée en 11 sous-classes (PIa, PIIa, PIIb, PIIc, PIId, PIIe, DI, PIIIa, PIIIb, PIIIc et PIIId) en fonction des modifications et traitements post-traductionnels (Figures 1 et 2) (Fox et Serrano, 2008). Les métalloprotéinases de venins de serpents (SVMPs) sont un groupe d'enzymes de masses moléculaires variant entre 20 à 100 kDa (Jia et al., 1996).

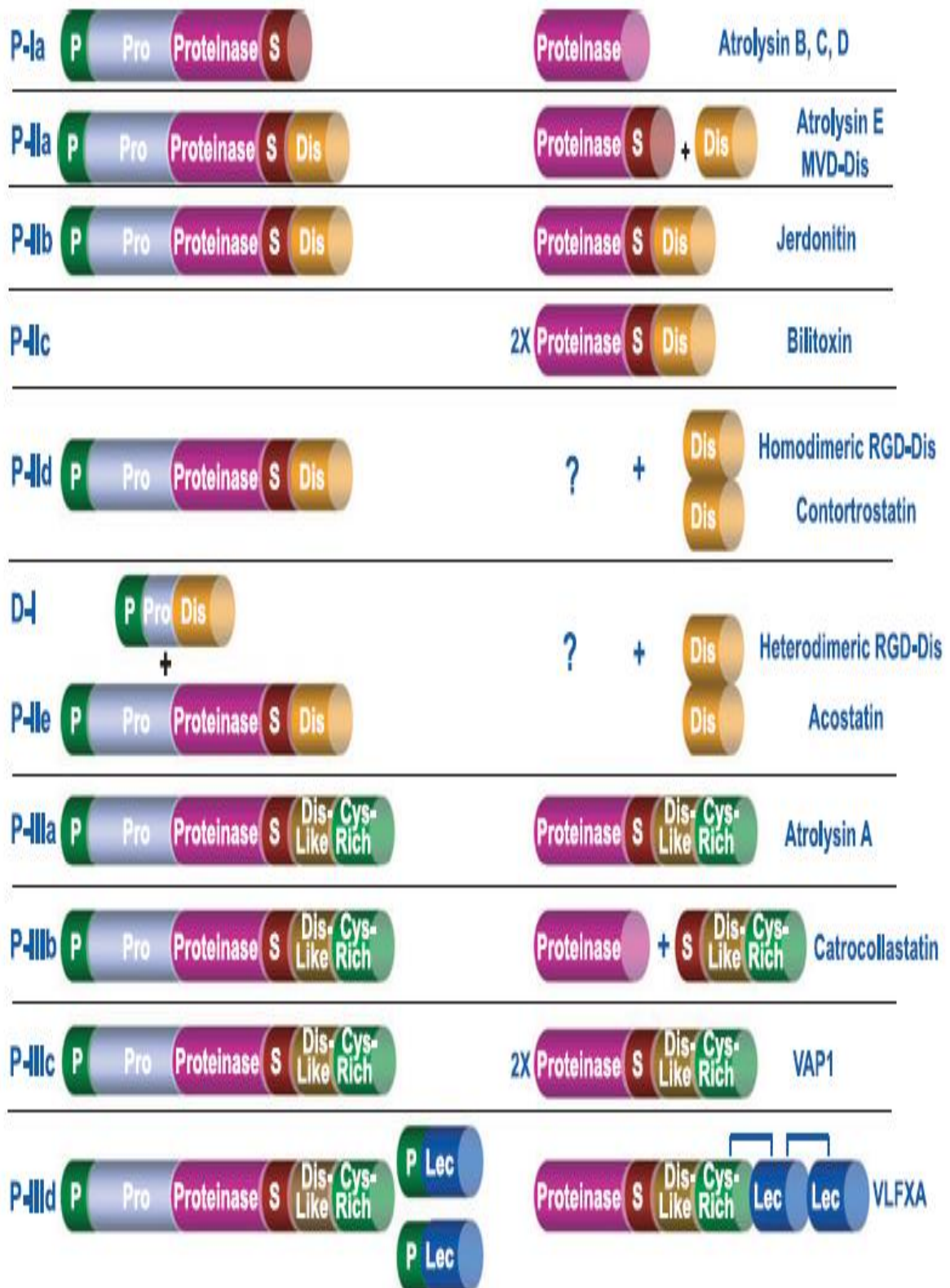


Figure 1 : Organisation structurale des différentes classes de métalloprotéinases de venins de serpents. Les points d'interrogation (?) indiquent que le produit formé n'a pas été identifié dans le venin (Fox et Serrano, 2008).

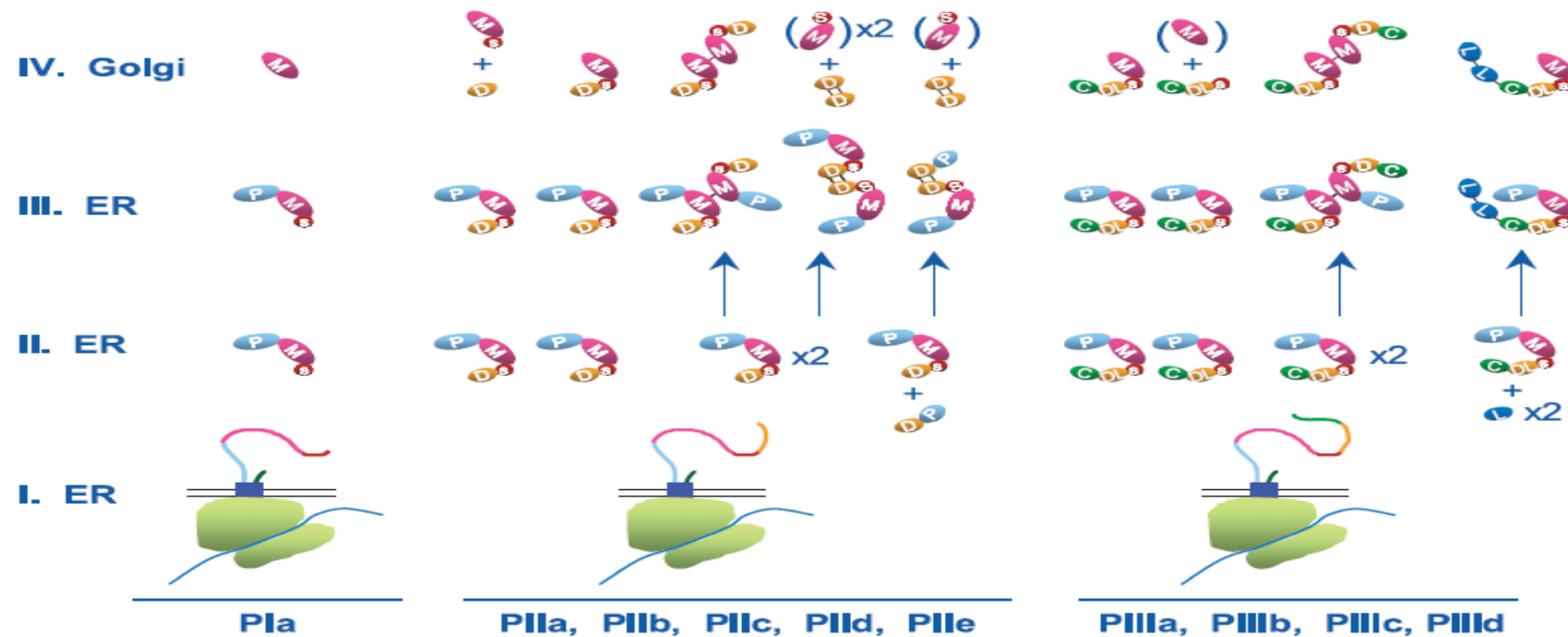


Figure 2: Schéma représentant les voies de biosynthèse des métalloprotéinases. « **Les parenthèses** » sur la figure indiquent que le produit formé n'a pas été observé dans le venin. **P**, prodomaine; **M**, domaine métalloprotéinase; **S**, espaceur; **D**, domaine de désintégration; **DL**, domaine de type désintégrine; **Cys**, domaine riche en cystéine; **L**, domaine de type lectine (Fox et Serrano, 2008).

Les SVMPs de venins de serpents contribuent principalement dans les troubles hémostatiques, y compris l'activité hémorragique et la perturbation protéolytique et non protéolytique des éléments clés de la voie de coagulation. L'activité hémorragique est due à la dégradation protéolytique des composants de la membrane basale par les SVMP hémorragiques (Bjarnason et Fox, 1994; Escalante et al., 2000). Cette activité hémorragique des SVMPs se manifeste localement et s'étend de manière systémique contribuant ainsi au choc cardiovasculaire caractéristique des envenimations sévères (Franceschi et al., 2000).

En plus des troubles hémostatiques liés ou non à la dégradation de plusieurs constituants de la matrice extracellulaire (collagène, protéoglycannes, fibronectine et laminine...), les metalloprotéinases, sont également capables d'induire une cytotoxicité en provoquant des changements dans la forme des cellules et une perte de l'adhérence cellulaire, une myotoxicité, une nécrose tissulaire et une inflammation en induisant un effet oedématisé et la libération des cytokines inflammatoires tels que le TNF α (Gutiérrez et Rucavado, 2000; Wang et Huang, 2002; Tanjoni et al., 2005). Les SVMP semblent être à l'origine de l'effet cytolytique direct des venins de Viperidea qui se traduit par une réaction inflammatoire intense suivie d'une nécrose tissulaire. Cette dernière évolue rapidement en surface et/ou en profondeur et elle est souvent associée à une gangrène (Reid et Theakston., 1984, Oussedik-Oumehdi, 2007). Rucavado et al (2000) rapportent que le Batimastat est plus efficace à inhiber les activités hémorragique, myotoxique, oedématisé, et dermonécrotique induites par le venin de *Bothrops asper*, suggérant une forte implication des SVMP notamment dans la nécrose tissulaire. Plusieurs metalloprotéinases ont été purifiées à partir du venin de *Cerastes cerastes* (Tableau II).

Tableau II : Différentes metalloprotéinases purifiées à partir du venin de *Cerastes cerastes*.

SVMPs (venin de <i>C. cerastes</i>)	MM (kDa)	Activités biologiques	Références bibliographiques
CcH1	25	Hémorragique et protéolytique	Boukhalfa-Abib et al., 2009
CcSV-MPase	70	Acticité β fibrinogénase, dépourvue d'activité hémorragique.	Chérifi et al., 2010
CcMP-II	35	Hémorragique et α -fibrinogénase	Boukhalfa-Abib et Laraba-Djebari, 2015
CcD-II	39,9	Dermonécrotique, fibrinolytique et gélatinase	Ami et al., 2017
Cc HSM-III	66	Hémorragique et proinflammatoire	Tachoua et al., 2017

1.1.1.2.2 Sérines protéinases

Les serine-protéases sont des glycoprotéines de 20 à 100 kDa qui se lient à leur substrat grâce à une serine. Les serine-protéinases ont des séquences d'acides aminés homologues bien qu'elles présentent des spécificités différentes aux substrats. Elles contiennent douze (12) résidus de cystéine impliqués dans la formation de six (6) ponts disulfure, dont un est situé à l'extrémité C-terminale et conservé dans toutes les serine-protéases (Itoh *et al.*, 1987; Parry *et al.*, 1998). Ce groupe d'enzymes est caractérisé par la conservation de la triade catalytique « Ser₁₉₅, His₅₇, Asp₁₀₂ ». Ces enzymes sont considérées comme des enzymes de type trypsine qui hydrolysent les liaisons peptidiques après les résidus Arg ou Lys (Barrett et Rawlings, 1995; Serrano, 2013).

Les serine-protéinases des venins de serpents (SVSPs) forment un groupe de toxines très étudiées, elles affectent principalement le système hémostatique en agissant sur des composants de la cascade de coagulation, sur l'activation du facteur X et V, de la protéine C et du plasminogène, sur les systèmes fibrinolytique et kallikrein – kinine et sur l'agrégation des plaquettes (Figure 3), (Ouyang *et al.*, 1992; Laraba-Djebari *et al.*, 1995; Samel *et al.*, 2002; Serrano, 2013).

Les serine-protéases sont retrouvées principalement dans les venins des serpents terrestres (*Viperidae*, *Crotalidae*, *Elapidae*, et *Colubridae*) et rarement dans les venins de serpents marins (*Hydrophiidae*) (Barrett et Rawlings, 1995; Serrano, 2013). Différentes sérines protéinases ont été purifiées à partir du venin de *Cerastes cerastes* (Tableau III).

Tableau III : Différentes sérines protéinases purifiées à partir du venin de *Cerastes cerastes*. (Tachoua, 2017).

Sérines protéinases	MM (kDa)	Principaux effets	Références Bibliographiques
RP 34	48,5	Activité arginine, estérase, amidase, et α fibrinogénase	Laraba-Djebari <i>et al.</i> , 1992
Afâacytine	40	Activité α et β fibrinogénase	Laraba-Djebari <i>et al.</i> , 1995
Cerastocytine	38	Activité pro-coagulante et activatrice de l'agrégation plaquettaire	Marrakchi <i>et al.</i> , 1997b
Cerastatine	40	Activité estérase, amidase, α fibrinogénase et activateur de l'agrégation plaquettaire	Marrakchi <i>et al.</i> , 1997c
Cerastatine	32	Inhibiteur de l'agrégation Plaquettaire	Marrakchi <i>et al.</i> , 1997a

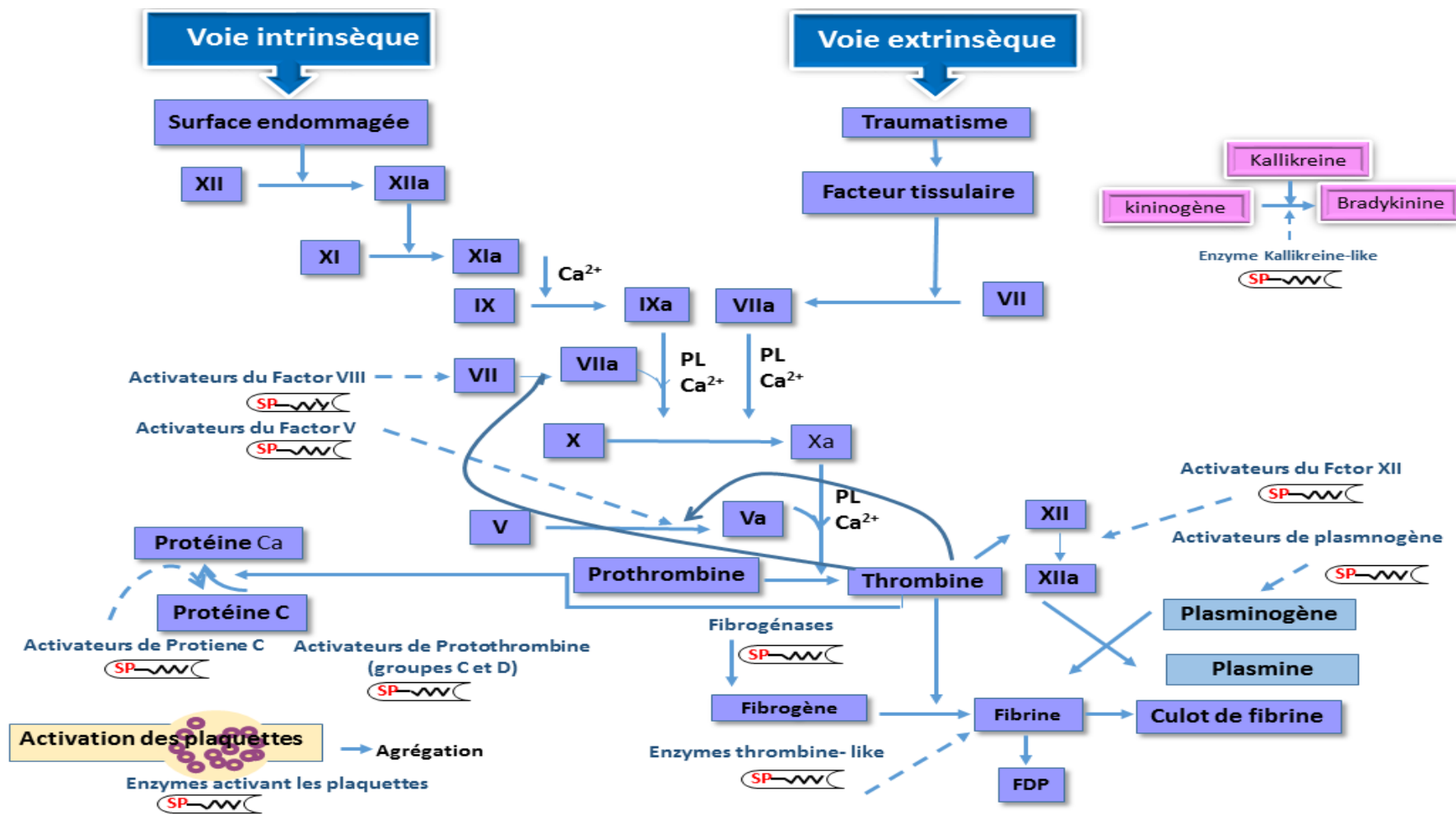


Figure 3 : Schéma des sites d'action des SVSPs et des voies physiologiques de coagulation, fibrinolytique et de l'agrégation plaquettaire (Serrano, 2013). \longrightarrow : activation directe, \dashrightarrow : activation indirecte.

1.1.1.3 Hyaluronidase

Les hyaluronidases constituent un groupe d'enzymes [hyaluronate 4-glycanohydrolase (EC 3.2.1.35, hyaluronoglucosamidase), hyaluronate 3-glycanohydrolase (EC 3.2.1.36, hyaluronoglucuronidase), et hyaluronate lyase (EC 4.2.2.1)] qui catalysent la dégradation de l'hyaluronane, un polysaccharide de poids moléculaire élevé trouvé dans la matrice extracellulaire (MEC), en particulier des tissus conjonctifs mous (El-Safory *et al.*, 2010).

La propriété de propagation de cette enzyme est évidente par sa capacité à promouvoir l'effet hémorragique local de nombreuses toxines isolées à partir de venins de serpents. La dégradation de l'hyaluronane au niveau de la MEC des tissus locaux est présumée être l'événement clé dans le processus de diffusion médié par cette enzyme pendant l'envenimation du serpent. Cette activité entraîne une perte d'intégrité de la MEC dans les tissus conjonctifs mous entourant les vaisseaux sanguins, ce qui favorise la diffusion facile des toxines par voie systémique vers leur (s) site (s) d'action. Les effets de cette enzyme ont été largement méconnus dans les venins de serpents, bien que cette dernière potentialise la toxicité du venin (Girish *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2011).

Deux hyaluronidases ont été purifiées à partir du venin de *Cerastes cerastes*, la première ayant une masse de 75 kDa et une deuxième (CcHaseII) ayant un PM de 33 kDa. la CcHaseII augmente l'activité hémorragique de la métalloprotéinase CcHTI et amplifie l'œdème provoqué par le venin d'une manière dose dépendante (Labib *et al.*, 1979; Wahby *et al.*, 2012).

1.1.1.4 L-amino-acide oxydase

Les L-amino-acide oxydases (LAAO) sont des flavoprotéines capables de catalyser la désamination oxydative stéréospécifique de son substrat (L-amino acide) pour produire les α -cétoacides correspondants ainsi que la libération concomitante de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'ammoniac. Elles utilisent le FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) ou le FMN (Flavine Mononucléotide) comme cofacteurs (Massey et Curti, 1967; Curti, 1992; Zhang *et al.*, 2003; Al-Quraishy *et al.*, 2014). Bien qu'elles apparaissent dans de nombreux organismes différents des invertébrés aux vertébrés, leurs fonctions *in vivo* sont incertaines. La LAAO est largement distribuée dans les venins de serpents, y compris les *Viperidae* et les *Elapidae*, elle contribue à leur cytotoxicité, éventuellement par le H_2O_2 formé à la suite de la réoxydation du cofacteur FAD réduit par l'oxygène moléculaire (Macheroux *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2014). Cette enzyme est la principale composante des venins de serpents, elle représente à elle seule

environ 30% de la teneur totale en protéines chez certaines espèces (Du et Clemetson, 2002; Costa et al., 2014).

Les LAAO des venins de serpents sont des glycoprotéines homodimériques de masse moléculaire variant entre 120 à 150 kDa (Souza et al., 1999; Samel et al., 2006; Toyama et al., 2006). La présence de groupements glycosylés dans la structure de l'enzyme favorise sa fixation à la surface des cellules hôtes et la génération de fortes concentrations en H₂O₂, responsables des dommages oxydatifs qui affectent les cellules cibles (Geyer et al., 2001; Fung et Tan, 2009). Il a été montré que la LAAO du venin est aussi impliquée dans l'induction de la mort cellulaire de plusieurs lignées cellulaires de mammifères et dans l'induction du stress oxydatif (Tempone et al., 2001). Plusieurs L-amino-acide oxydases ont été purifiées à partir du venin de *Cerastes cerastes* (Tableau IV).

Tableau IV : Différentes L-amino-acide oxydases purifiées à partir du venin de *Cerastes cerastes*.

LAAO	Caractérisation biochimique	Références bibliographiques
ccLAAO	60 kDa. pH optimal= 8,0 T° optimale= 20°C Km = 0,06 mmol Vmax = 164 mmol / min.	Ziad-Meziane et Laraba-Djebari, 2014
CC-LAAO	58 kDa (monomère) 115 kDa (forme native). pH optimal= 7,8 T° optimale= 50°C.	Abdelkafi-Koubaa et al., 2014
Cc LAOOI	60, 56 kDa (monomères) 115 kDa (forme native). pH optimal= 7,8 T° optimale= 50°C. Km = 0,67 mM Vmax = 0,135 µmol / min.	El Hakim et al., 2015
Cc-LAOOII	60, 53 kDa (monomères) 115 kDa (forme native). pH optimal= 7 T° optimale = 60 ° C. Km = 0.82 mM Vmax = 0.087 µmol/min.	El Hakim et al., 2015

1.1.1.5 Phosphoestérases

Les phosphoestérases sont des enzymes hydrolytiques ubiquitaires et très répandues dans les venins de serpents. Il s'agit notamment des nucléases, nucléotidases et phosphatases. Leur principale fonction est l'hydrolyse des acides nucléiques (ADN et ARN) générant ainsi l'adénosine qui favorise la biodistribution des toxines du venin, contribue à l'immobilisation des proies, augmente la perméabilité vasculaire, inhibe la libération des neurotransmetteurs et inhibe l'agrégation plaquettaire (Fuentes et al., 2014; Boldrini-França et al., 2017; Saoud, 2017). Une 5'-nucléotidase (Cc 5_NTase) de 70 kDa a été purifiée à partir du venin de *C. cerastes*, elle hydrolyse spécifiquement les nucléotides mono- di- et triphosphate (Saoud et al., 2017).

1.1.1.6 Acétylcholinestérases

Les acétylcholinestérases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline plus acétate, elles sont monomériques, non amphiphiles et inhibent la dépolarisation des plaques motrices (Audebert, 1993).

1.1.2 Protéines non enzymatiques des venins de serpents

Les venins de serpent sont des mélanges complexes de protéines et polypeptides pharmacologiquement actifs. Certaines de ces protéines présentent des propriétés enzymatiques, tandis que d'autres sont considérées comme étant non enzymatique. Ces dernières contribuent à l'immobilisation de la proie. Elles se lient à des récepteurs spécifiques, aux canaux ioniques ou aux protéines plasmatiques et modifient les processus physiologiques de la proie (McCleary et Kini, 2013).

Elles agissent en tant qu'agonistes ou antagonistes et induisent des effets neurotoxique, cardiotoxique et/ou nécrotique. Plusieurs centaines de protéines non-enzymatiques ont été purifiées et caractérisées à partir des venins de serpents durant les dernières décennies (McCleary et Kini, 2013). Ces protéines non enzymatiques sont classées dans plusieurs familles structurales ou fonctionnelles selon leurs séquences en acide aminés, leur structure tridimensionnelle et leur mode d'action. Les protéines non enzymatiques purifiées à partir de venins de serpents sont des neurotoxines, des cytotoxines, des myotoxines, des sarafotoxines et des desintegrines (McCleary et Kini, 2013).

1.1.2.1 Neurotoxines

Les neurotoxines des venins de serpents sont principalement présentes dans les venins des *Elapidae*. Elles sont classées en deux groupes ; les toxines inhibant la transmission synaptique dites inhibitrices et les toxines qui facilitent la transmission synaptique dites facilitatrices.

1.1.2.1.1 Neurotoxines inhibitrices de la transmission synaptique

Les neurotoxines qui inhibent la transmission synaptique présentent une action soit post- ou pré-synaptiques.

Celles qui se fixent sur des récepteurs post-synaptiques sont isolées à partir des venins d'*Elapidae* et d'*Hydrophidae* (Menez, 1993). Elles possèdent une structure dite en « trois doigts » car leur repliement global est caractérisé par la formation de trois boucles. Elles sont composées d'une seule chaîne peptidique dont la rigidité est assurée par des ponts disulfures (McCleary et Kini, 2013). Elles peuvent être séparées en trois groupes, les toxines nicotiques, les toxines muscariniques et une troisième famille de toxines regroupant celles qui ne peuvent pas être classées dans les deux premiers groupes.

Les toxines nicotiques (ou curarisantes) sont constituées d'une chaîne peptidique de 60 à 74 résidus d'acides aminés et une masse moléculaire entre 7 à 8 kDa (Malany et al., 2000). Elles se fixent sélectivement sur les récepteurs post-synaptiques de l'acétylcholine et provoquent un arrêt de la transmission neuromusculaire qui est suivie d'une paralysie des muscles et du diaphragme. Cette action paralysante est due à l'action des toxines sur les membranes des terminaisons axonales qui perdent leur capacité à libérer l'acétylcholine dans les fentes synaptiques (Ménez, 1995; Dixon et Harris, 1999). Les toxines muscariniques représentent une dizaine de peptides de petite taille (65 résidus d'acides aminés, 4 ponts disulfures et une masse moléculaire de 7,5 kDa), (Miyoshi et Tu, 1999). La troisième famille de toxines post-synaptiques inclue les toxines qui ne peuvent pas être classées comme nicotiques ou muscariniques. Elles sont peu nombreuses c'est le cas de la vipoxine 86, isolée à partir du venin de *Daboia russelii* active sur les récepteurs adrénergiques et sans aucune action sur les récepteurs nicotiques et muscariniques (Freedman et Snyder, 1981).

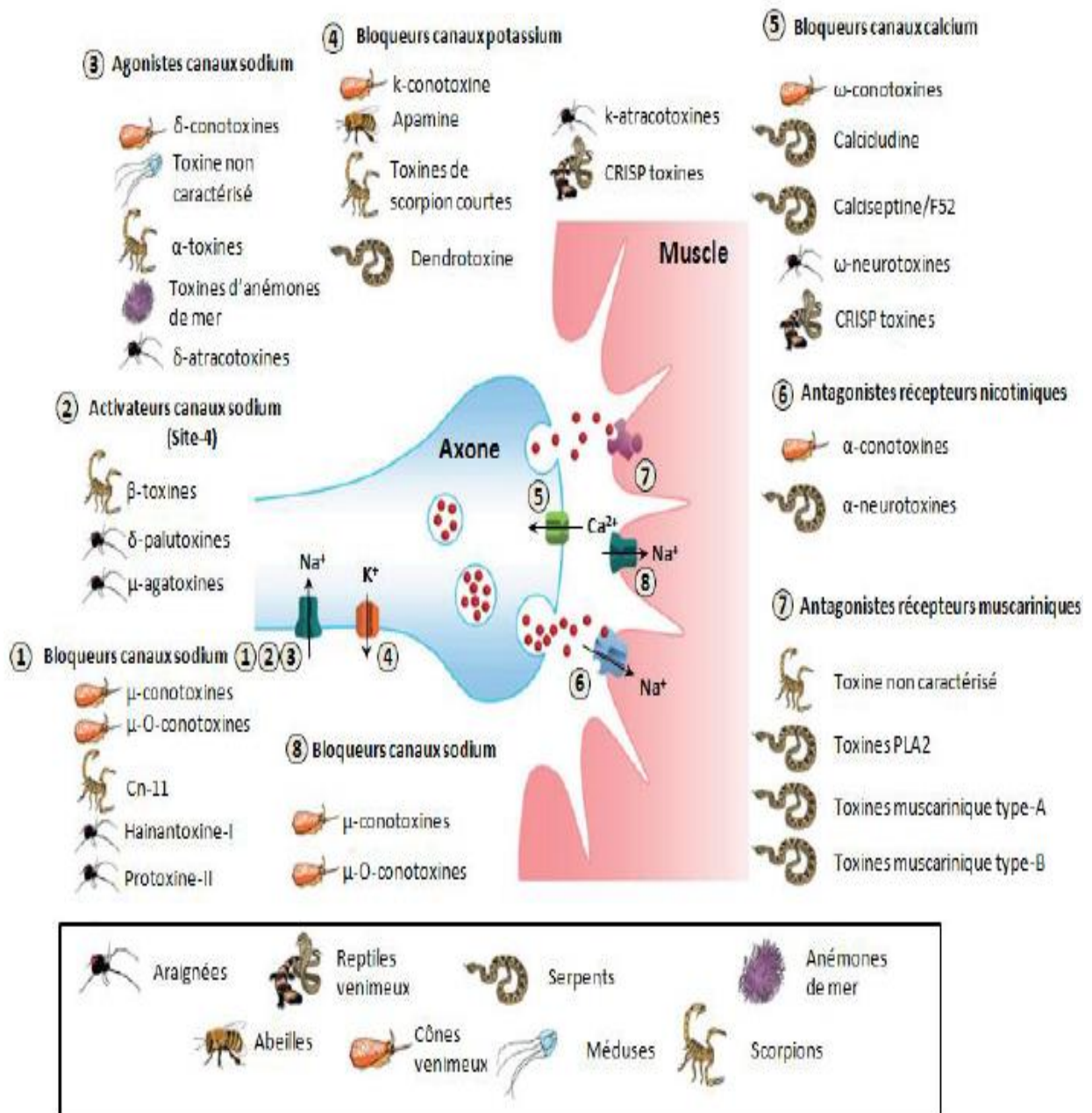


Figure 4: Diversité des cibles pharmacologiques des neurotoxines présentes dans les venins

(Casewell et al., 2013; Touchard, 2015).

Les neurotoxines présynaptiques dites également neurotoxines- β sont des PLA2 basiques transformées en toxines capables de reconnaître des cibles sur les membranes présynaptiques et ayant une toxicité élevée (Larréché et al., 2008a). Ces toxines sont constituées de 120 à 130 résidus d'acides aminés, reliés par 6 à 7 ponts disulfures (Larréché et al., 2008a; Menez, 1993).

1.1.2.1.2 Neurotoxines facilitatrices de la transmission synaptique

Les neurotoxines qui facilitent la transmission synaptique sont présentes essentiellement dans les venins des serpents *Dendroaspis* (mambas) d'environ 7 kDa. Parmi les neurotoxines facilitatrices, on distingue les dentrotoxines constituées de 59 à 60 acides aminés et trois ponts disulfures et qui ont des similitudes structurales avec les inhibiteurs de protéases pancréatiques. Il existe également des neurotoxines facilitatrices appelées «les fasciculines», elles appartiennent à la famille des toxines à «Trois doigts» et elles sont constituées de 61 acides aminés et quatre ponts disulfures. Les fasciculines sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase qui s'opposent ainsi à la régulation physiologique de l'influx nerveux (Karlsson et al., 1984; Harvey, 2001).

1.1.2.2 Cytotoxines

Les cytotoxines ou appelées également cardiotoxines sont présentes dans les venins d'*Elapidae* et *Crotalidae* et essentiellement dans les venins de *Naja* (cobras). Sans être neurotoxiques, elles présentent des homologies avec les α neurotoxines. Elles appartiennent à la famille des toxines à «trois doigts» et sont constituées de 59 à 62 résidus d'acides aminés et de quatre ponts disulfures (Harris, 1997).

Elles ont pour cible les cellules des muscles cardiaques, squelettiques et lisses. Ces muscles restent contractés et peuvent entraîner une dépolarisation rapide et irréversible de la membrane cytoplasmique des cellules excitables conduisant ainsi à une perte de leur excitabilité. Elles affectent l'intégrité et la perméabilité des membranes cellulaires et interviennent également dans la toxicité cellulaire des venins de serpents (Kini et Doley, 2010).

1.1.2.3 Myotoxines

Les myotoxines sont des polypeptides basiques isolés à partir des venins de *Viperidae* et *Crotalidae*. Ces toxines dont le poids moléculaire est de 5 kDa, sont dépourvues d'activité enzymatique et sont constituées de 42 à 45 résidus d'acides aminés. L'activité myotoxique

semble être liée à la présence de deux séquences peptidiques qui se suivent à l'extrémité C-terminale. La première séquence est riche en acides aminés cationiques, la deuxième est riche en acides aminés hydrophobes. Les deux séquences sont reliées par trois à quatre ponts disulfures (Kini et Iwanaga, 1986; Ownby et Colberg, 1988; Angulo et al., 2001; Chippaux, 2002). Les myotoxines se lient à leur récepteur grâce à la séquence cationique puis pénètrent dans la bicouche lipidique par le biais de leur séquence hydrophobe. Il en résulte une déstabilisation de la membrane cellulaire (Lambeau et al., 1994; Gutiérrez et Lomonte, 1995; Cherifi, 2011).

1.1.2.4 Sarafotoxines

Les sarafotoxines sont des toxines présentes uniquement dans les venins de serpents du genre *Atractaspis* et représentent à elles seules la quasi-totalité de l'effet biologique du venin de ce genre. Les sarafotoxines font partie des molécules les plus toxiques des venins de serpents, elles sont constituées de 21 résidus d'acides aminés et de deux ponts disulfures avec une masse moléculaire d'environ 2,5 kDa. Ces toxines sont de puissants peptides vasoconstricteurs qui sont, sur un plan fonctionnel et structural, très proches des endothélines, hormones vasoconstrictrices chez les mammifères. Les sarafotoxines et endothélines présentent entre elles environ 60% d'homologie. Elles se fixent sur les muscles de plusieurs organes dont l'utérus, l'intestin, les vaisseaux sanguins et le muscle cardiaque (Ducancel et Goyffon, 2008; Ahkong, 2015).

1.1.2.5 Désintégrines

Les désintégrines sont des protéines toxiques riches en cystéines présentes dans les venins de *Viperidea*. Elles sont constituées de 49 à 84 résidus d'acides aminés, de 4 à 7 ponts disulfures et ont un poids moléculaire qui varie entre 5 et 15 kDa. Elles présentent une conformation mono- ou hétérodimérique et sont classées en trois groupes en fonction du nombre d'acides aminés et de ponts disulfures. Elles agissent en inhibant les intégrines qui sont des protéines transmembranaires jouant un rôle important au niveau du transfert des messages extracellulaires vers le cytoplasme, des processus d'adhésion, de migration et de croissance cellulaire (Huang, 1998; Chippaux, 2002; Ahkong, 2015). Une désintégrine dimérique de 14193,97 Da douée de forte activité antiparasitaire a été purifiée à partir du venin de *C. cerastes* (Allane et al., 2018).

Les taux des protéines (exprimés en % du protéome) et la distribution des toxines les plus abondantes ont été rapportés dans différents venins d'espèces de serpents des *Viperidae* (sous-

familles *Viperinae* et *Crotalinae*) et des Elapidae (sous-familles *Elapinae* et *Hydrophiinae*) (Figure 5).

1.2 Physiopathologie de l'envenimation ophidienne

Certaines molécules de venins de serpents exercent des effets pathologiques locaux dans les tissus voisins, tandis que d'autres sont distribuées par voie systémique à travers le système lymphatique et les vaisseaux sanguins, permettant à ces molécules d'agir sur divers organes (Warrell, 2010; Gutiérrez et al., 2017). Les symptômes de l'envenimation varient chez l'homme selon la quantité de venin injectée, le site de morsure, l'âge et le poids de la victime ainsi que la réaction particulière de chaque individu (Chippaux, 2002). Les activités des principales familles de toxines sont résumées dans le tableau V.

Tableau V: Activités toxiques des principales familles de protéines des venins de serpents (Gutiérrez et al., 2017).

Molécules	Activités toxiques
Phospholipases A2	myotoxicité locale et systémique, douleur, lésion des vaisseaux lymphatique, œdème, neurotoxicité, néphrotoxicité et hémolyse
Métalloprotéinases	hémorragie, myonécrose, dégradation de la matrice extracellulaire, cloques, douleur, œdème et choc cardiovasculaire, néphrotoxicité et coagulopathie
Hyaluronidases	dégradation de la matrice extracellulaire
Toxines à trois doigts	cytotoxicité, nécrose et neurotoxicité
Dendrotoxines	Neurotoxicité
Sérine-protéinases	coagulopathie, œdème et hypotension
Désintégrines	inhibition de l'agrégation plaquettaire
Peptides vasoactifs	Hypotension
Lectine de type C	inhibition ou promotion de l'agrégation plaquettaire et thrombocytopénie
Petits peptides myotoxiques basiques	contraction musculaire
Sarafotoxines	Cardiotoxicité

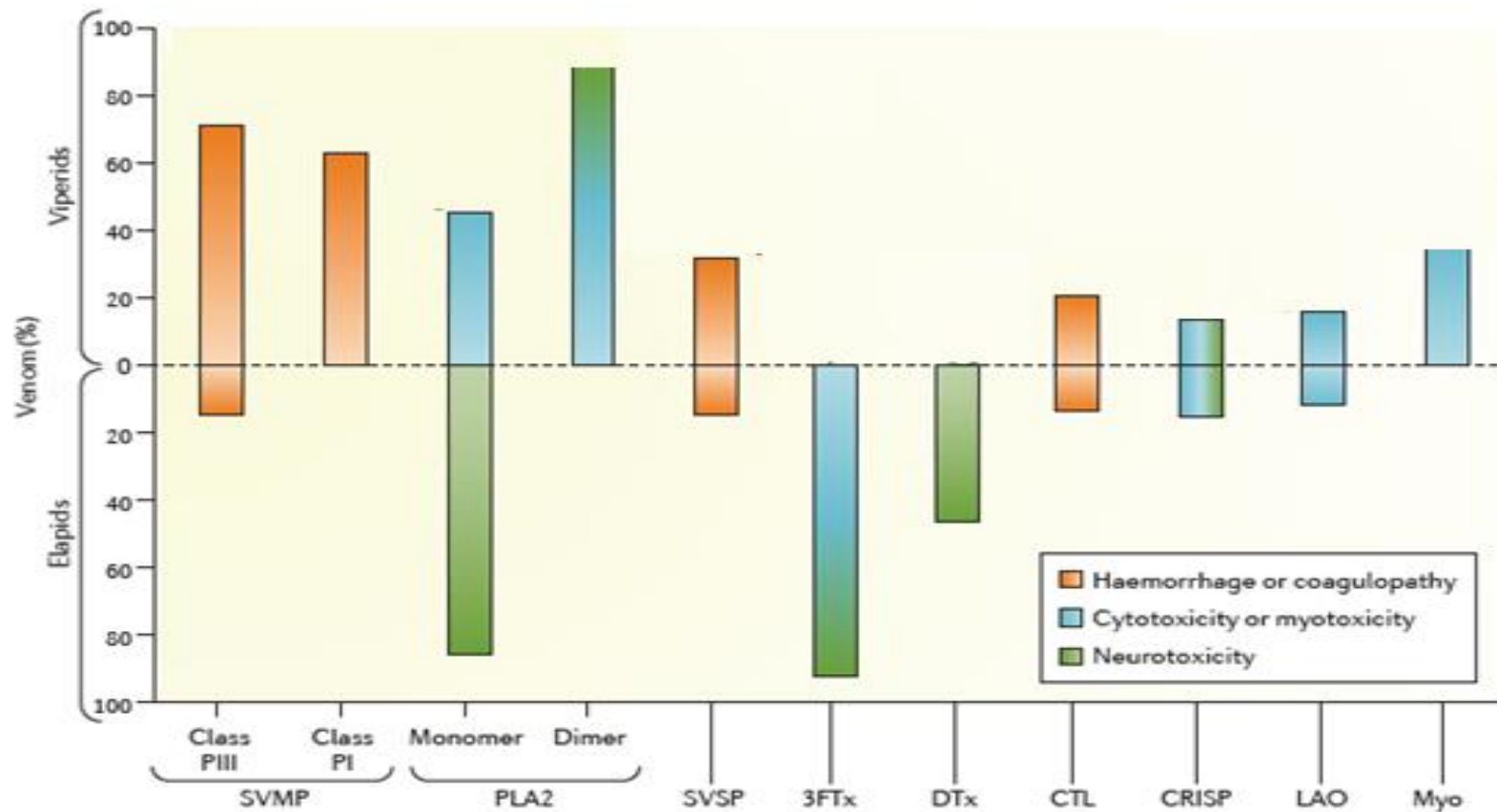


Figure 5: Taux de toxines dans le venin des *Viperidae* et des *Elapidae*, synthétisée de (Gutiérrez et al., 2017). *3FTx* : toxine à trois doigts; *CRISP* : protéine sécrétoire riche en cystéine; *CTL* : lectine de type; *DTx* : dendrotoxine; *LAO* : l-aminoacide oxydase; *Myo* : myotoxine de faible masse moléculaire; *PLA2* : phospholipase A2; *SVMP* : métalloprotéinase de venin de serpent; *SVSP*, sérine protéinase de venin de serpent.

1.2.1 Dommages tissulaires locaux

La plupart des venins de *Viperidae* et ceux de certains *Elapidae* induisent des lésions tissulaires locales.

1.2.1.1 Inflammation

Lors des envenimations ophidiennes, un important processus inflammatoire local se développe dans les tissus envenimés, avec la synthèse et la libération d'éicosanoïdes, d'oxyde nitrique, de bradykinine, d'histamine et de cytokines, l'activation et le recrutement des cellules immunitaires (Teixeira et al., 2009; Gutiérrez et al., 2017). L'hydrolyse des phospholipides membranaires par les PLA2s conduit à la libération de précurseurs de la biosynthèse des prostaglandines et des leucotriènes. Ces molécules induisent l'augmentation de la perméabilité capillaire entraînant la formation d'œdème (Chaves et al., 1995; Gutiérrez et Lomonte, 1995). Dans les formes sévères, l'œdème devient extensif et s'accompagne d'hémorragies intenses (de Araújo et al., 2000), (Figure 6). La dose minimale œdématisante du venin de *Cerastes cerastes* est estimée à 1,4 µg/20 g de souris (Abib et Laraba-Djebari, 2003). L'étude de l'activité œdématisante du venin de *Cerastes cerastes* a montré que l'œdème plantaire est un phénomène réversible temps-dépendant. Son maximum est atteint au bout de 3 heures d'envenimation. Une libération intense des cytokines pro-inflammatoires au niveau de la patte est observée au bout de 2 heures et persiste jusqu'à 6 heures, le taux maximal de l'IL10 est observé à 3 heures (Chelghoum, 2009).

1.2.1.2 Myotoxicité

La myotoxicité est principalement due à la perturbation de l'intégrité et la rupture de la membrane plasmique par l'action des phospholipases A2 (PLA2) myotoxiques (Dixon et Harris, 1996; Montecucco et al., 2008). Les petits peptides myotoxiques basiques présents dans certains venins de serpents de la famille des *Viperidae*, induisent également une contraction musculaire et une nécrose (Warrell, 2010).

Les fibres musculaires sont également affectées par l'ischémie à la suite d'altérations vasculaires et d'une augmentation de la pression musculaire due à l'œdème (Gutiérrez et al., 2009b; Gutiérrez et al., 2017). L'évaluation de l'activité enzymatique de la créatine kinase a permis de révéler une activité myotoxique du venin de *Cerastes cerastes*. L'administration d'une dose sublétales du venin a provoqué une lyse des cellules musculaires (squelettiques et

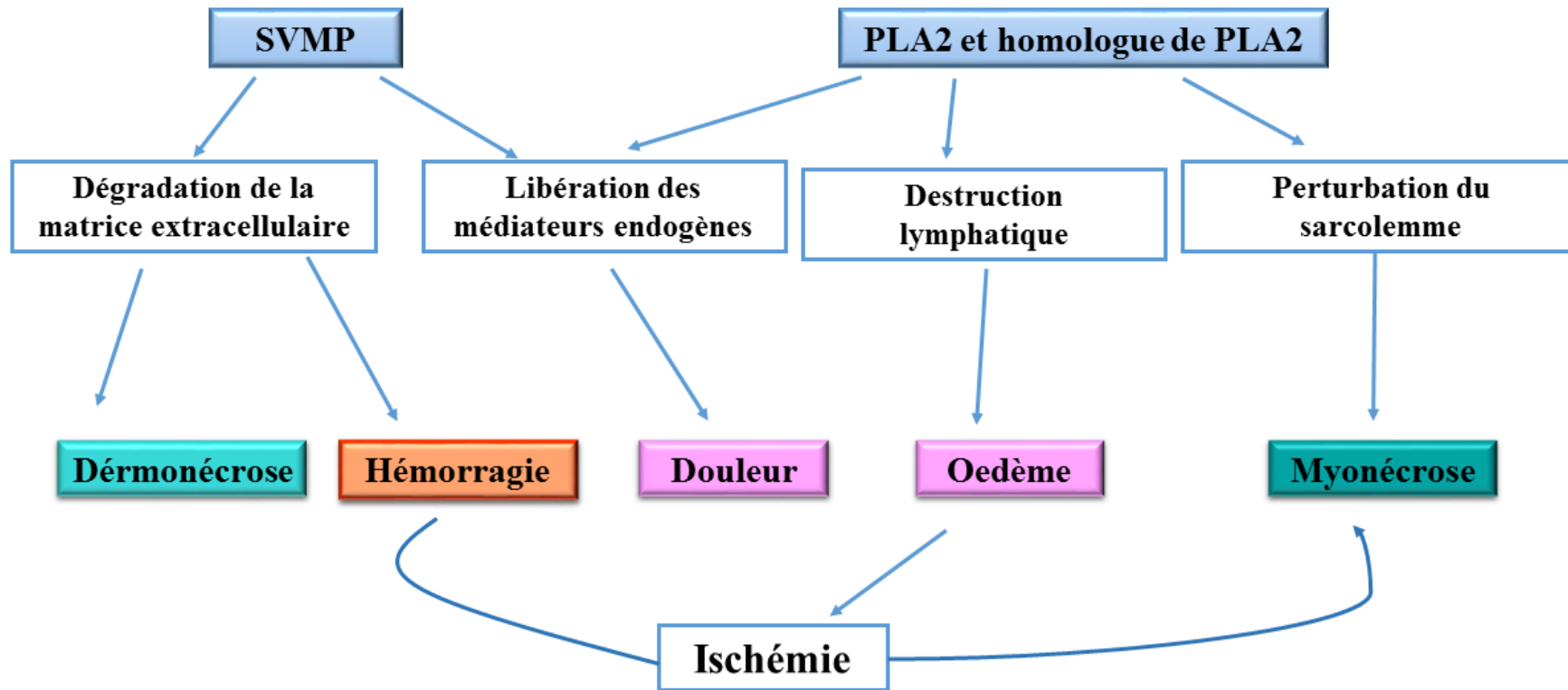


Figure 6 : Dommages tissulaires induits localement par les venins de serpents (Gutiérrez et al., 2009b). → : activation

cardiaques) et une libération considérable de la créatine kinase dans le sang après 3 heures d'envenimation (Chelghoum, 2009).

1.2.1.3 Hémorragie locale

Les métalloprotéinases zinc-dépendantes sont responsables des effets hémorragiques locaux induits par la majorité des venins de *Viperidae*. Tous les composants hémorragiques isolés à partir des venins de *Viperidae* sont des SVMPs, cependant pas toutes SVMPs sont capables d'induire une hémorragie (Figure 7), (Fox et Serrano, 2005; Gutiérrez et al., 2009b). Le venin de *Cerastes cerastes* quant à lui est doué d'une forte activité hémorragique avec une dose minimale hémorragique (DMH) de 3,2 µg/20 g de souris (Oussedik-Oumehdi, 2007).

1.2.1.4 Hydrolyse des composants de la matrice extracellulaire

Les SVMPs et les hyaluronidases hydrolysent les composants de la matrice extracellulaire (MEC), tels que divers types de collagènes, l'acide hyaluronique et les protéoglycanes. L'hydrolyse des composants de MEC affectant ainsi la structure et la fonction non seulement des microvaisseaux mais aussi celles d'autres composants tissulaires, jouant ainsi un rôle dans les dommages tissulaires locaux induits par le venin (Gutiérrez et al., 2016; Gutiérrez et al., 2017). Les dommages microvasculaires induits par le SVMP peuvent également être une conséquence de la perturbation des adhérences cellules-cellules endothéliales (Gutiérrez et al., 2017; Seo et al., 2017).

1.2.1.5 Dérmonécrose

Les SVMP induisent également des lésions cutanées en dégradant l'interface dermo-épidermique avec la formation conséquente de cloques (Jiménez et al., 2008). L'activité dérmonécrotique a été mise en évidence dans le venin de *Cerastes cerastes*. Elle présente un caractère dose-réponse et présente une dose minimale nécrotique (DMN) de 19 µg/20 g de souris (Oussedik-Oumehdi, 2007).

1.2.2 Effets systémiques

1.2.2.1 Troubles cardiovasculaires et hémostatiques

D'une part, l'activation de la coagulation sanguine par des activateurs de la prothrombine, du plasminogène, des facteurs V, IX et X, conduit à une consommation des facteurs de la coagulation physiologiques, induisant leur disparition du sang de la victime. Le sang devient alors incoagulable faute de facteurs permettant sa coagulation.

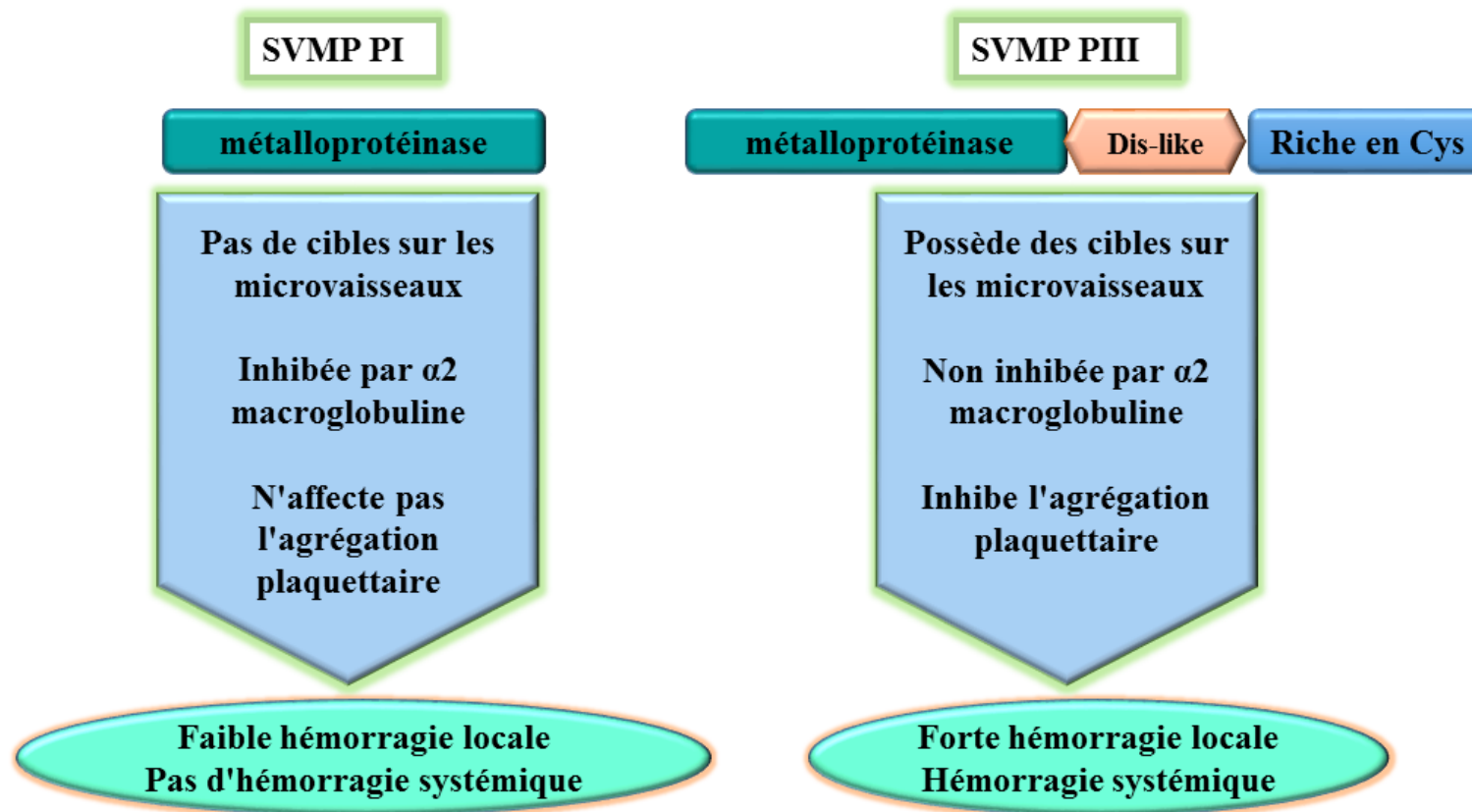


Figure 7 : Différences structurales et fonctionnelles entre les métalloprotéinases de venins de serpents SVMPs P-I et P-III (Gutiérrez et al., 2009a).

D'autre part, le caillot formé n'étant pas physiologique est instable et vite dégradé par les composants du venin ayant une activité fibrinolytique, conduisant à un syndrome hémorragique (Oussedik-Oumehdi, 2007).

L'hémorragie systémique induite par le venin est l'une des principales causes des perturbations hémodynamiques vécues par les patients envenimés par les vipéridés, qui peuvent évoluer vers un choc cardiovasculaire (Figure 8 et 9), (Gutiérrez et al., 2017; Warrell, 2010). Dans ces envenimations, l'hypovolémie résulte également d'une augmentation de la perméabilité vasculaire, y compris des fuites plasmatiques systémiques. Cet effet est induit par les sérine-protéinases du venin de serpent qui libèrent la bradykinine et également par l'action de nombreux médiateurs inflammatoires endogènes vasoactifs. De plus, les venins de vipéridés contiennent des peptides de potentialisation de la bradykinine, dont certains inhibent l'enzyme de conversion de l'angiotensine et contribuent aux altérations hémodynamiques (Hayashi et Camargo, 2005; Gutiérrez et al., 2017).

Une molécule de faible poids moléculaire isolée à partir du venin de *Bothrops jararaca* bloque la dégradation de la bradykinine qui est un vasodilatateur puissant. Cette molécule agit à deux niveaux : elle entraîne, d'une part, une chute du taux plasmatique de l'angiotensine II et de l'aldostérone et, d'autre part, une élévation du taux de bradykinine (Chippaux, 2002; McCleary et Kini, 2013).

1.2.2.2 Lésions rénales aiguës

Les envenimations par les morsures de serpents de certains *Viperidae* et de certaines *Elapidae* peuvent entraîner des lésions aiguës au niveau des reins. Selon le type de venin, les mécanismes associés à la pathogenèse des lésions rénales sont l'ischémie secondaire à une diminution du débit sanguin rénal ; dégradation protéolytique de la membrane basale glomérulaire par les SVMPs et le dépôt de micro-thrombi dans la microvascularisation rénale (Pinho et al., 2005; Sitprija et Sitprija, 2012; Gutiérrez et al., 2017) (Figure 10).

1.3 Réponse inflammatoire

L'inflammation est une réponse physiologique de défense ou d'adaptation à une agression, qui peut être un microorganisme ou toutes substances particulières ou solubles, étrangères à l'organisme (Pasquier, 1995). Une réaction inflammatoire comporte une dilatation des vaisseaux à l'origine d'une infiltration séreuse des tissus (œdème) puis une migration des leucocytes de la microcirculation par diapédèse pour s'accumuler au niveau de foyer

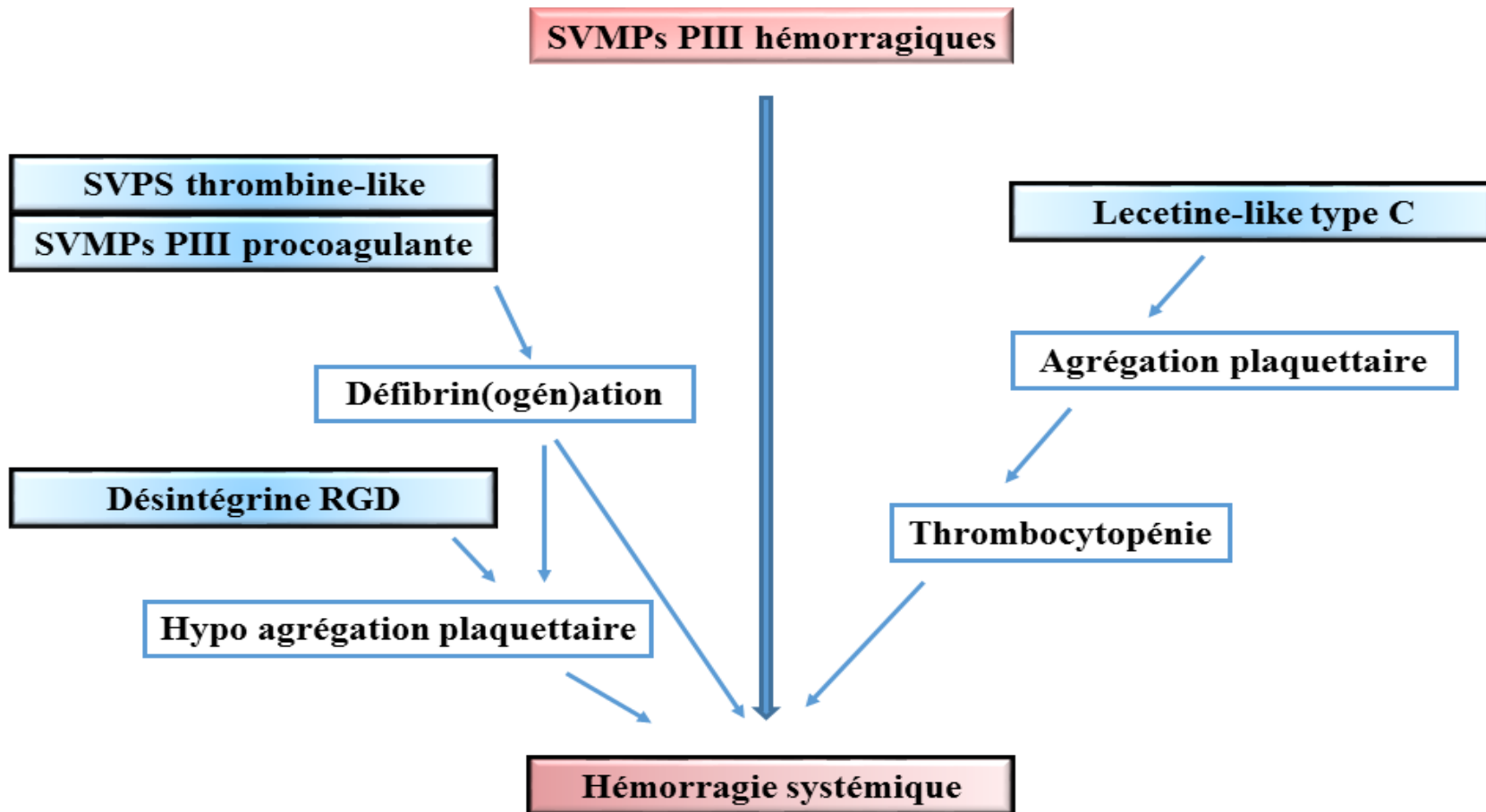


Figure 8 : Pathogénèse de l'hémorragie systémique induite par les molécules des venins de serpents (Gutiérrez *et al.*, 2009a). —> : activation

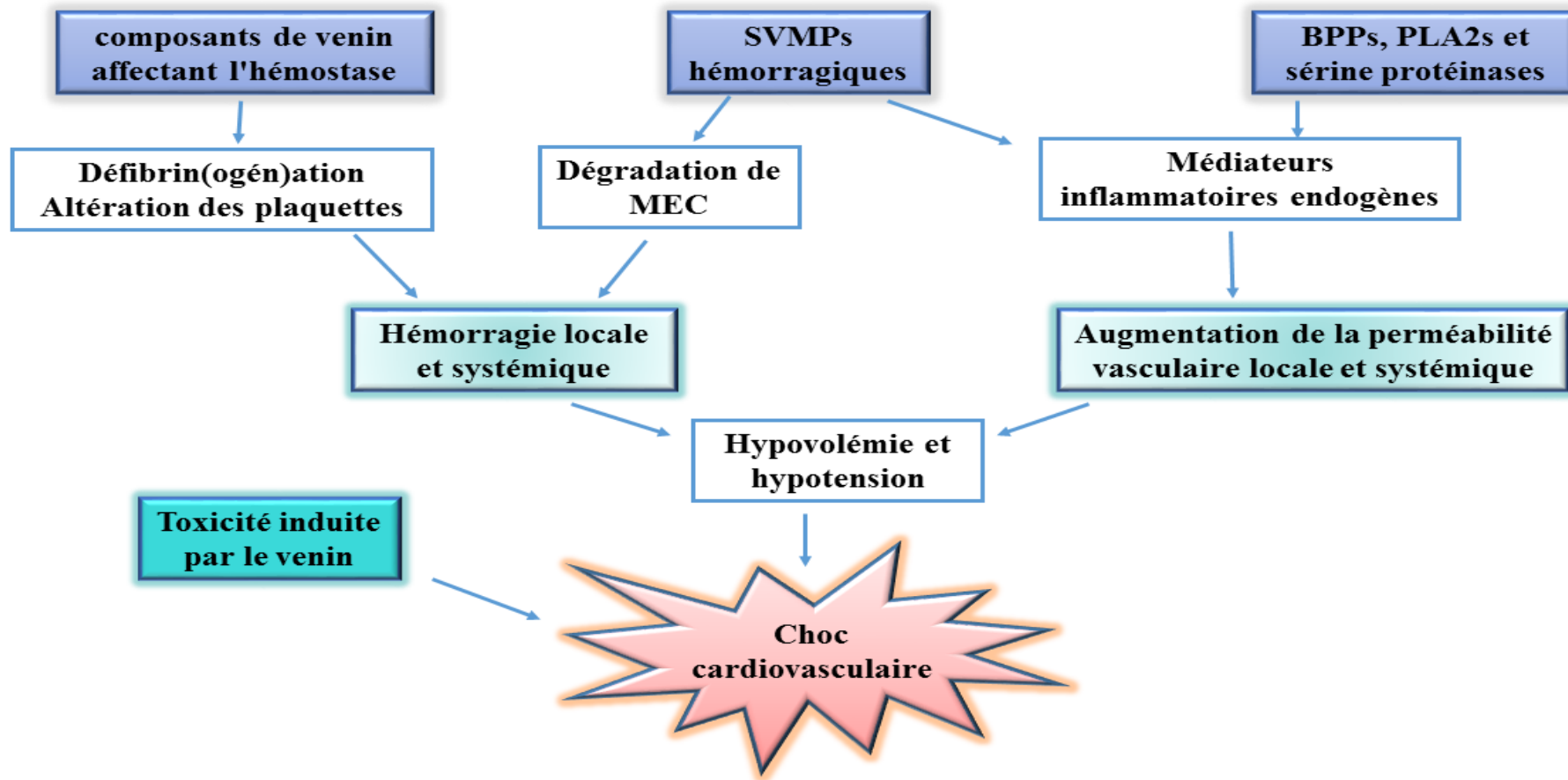


Figure 9 : Facteurs impliqués dans le choc cardiovasculaire caractéristique des envenimations sévères (Gutiérrez *et al.*, 2009a). —> : activation

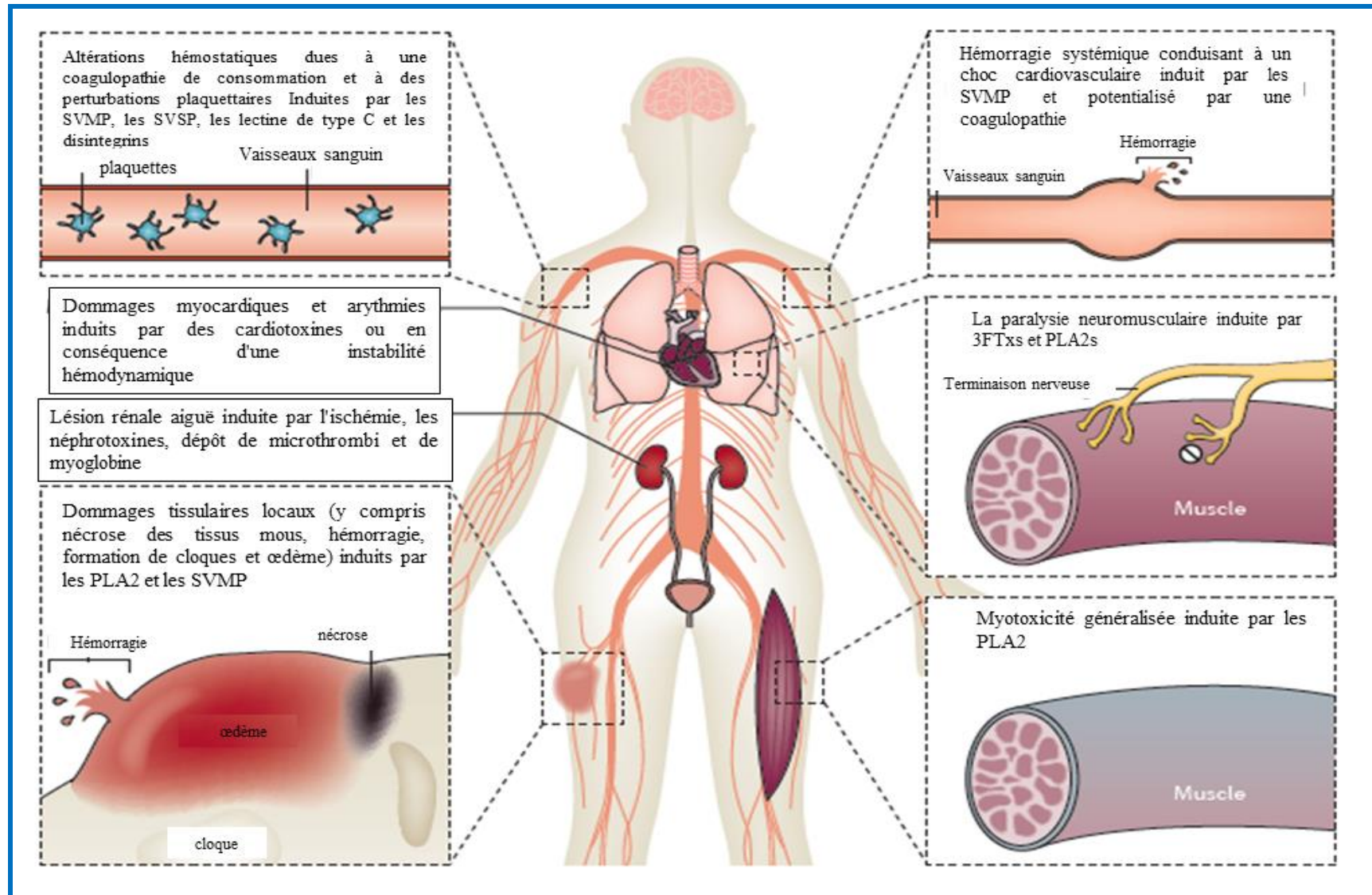


Figure 10 : Action des toxines de venins de serpents sur différents systèmes du corps Humain (Gutiérrez et al., 2017).

inflammatoire, suivie d'une phagocytose par des cellules compétentes et enfin un processus de résorption ou de cicatrisation (Lévesque, 2002).

L'inflammation est caractérisée par trois phases principales : une phase vasculaire, une phase cellulaire et une phase de réparation.

1.3.1 Phase vasculaire

La phase vasculaire est caractérisée par une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Les leucocytes se disposent à la périphérie des petits vaisseaux, adhèrent aux cellules endothéliales, puis passent à travers la paroi des vaisseaux et se dirigent vers le lieu de l'agression. L'entrée des leucocytes dans les tissus est un marqueur de tous les événements inflammatoires, chroniques ou aigus. La prédominance de neutrophiles dans les sites inflammatoires est un signe d'une inflammation aiguë, celle des cellules mononuclées est un signe d'inflammation chronique et celle des éosinophiles est un signe d'une inflammation associées à des allergies ou à des infections parasitaires (Pasquier, 1995).

1.3.2 Phase cellulaire

La phase cellulaire commence lorsqu'un grand nombre de PN, de macrophages et de plaquettes se retrouvent rassemblés au site de l'inflammation. Les polynucléaires et les macrophages phagocytent les bactéries, les microcristaux, les débris de tissus nécrosés, les enzymes protéolytiques de même que les ERO participant ainsi à la destruction de l'antigène. Cependant au cours de la phagocytose, des enzymes protéolytiques ainsi que des ERO peuvent s'échapper des PN et des macrophages, concourant ainsi à l'entretien de l'inflammation et à une destruction inappropriée de cibles tissulaires et moléculaires (Pasquier, 1995).

1.3.3 Phase de réparation

La phase de réparation n'a lieu que si les agents de l'inflammation et les produits de la nécrose tissulaire ont pu être éliminés. Les PN et les macrophages cessent de libérer des ERO et des enzymes protéolytiques car n'étant plus stimulés par les agents proinflammatoires. Les cellules fibroblastiques et endothéliales forment alors un tissu conjonctivo-vasculaire aboutissant à la cicatrisation (Pasquier, 1995).

Selon l'origine de la réaction inflammatoire, son évolution diffère pour aboutir au même résultat c'est-à-dire à une accumulation de polynucléaires neutrophiles au site inflammatoire et des lésions cellulaires et tissulaires dues à l'action des ERO et des enzymes protéolytiques

libérées par les neutrophiles activés. Si la production de ERO est trop importante et que les systèmes naturels d'épuration sont insuffisants, les cellules sont soumises à un stress oxydatif qui entretient l'état inflammatoire (Pasquier, 1995). Les phospholipases A2 (notamment la phospholipase A2 cytoplasmique), activées en réponse à divers stimuli, catalysent la libération d'acide arachidonique, l'acide gras polyinsaturé le plus abondant dans le composant phospholipide des membranes cellulaires. L'acide arachidonique libéré sert de précurseur pour la synthèse des différents eicosanoïdes, médiés par les voies de la cyclooxygénase (COX), de la lipoxygénase et du cytochrome P-450 (Smith, 1989; O'Mahony *et al.*, 1997).

Les prostaglandines sont synthétisées à partir de l'acide arachidonique par l'activité catalytique des cyclooxygénases (COX-1, COX-2 et COX-3) (Warner et Mitchell, 2004). Les cytokines pro-inflammatoires, tels que l'interleukine -1beta, l'interféron gamma et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) induisent la COX-2 (Akarasereenont *et al.*, 1994; Ariasnegrete *et al.*, 1995). L'expression de COX-2 dans les macrophages peut également être stimulée par le facteur d'activation des plaquettes (PAF) et PGE2 (Thivierge et Rola-Pleszczynski, 1995; Tordiman *et al.*, 1995). Les COX-1 et la COX-2 étant les principales cibles des médicaments anti-inflammatoires (Simon, 1996).

La réponse inflammatoire engendrée par les venins de serpents est accompagnée d'une induction de la COX-2, sans modification dans l'expression de la COX-1 (Moreira *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2009b).

1.4 Stress oxydant

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre entre la production d'espèces radicalaires (ou réactives) de l'oxygène (ERO) et les capacités cellulaires antioxydantes (Migdal et Serres, 2011). Les radicaux libres sont une forme particulière d'espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou non apparié). Le champ magnétique créé par sa rotation, ou spin, n'est donc pas compensé par la rotation en sens inverse d'un électron apparié. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules, notamment lors de réactions en chaîne dont l'exemple le plus connu est celui de la peroxydation des lipides (Soares, 2005).

Les ERO ont longtemps été considérées comme des sous-produits toxiques du métabolisme normal de l'oxygène et impliquées dans de nombreuses pathologies. Cependant, depuis plusieurs années, la production contrôlée de radicaux apparaît comme un mécanisme

essentiel de la signalisation cellulaire qui participe au maintien de l'homéostasie de la cellule (Migdal et Serres, 2011).

Le rôle des ERO est très complexe car celles-ci peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans les conditions normales, elles sont générées en faibles quantités et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. Les ERO formées en trop grande quantité, deviennent délétères en activant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion (Haleng et al., 2007).

Le monoxyde d'azote radicalaire ou $\text{NO}\bullet$ est un composé important ; il est produit par la NO synthase qui se présente en trois isoformes ; la NOS neuronale (nNOS ou NOS-1), la NOS inducible (iNOS ou NOS-2) et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS-3). Le NO est une molécule labile très diffusible, ses effets régulateurs s'exercent sur la plupart des fonctions physiologiques de l'organisme (maintien du tonus vasculaire, neurotransmission, fonctionnement rénal,...), (Hare, 2004). Toutefois, le NO peut former avec l'anion superoxyde, le peroxynitrite (HOONO), un oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques (Haleng et al., 2007).

Une des cibles majeures de l'attaque radicalaire, ce sont les acides gras polyinsaturés, tels que les acides linoléique et arachidonique, présents au niveau des membranes plasmiques. Leur oxydation par les ERO, appelée peroxydation lipidique, conduit à la formation de très nombreux produits primaires (les hydroperoxydes) et secondaires (les aldéhydes) dont les activités biologiques sont multiples (Murphy, 1996). Le malondialdéhyde (MDA), un produit final de la peroxydation lipidique peut réagir physiologiquement avec divers nucléosides (désoxyguanosine et désoxyadénosine) et il est très mutagène et cancérigène (Marnett, 1999; Migdal et Serres, 2011).

Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes (Figure 11). Il existe deux sources d'antioxydants, une source apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque. L'autre source est endogène, elle se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. Des oligoéléments s'ajoutent à

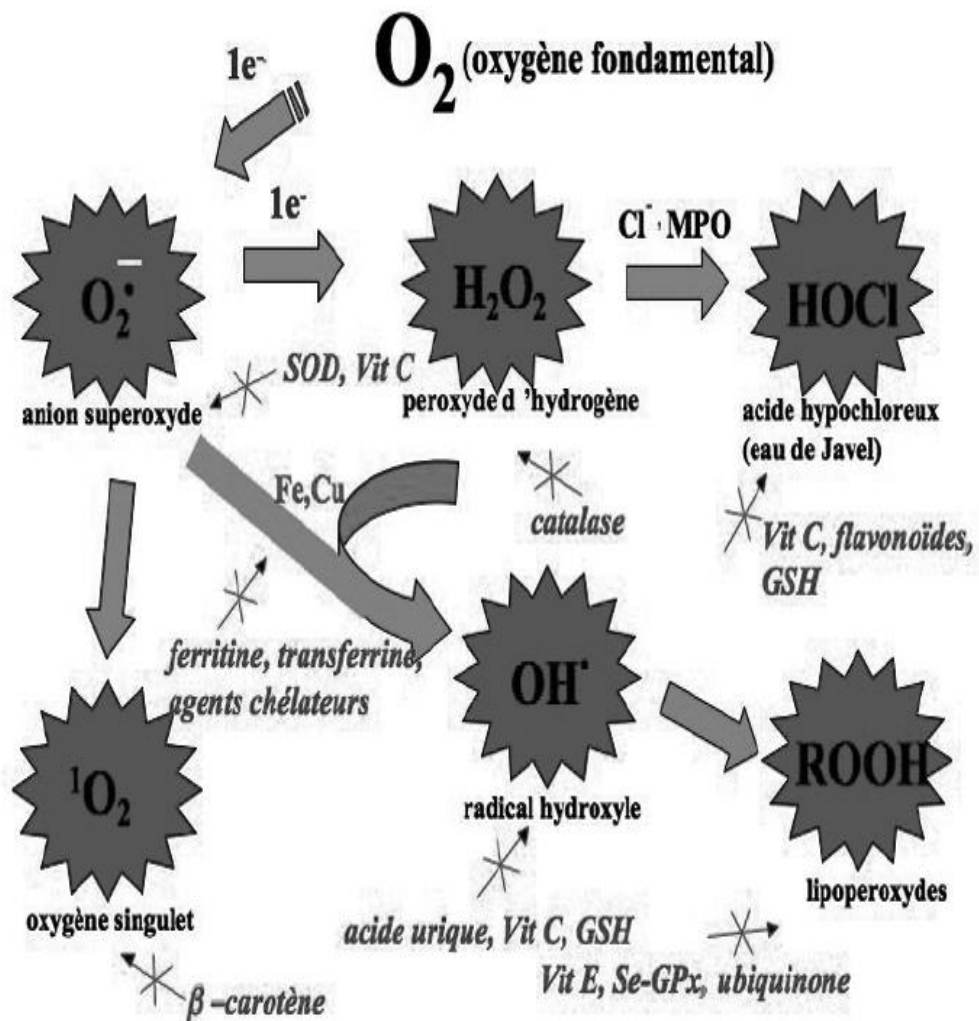


Figure 11: Différentes espèces réactives de l'oxygéné (ERO) et action des antioxydants régulateurs de leur production (Haleng et al., 2007). → : activation, —✕→ : inhibition

ces deux sources c'est le cas du sélénium, du cuivre et du zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Haleng *et al.*, 2007).

La vitamine C (ascorbate) est un micronutriment essentiel utilisé comme co-facteur par de nombreuses enzymes biosynthétiques telles que la dopamine- β -hydroxylase et la collagène synthase qui sont essentielles pour la vie (Carr et Frei, 1999; Padayatty *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2012). L'insuffisance en vitamine C provoque des troubles sévères de la fonction cardiaque et des systèmes squelettiques dus à la déficience de production d'hormones et de collagène (Ellis *et al.*, 2000). La vitamine C joue aussi un rôle important dans le système de défense contre une infection virale et le développement de cancer (Cameron et Pauling, 1976; Wintergerst *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008). Lorsqu'elle est administrée à long terme, la vitamine C diminue le stress oxydatif et la production O_2^- par les neutrophiles (Ellis *et al.*, 2000).

La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C au niveau du foie et des reins, ceci n'est pas le cas pour l'homme qui doit assurer un apport journalier d'environ 100 mg via une alimentation riche en fruits (Haleng *et al.*, 2007). La vitamine C est synthétisée à partir du glucose, au cours de la voie glycolytique. La L-gulonolactone- γ -oxydase (gulo) est l'une des enzymes essentielles à la synthèse de la vitamine C (Nishikimi *et al.*, 1992; Nishikimi *et al.*, 1994). Dans le cas de l'être humain, une mutation du gène codant la L-gulonolactone- γ -oxydase (gulo) est à l'origine du défaut de production de vitamine C (Burns, 1957). La plupart des animaux expérimentaux pourraient cependant produire eux-mêmes de la vitamine C, à l'exception du cobaye. Des souris « Gulo - / - » ont été générées et utilisées dans le cas d'insuffisance en vitamine C dans certaines pathologies (Maeda *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2012).

1.5 Récepteurs minéralo-corticoïdes (RM)

Le récepteur minéralocorticoïde (RM) appartient à la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires (Evans, 1988). Une fois liés avec le ligand, les RM se dissocient des protéines chaperonnes dans le cytosol, forment des dimères et migrent vers le noyau, où ils régulent la transcription des gènes cibles (Yang et Young, 2009). Le RM est le plus souvent activé par l'aldostérone minéralocorticoïde, mais il peut également être activé par les glucocorticoïdes (cortisol chez l'homme, corticostérone chez la souris), en raison de sa forte homologie avec le récepteur des glucocorticoïdes (Hawkins *et al.*, 2012; Odermatt et Kratschmar, 2012). La sélectivité de RM pour l'aldostérone dépend largement de la 11 β -

hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β -HSD2) qui convertit les glucocorticoïdes en métabolites inactifs incapables de se lier au RM (Odermatt et Kratschmar, 2012; Chadwick et al., 2016b).

L'aldostérone stéroïde est la principale hormone minéralocorticoïde; elle est synthétisée dans la zone glomérulaire du cortex surrénalien en réponse à l'hyperkaliémie ou à la déplétion en sodium, comme point final de l'activation du système rénine-angiotensine (Rossier et al., 2015). La production locale d'aldostérone peut également se produire dans les tissus périphériques (Bader, 2010; Taves et al., 2011). L'aldostérone stimule la réabsorption du sodium rénal et l'excrétion de potassium, jouant ainsi un rôle majeur dans le contrôle de la pression artérielle et de l'homéostasie du volume extracellulaire (Jaisser et Farman, 2016).

Le RM est surtout connu pour son rôle dans le maintien de l'homéostasie électrolytique au niveau des reins et la pression sanguine au niveau cardiaque, mais il a également été montré qu'il agit au niveau des autres organes tels que le cerveau, le pancréas, le côlon, les ovaires et le tissu adipeux (Gomez-Sanchez, 2004; Gomez-Sanchez et al., 2009; Gomez-Sanchez et al., 2011; Hawkins et al., 2012). Il a été récemment montré que les récepteurs des minéralocorticoïdes sont présents dans tous les muscles des membres et des voies respiratoires (Chadwick et al., 2016a).

L'activation des récepteurs des minéralocorticoïdes joue un rôle crucial dans la pathogenèse de plusieurs maladies cardiovasculaires, rénales et artérielles (Kolkhof et al., 2015). Au niveau des reins, l'aldostérone favorise l'inflammation glomérulaire et tubulo-interstitielle et la fibrose à travers diverses voies provoquant une maladie rénale chronique (CKD) et une albuminurie (Bauersachs et al., 2015; Chadwick et al., 2016b).

La spironolactone a été approuvée en tant que médicament diurétique et natriurétique pour la prise en charge de l'hypertension et de l'aldostéronisme primaire, puis pour le traitement de l'insuffisance cardiaque (Ménard, 2004). La spironolactone est un puissant antagoniste compétitif des RM, elle est peu sélective car elle inhibe également les récepteurs aux androgènes et à la progestérone. À des concentrations élevées, il peut également interférer avec le récepteur des glucocorticoïdes (RG) (Kolkhof et Borden, 2012; Jaisser et Farman, 2016). La demi-vie de la spironolactone est de 12 à 35 h (comparée à celle de l'eplerenone qui est de 4 à 6 h et à celle de la finerenone qui est de 2 h) (Dojki et Bakris, 2017).

La spironolactone (antagoniste des RM) exerce un effet réno-protecteur, ainsi qu'un effet cardio-protecteur, dans le diabète hypertensif (Ogawa et al., 2006). Elle améliore la

congestion et l'œdème pulmonaire lorsqu'elle est utilisée pour le traitement de l'ascite associée à la cirrhose décompensée (Figure 12), (Nishi *et al.*, 2006; Chadwick *et al.*, 2016a; Tanabe *et al.*, 2017). Elle possède un effet anti-inflammatoire en favorisant le phénotype anti-inflammatoire M2 des macrophages infiltrés dans les muscles dystrophiques (Bene *et al.*, 2014).

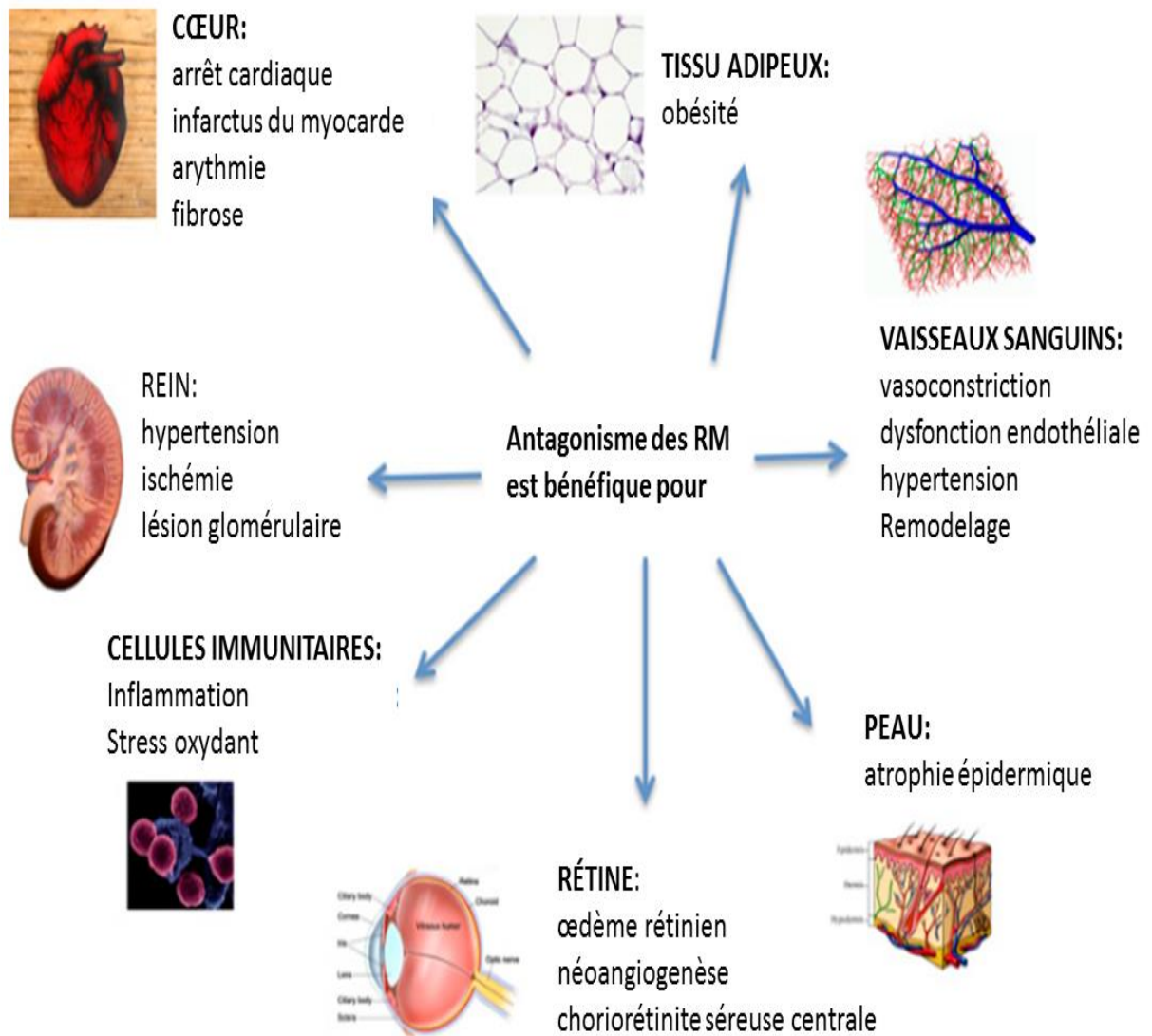


Figure 12 : Effets bénéfiques de l'antagonisme des récepteurs minéralocorticoïdes (MR) dans différentes pathologies modifiée de (Chadwick *et al.*, 2015; Chadwick *et al.*, 2016b; Jaisser *et Farman*, 2016). : *inhibition*

Matériel et Méthodes

2 Matériel et méthodes

2.1 Matériel

2.1.1 Matériel biologique

2.1.1.1 Venin de *Cerastes cerastes*

Le venin de *Cerastes cerastes*, nous a été fourni par le Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Biologiques de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB).

2.1.1.2 Fractions F3 et D3

La fraction F3, douée d'une activité cytotoxique et obtenue après filtration moléculaire du venin de *Cerastes cerastes*, a subi une deuxième étape de purification sur une colonne échangeuse d'anions et a permis d'obtenir la fraction D3 fortement cytotoxique.

2.1.1.3 Animaux

Les souris utilisées dans cette étude sont de race NMRI (*Naval Medical Research Institute*). Elles proviennent de l'élevage de l'animalerie de la Faculté des Sciences Biologiques de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB). Les animaux sont maintenus dans des conditions standards ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, selon un cycle de 12 heures lumière/obscurité) et nourries à l'aide d'un régime de composition standard (croquettes provenant de la société de production des aliments d'animaux, Bouzareah, Alger) et de l'eau de boisson à volonté.

L'expérimentation sur les animaux a été effectuée conformément aux règles du comité d'éthique de la Communauté Européenne, elle a été approuvée par l'Agence Thématique de Recherche en Science de la Santé (ATRSS).

2.1.2 Matériel non biologique

Tous les produits chimiques et les réactifs utilisés sont de qualité analytique et ont été fournis par Sigma (St. Louis, USA) et Merck (Darmstadt, RFA).

2.2 Méthodes

2.2.1 Etude *in vivo* de la cytotoxicité

2.2.1.1 Evaluation de la cinétique de l'inflammation et du stress oxydatif induits *in vivo* par le venin de *Cerastes cerastes*

La cinétique de la réponse inflammatoire et celle du stress oxydatif ont été évaluées à 3, 24 et 48 h après envenimation. Les animaux ont reçu une injection de venin de *Cerastes cerastes* (48 µg/20 g de poids corporel) ou le même volume de NaCl 0,9% par voie intrapéritonéale. Les sérums ont été récupérés après centrifugation du sang à 3000 g pendant 10 min. Les organes récupérés (cœur, poumons, reins et foie) ont été homogénéisés dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7,4, puis centrifugés à 3000 g pendant 10 min. Le surnageant (S1) a permis d'évaluer les activités d'éosinophile-peroxydase (EPO) et de la catalase, ainsi que les taux de malondialdéhyde (MDA), de nitrites résiduels (NO) et de glutathion réduit (GSH). Les culots obtenus ont été remis en suspension dans du tampon phosphate 50 mM, Triton X 100 à 0,5%, pH 6, ils sont ensuite soumis à une série de congélation/décongélation et à une autre centrifugation à 12000 g pendant 5 min. L'activité de la myéloperoxydase (MPO) a été évaluée dans le surnageant (S2).

2.2.1.2 Caractérisation pharmacologique de la cytotoxicité induite *in vivo* par le venin de *C. cerastes*

Afin de caractériser et de comprendre le mécanisme de la cytotoxicité induite *in vivo* par le venin de *C. cerastes*, quatre prétraitements à l'aide de spironolactone, L-NAME, celecoxib et de vitamine C ont été utilisés.

Les animaux utilisés dans cette étude ont été prétraités soit : i) avec la spironolactone (200 mg/kg, i.m.), un antagoniste non-sélectif, compétitif de l'aldostérone ciblant les récepteurs minéralocorticoïdes, ii) avec le L-NAME (40 mg/kg, i.m.), un inhibiteur de la NOS, iii) avec le celecoxib (10 mg/Kg, i.m.), un inhibiteur de la COX-2 et iv) avec la vitamine C (10 mg/kg, i.m.), un antioxydant. Après 30 minutes à 1 heure de traitement, les souris ont reçu une dose équivalente à une DL50 de venin.

Deux lots de souris servant de témoins ont été injectés par voie intrapéritonéale avec du NaCl 0,9% ou une dose d'une DL50 de venin. Après sacrifice des animaux à 24 h après envenimation, le sang et les organes (cœur, poumons, foie et reins) ont été récupérés. Les sérums et les surnageants ont été préparés comme décrit précédemment en section II.2.1.1,

Les activités enzymatiques de l'EPO, de la MPO, de la catalase et les taux de NO, de MDA et de GSH ont été ensuite évaluées.

2.2.1.3 Etude de la cytotoxicité de la fraction hautement toxique D3

Afin de mettre en évidence l'implication de la fraction peptidique et non enzymatique dans la cytotoxicité induite *in vivo* par le venin de *C. cerastes*, la fraction toxique F3 et la sous fraction D3 hautement cytotoxique (0.02 et 0,01 UDO/20 g de poids corporel respectivement) ont été injectées par voie intrapéritonéale. Deux lots de souris témoins ont reçu une injection du NaCl 0,9% ou une DL50 de venin par voie intrapéritonéale. Après 3 h d'envenimation, les animaux ont été sacrifiés, le sang et les organes (cœur, poumons, foie et reins) ont été récupérés. Les sérums et les surnageants ont été préparés comme décrit précédemment en section II.2.1.1, afin d'évaluer les activités enzymatiques de l'EPO, de la MPO, de la catalase et les taux de NO, de MDA et de GSH.

2.2.2 Etude *in vitro* de la cytotoxicité

Les analyses *in vitro* ont été effectuées en utilisant des cultures de: i) foie murin isolé, ii) Cellule Mononucléaire du Sang Périphérique (PBMC) humaine et iii) Hépatocytes murins isolés, obtenus selon les protocoles décrits ci-dessous. Les surnageants de culture et des homogénats ont été récupérés afin d'évaluer l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase (LDH), de la catalase et les taux de NO, de MDA et de GSH.

2.2.2.1 Isolement et culture du foie

Une étude *in vitro* est réalisée sur le foie isolé et cultivé avec le venin pendant 3 heures, afin de confirmer les résultats de la cinétique du stress oxydant déjà obtenus dans l'étude *in vivo*. Le foie est perfusé avec le DMEM (5 ml), lavé deux fois avec du PBS contenant la gentamycine. Il est ensuite perfusé et incubé à 37°C, 5% de CO₂ pendant 3 h avec un milieu complet (DMEM supplémenté avec 10% de SVF, 200 mM de glutamine, 0,5 µI/ml d'insuline et 0,6 µM d'hydrocortisone) contenant ou non 20 µg/ml du venin. Après incubation, le foie est homogénéisé dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7,4, puis centrifugé à 3000 g pendant 10 min. L'activité de la LDH est évaluée selon les instructions du fabricant du kit commercial (Salucea, Dutch Technology in Life Science).

2.2.2.2 Isolement et culture des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) humaines

La culture des cellules immunitaires en absence et en présence du venin a été réalisée afin d'évaluer l'implication du stress oxydatif d'origine cellules inflammatoires dans la cytotoxicité induite par le venin de *Cerastes cerastes*. Les cellules mononucléaires humaines du sang périphérique (PBMC) ont été utilisées comme modèle pour évaluer l'IC50 du venin de *Cerastes cerastes*. Les donneurs sains sont sélectionnés parmi ceux n'ayant pris aucun médicament pendant un mois avant le prélèvement du sang. Les PBMC sont isolées en utilisant l'Histopaque-1077. Les PBMC ont été lavées avec le milieu complet RPMI (supplémenté avec 10% de SVF et 200 mM de glutamine) ou avec la solution de lyse (0,15 M de NH₄Cl, 10 mM de KHCO₃ et 0,13 mM d'EDTA, pH 7,4). Elles sont ensuite centrifugées à 28000 tours/min pendant 5 min puis mises en suspension dans du RPMI à une concentration de 10⁶ cellules/ml.

Après incubation des cellules en absence et en présence du venin (1, 5, 10, 20, 40 et 50 µg/ml) pendant 24 h. La viabilité cellulaire est évaluée à l'aide d'un test d'exclusion au Bleu de Trypan. L'IC50 du venin de *C. cerastes* est calculée à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 5.

2.2.2.3 Isolement et culture des hépatocytes

La culture des hépatocytes murins isolés en absence et en présence du venin a été réalisée afin d'évaluer l'implication du stress oxydatif d'origine mitochondriale des cellules non inflammatoires dans la cytotoxicité induite par le venin de *Cerastes cerastes*. Le foie des souris a été perfusé à l'aide de DMEM (5 ml) ensuite avec de la trypsine (0,25%), et lavé deux fois avec du PBS contenant de la gentamycine. Les cellules ont été obtenues après trituration du foie, elles sont lavées deux fois avec du PBS. Après élimination des globules rouges, les hépatocytes ont été re-suspendus dans le milieu complet (DMEM supplémenté avec 10% de SVF, 200 mM de glutamine, 0,5 µl/ml d'insuline et 0,6 µM d'hydrocortisone). Le dénombrement des cellules est évalué à l'aide du test d'exclusion au Bleu de Trypan et le nombre est ajusté à 10⁶ cellules/ml.

Les cellules sont incubées à 37°C dans une microplaque (24 puits) avec le milieu complet qui est changé tous les jours pendant 9 jours et ce dans une ambiance de CO₂ (5%). Les cellules cultivées sont ensuite ré-incubées pendant 24 h dans un milieu complet en absence et en présence du venin (1 et 20 µg/ml).

2.2.3 Evaluation de l'infiltration des cellules inflammatoires

L'accumulation des éosinophiles et des neutrophiles et leur activation ont été évaluées en mesurant les activités de l'éosinophile-peroxydase (EPO) et de la myéloperoxydase (MPO) dans les sérums et les tissus des organes (cœur, poumons, foie et reins) des souris témoins et envenimées.

2.2.3.1 Evaluation de l'activité de l'éosinophile-peroxydase

L'activité de l'éosinophile-peroxydase a été évaluée selon la méthode de Van Oosterhout et *al.*, (1996). Les surnageant S1 et les sérums sont dilués dix fois dans du tampon Tris 0,05 M, pH 8. Dans une microplaque à 96 puits, les échantillons (50 µl) sont ajoutés à 100 µl du réactif [contenant 0,2% d'O-phénylènediamine (OPD) dans le tampon Tris 0,05 M et 0,03% de H₂O₂, pH 8]. L'absorbance est mesurée à 490 nm avant et après incubation pendant 60 min. L'activité de l'EPO est exprimée en unité de densité optique UDO_(490 nm)/min/g de tissu (Van Oosterhout et *al.*, 1996).

2.2.3.2 Evaluation de l'activité de la myéloperoxydase

L'évaluation de l'activité de la myéloperoxydase était basée sur la formation de produits colorés résultant de la transformation du substrat d'o-diazinidine (Krawisz et *al.*, 1984). Les échantillons (100 µl de S2 ou de sérums) sont ajoutés à 900 µl du réactif [contenant du tampon phosphate 50 mM, 0,167 mM d'o-diazinidine et 0,03% de H₂O₂, pH 6]. L'augmentation de l'absorbance est suivie à 460 nm pendant 3 minutes ($\epsilon = 11,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). L'activité de la MPO est exprimée en µM de substrat transformé/min/g de tissu.

2.2.4 Etude de la balance oxydative

2.2.4.1 Evaluation des biomarqueurs pro-oxydants

2.2.4.1.1 Evaluation de la concentration des nitrites résiduels

La production de nitrites, un indicateur de la synthèse de NO, est mesurée en se basant sur la réaction de Griess modifiée (Sun et *al.*, 2003). Les échantillons (100 µl de S1, des sérums ou des homogénats et des surnageants de culture) sont déposés sur une microplaque, auxquels sont ajoutés 50 µl du réactif de Griess B (5% de sulfanilamide dans l'acide phosphorique à 20%) puis 50 µl du réactif de Griess A (0,5% de N-1- Naphtylènediamine dans l'acide o-phosphorique à 20%). Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, la lecture de l'absorbance est effectuée à 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Biotek).

Les taux de nitrites sont exprimés en mM de nitrites résiduels/g de tissu en utilisant le NaNO₂ comme standard.

2.2.4.1.2 Evaluation de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est estimée par la détermination du taux de malondialdéhyde (MDA). Les échantillons (100 µl de S1, des sérums ou des homogénats et des surnageants de culture) sont ajoutés à 800 µl du mélange réactionnel [contenant 200 µl de l'acide thiobarbiturique (TBA) à 0,6% dans 20% d'acide acétique et 600 µl d'acide o-phosphorique à 1%]. Le mélange est incubé pendant 1 h à 95°C. Après refroidissement, le MDA est extrait à l'aide de 900 µl de n-butanol. Le mélange est ensuite centrifugé à 5000 g pendant 10 min. La lecture de l'absorbance est effectuée à 532 nm ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La peroxydation lipidique est exprimée en µM/min/g de tissu.

2.2.4.2 Evaluation des biomarqueurs antioxydants

2.2.4.2.1 Evaluation de l'activité de la catalase

L'évaluation de l'activité de la catalase est effectuée selon la méthode d'Aebi modifiée (Aebi, 1984). Les échantillons (100 µl de S1, de sérums ou d'homogénats et de surnageants de culture) sont ajoutés à 2,9 ml du mélange réactionnel (0,03 % de H₂O₂ dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7,0). La diminution de l'absorbance à 240 nm a été suivie pendant les deux premières minutes. L'activité enzymatique a été exprimée en M/min/g de tissu ($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.2.4.2.2 Evaluation de la concentration du glutathion réduit

L'évaluation de la concentration du glutathion est effectuée selon la méthode décrite précédemment (Riener et al., 2002). Des échantillons (50 µl de S1, de sérums ou d'homogénats et de surnageants de culture) sont mélangés avec 100 µl du tampon phosphate 0,1 mM (pH 7,4) contenant de l'EDTA à 5 mM et 50 µl d'acide 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoïque (40%). Après incubation à 37°C pendant 30 min, l'absorbance est lue à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Biotek). La concentration du GSH réduit est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 14150 M⁻¹cm⁻¹. Les résultats sont exprimés en mM de GSH/g de tissu.

2.2.5 Analyse histologique

Les altérations tissulaires causées par le venin de *C. cerastes* ont été évaluées par une étude histologique du myocarde et des parenchymes pulmonaire, rénal et hépatique. Une dose de 48µg du venin/souris a été injectée aux souris par voie intrapéritonéale en présence et en absence de prétraitements (la spironolactone, le celecoxib, le L-NAME et la vitamine C). Le sacrifice a été réalisé après 24h d'envenimation. Les tissus des organes (foie, cœur, rein et poumon) ont été prélevés puis fixés dans une solution fixatrice (formol à 10%) pendant 24-48 h à température ambiante. Afin d'éliminer le fixateur, les prélèvements ont été déshydratés avec trois bains d'alcool de degré croissant (70°, 90°, 100°) suivis de deux bains de xylène. Les pièces déshydratées sont incorporés dans deux bains de paraffine avant la confection des blocs, afin d'obtenir une consistance ferme nécessaire à la coupe. Le bloc de paraffine contenant les fragments tissulaires sont coupés en couches minces d'une épaisseur de 5µm et les rubans obtenus sont étalés sur des lames en verre. Après déparaffinage avec deux bains de xylène, les coupes sont hydratées en passant dans trois bains d'alcool de degré décroissant (100°, 90°, 70°), elles sont ensuite colorées avec l'hématoxyline-l'éosine. La coloration est suivie par une deuxième étape de déshydratation. Les lames sont observées au microscope photonique (Motic Digital Microscope PAL System).

2.2.6 Analyse spectrale UV-visible de la fraction D3

Afin de déterminer si la fraction cytotoxique D3 est peptidique, une analyse du spectre d'absorption a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible à double faisceaux, la longueur d'onde d'absorption de la fraction D3 est ensuite déterminée.

2.2.7 Analyse statistique

L'analyse statistique est effectuée en utilisant le programme « Origin Pro 8.5 ». Les résultats sont analysés par le test de l'analyse de la variance (ANOVA One-way), suivie d'un test de Tukey, les données sont considérées comme statistiquement significatives si $p < 0,05$.

Résultats et Discussion

3 Résultats et discussion

3.1 Evaluation *in vivo* de la cytotoxicité induite par le venin de *Cerastes cerastes*

3.1.1 Infiltration des cellules inflammatoires induite par le venin de *C. cerastes*

La myeloperoxydase (MPO) est une hémoprotéine, caractéristique des granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles, l'éosinophile peroxydase (EPO) est une protéine cationique localisée dans les granules azurophiles des éosinophiles. La MPO et l'EPO sont utilisées comme marqueurs de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles et eosinophiles dans de nombreuses pathologies inflammatoires (Bradley *et al.*, 1982; Serateyn *et al.*, 2003).

Dans cette étude, la réponse inflammatoire est évaluée en identifiant les cellules immunitaires infiltrées et activées au niveau des tissus suite à l'envenimation, en mesurant les activités de l'EPO et de la MPO dans les sérums et les homogénats des tissus. Les résultats obtenus ont montré une augmentation significative des activités de la MPO et de l'EPO dans les sérums et dans les tissus du myocarde et du parenchyme pulmonaire après 3, 24 et 48 h d'envenimation. Aucune modification significative des activités de l'EPO et de la MPO n'est cependant observée avant 24 h d'envenimation dans les tissus hépatique et rénal (Figure 13 et 14).

L'augmentation significative des activités de l'EPO et de la MPO dans les sérums et dans les tissus peut être due à l'effet cytotoxique des composants du venin qui peuvent induire une altération aiguë de l'intégrité de la membrane, un recrutement de cellules immunitaires au niveau des sites inflammatoires et une inflammation systémique affectant la majorité des organes.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux d'une étude réalisée sur la réponse inflammatoire induite par le venin de *C. cerastes*. Cette étude a montré que le venin de *Cerastes cerastes* induit une augmentation significative des cytokines pro-inflammatoires libérées par les cellules inflammatoires et qui contribuent, à leur tour, au recrutement de nouvelles cellules immunitaires (Chérifi *et al.*, 2014).

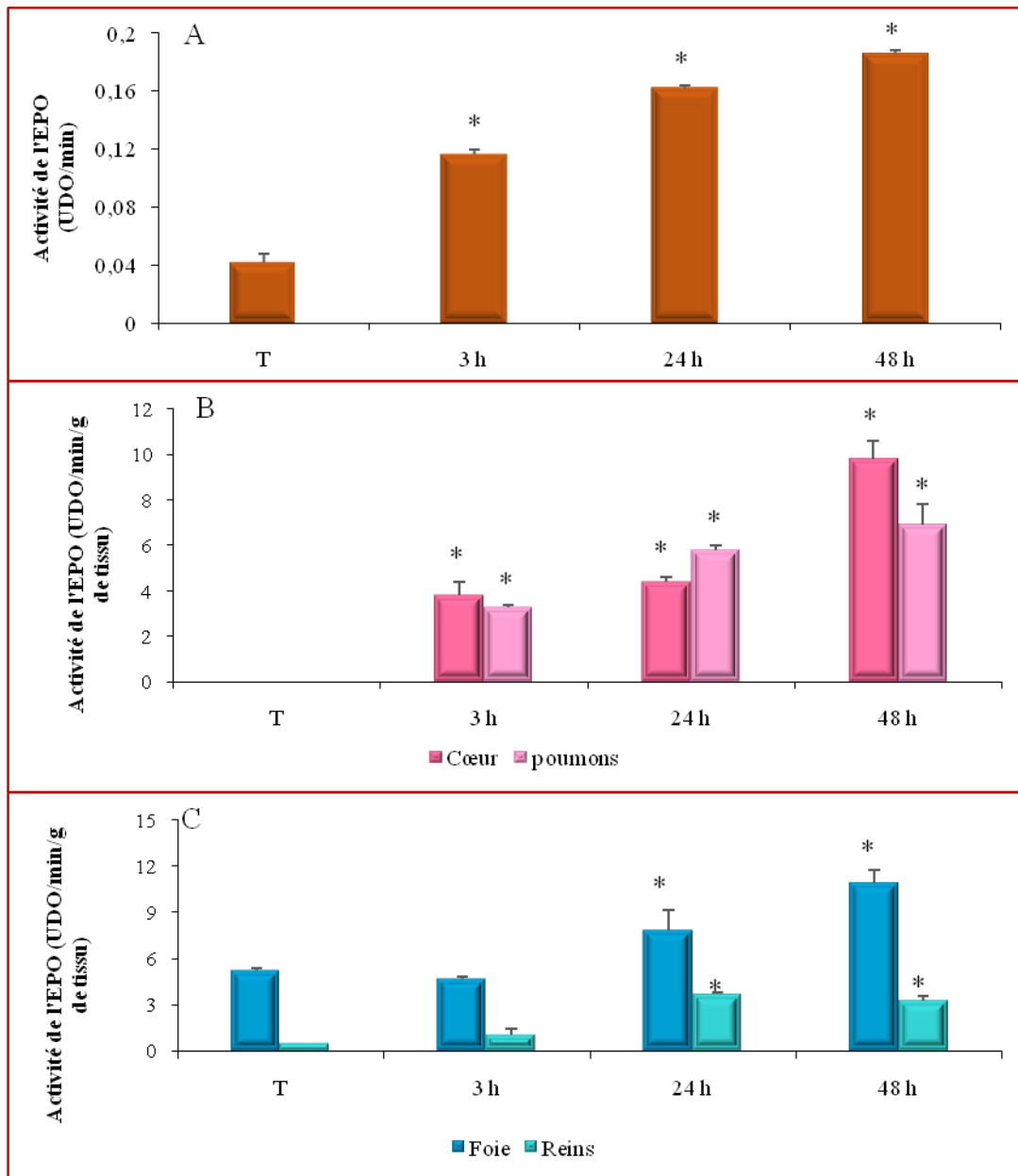


Figure 13: Effet d'une DL50 du venin de *Cerastes cerastes* sur l'activité enzymatique de l'éosinophile peroxydase. L'activité de l'EPO est mesurée dans les sérums (A), dans le myocarde et le parenchyme pulmonaire (B) et dans les tissus hépatique et rénal (C) après 3, 24 et 48 h d'envenimation des souris. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM.

* $P < 0,05$: Activité de l'EPO des groupes de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparée à celle du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

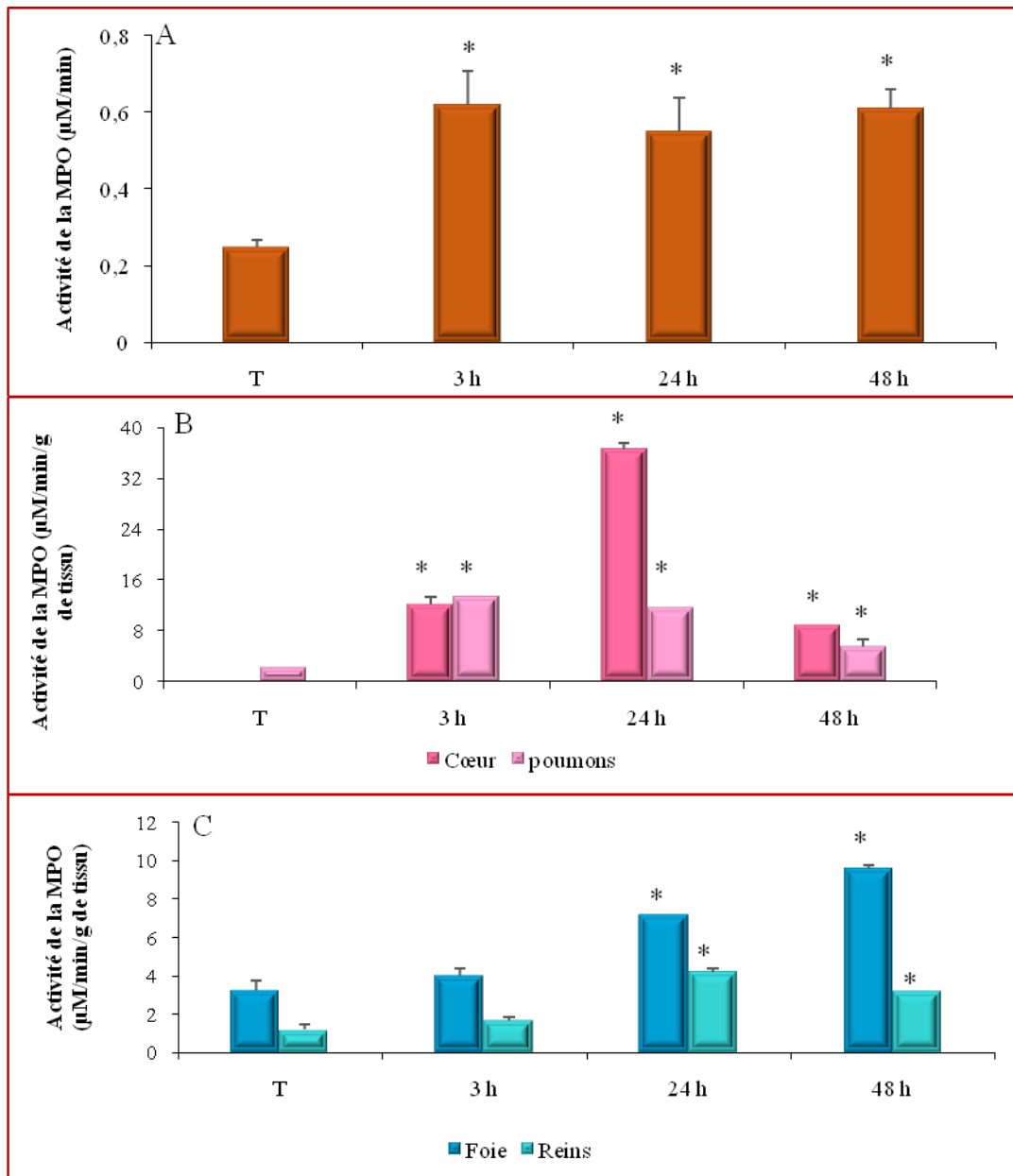


Figure 14: Effet d'une DL50 du venin de *Cerastes cerastes* sur l'activité enzymatique de la myéloperoxydase. L'activité de la MPO est mesurée dans les sérums (A), dans le myocarde et le parenchyme pulmonaire (B) et dans les tissus hépatique et rénal (C) après 3, 24 et 48 h d'envenimation des souris. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM.

* $P < 0,05$: Activité de la MPO des groupes de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparée à celle du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

3.1.2 Déséquilibre redox induit par le venin de *Cerastes cerastes*

Les paramètres du stress oxydatif sont évalués dans les sérums et les homogénats des tissus cardiaque, pulmonaire, hépatique et rénal après envenimation. L'évaluation des médiateurs pro-oxydants a montré une augmentation significative des taux de nitrites résiduels et de MDA à 3 h après l'envenimation dans les sérums et dans les homogénats des tissus cardiaque et pulmonaire et après 24-48 h dans les homogénats des tissus hépatique et rénal (Figure 15 et 16). La capacité en antioxydant de chaque organe semble être impliquée dans la cinétique d'apparition du stress oxydatif. Vu que la vitamine C, par exemple, qui est un antioxydant très puissant, est synthétisée chez la plupart des mammifères que dans le foie ou le rein (Haleng *et al.*, 2007).

Le système de défense antioxydant est évalué par mesure de l'activité de la catalase ainsi que par la détermination des taux de GSH. Les résultats obtenus ont montré que l'activité de la catalase ; une enzyme impliquée dans le maintien du faible taux des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ; diminue après 3 h au niveau sérique, cardiaque et pulmonaire, et après 24 h dans les tissus hépatiques et rénaux (Figure 17). Le glutathion réduit (GSH) diminue également après 3 h au niveau sérique et après 24 h au niveau tissulaire (Figure 18).

Les agents antioxydant éliminent la plupart des oxydants libérés, limitant ainsi les lésions tissulaires jusqu'à l'inhibition de la réponse inflammatoire. A des concentrations très élevées en ERO, la capacité des systèmes de défense pourrait être dépassée, entraînant un déséquilibre entre la production et la consommation des agents antioxydants (Pasquier, 1995).

L'inflammation induit une activation de la NOS inducible (iNOS) et une surproduction du monoxyde d'azote. Ce dernier réagit avec les ERO conduisant à l'oxydation des acides gras polyinsaturés et à la formation du MDA, qui est un des biomarqueurs les plus importants du stress oxydatif (Uchiyama *et Mihara*, 1978).

Au niveau du myocarde des patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique, une réduction de l'activité de l'eNOS et une augmentation de l'activité iNOS ont été rapportées (De Belder *et al.*, 1993). Dans les cellules myocardiques isolées, l'iNOS est induite par des stimuli cytokiniques (Balligand *et al.*, 1994). L'expression de l'iNOS en réponse au venin de *Cerastes cerastes* semble induire une libération excessive et continue du NO en association avec la formation de ROS, provoquant ainsi des dégâts tissulaires.

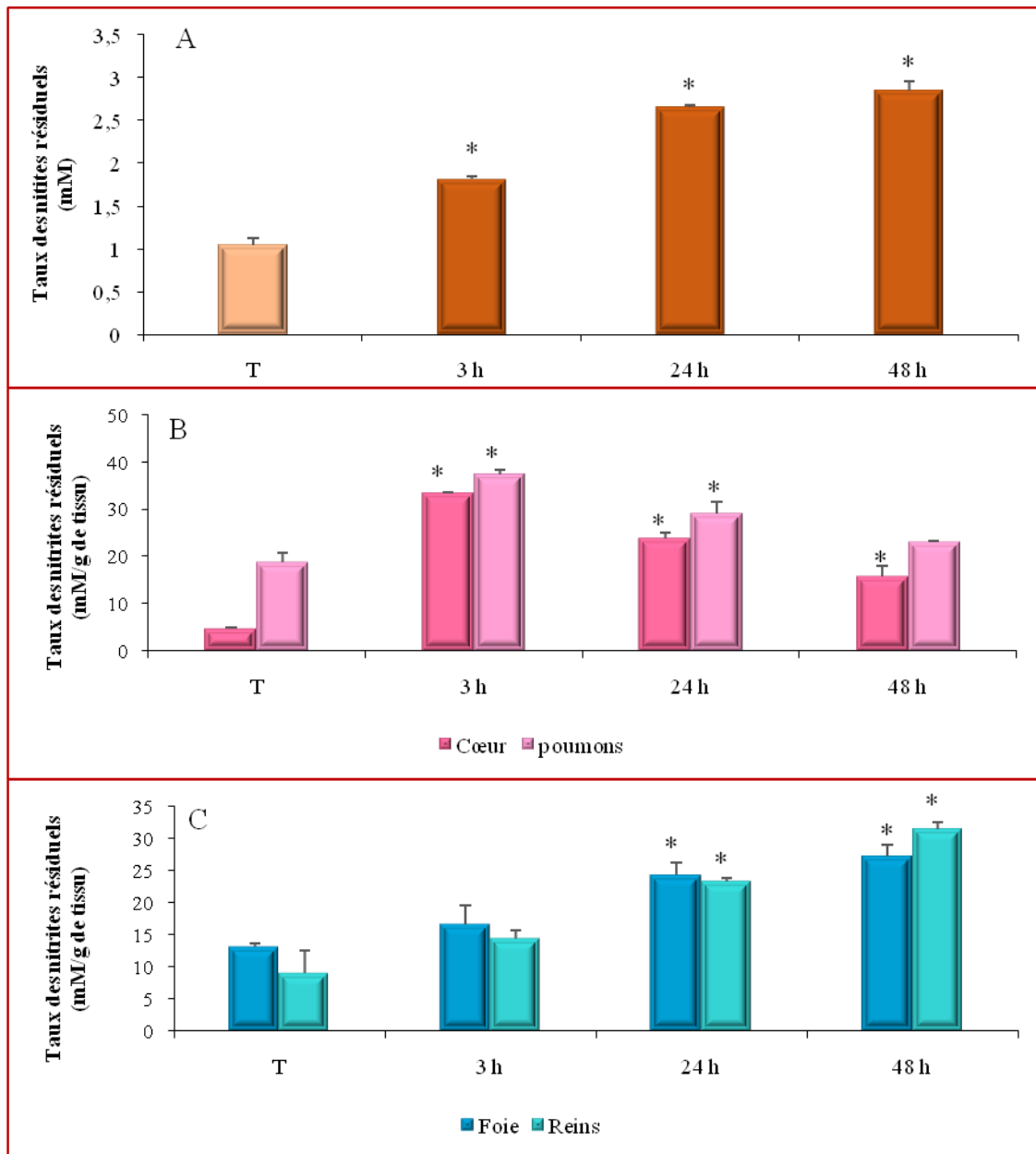


Figure 15 : Effet d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes* sur le taux des nitrites résiduels. Le taux des nitrites résiduels a été mesuré dans les sérums (A), dans le myocarde et le parenchyme pulmonaire (B) et dans les tissus hépatique et rénal (C) après 3, 24 et 48 h d'envenimation des souris. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM.

* $P < 0,05$: Taux des nitrites résiduels des groupes de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparé à celui du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

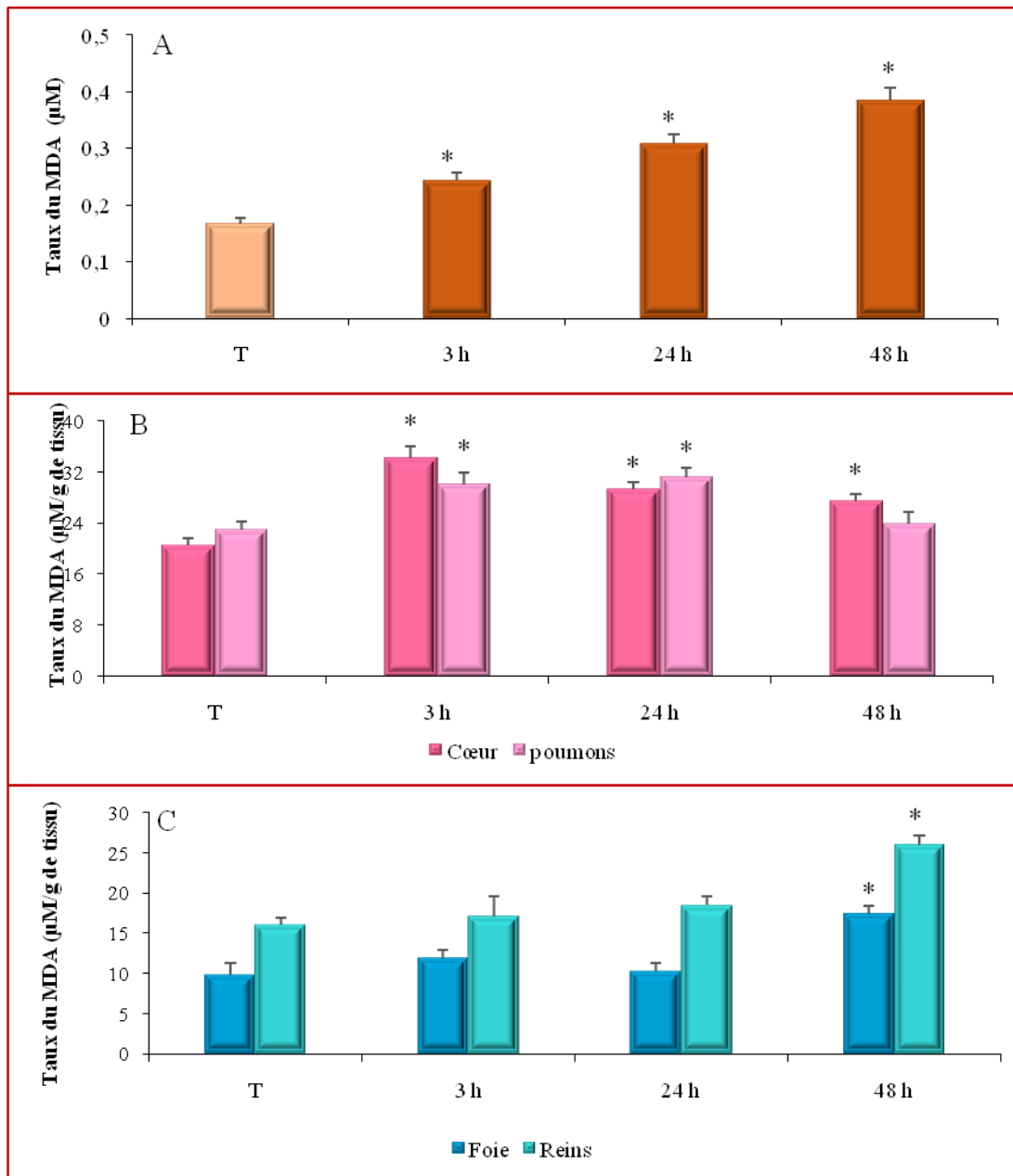


Figure 16 : Effet d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes* sur le taux de malondialdéhyde. Le taux du MDA a été mesuré dans les sérums (A), dans le myocarde et le parenchyme pulmonaire (B) et dans les tissus hépatique et rénal (C) après 3, 24 et 48 h d'envenimation des souris. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM.

* $P < 0,05$: Taux du MDA des groupes de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparé à celui du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

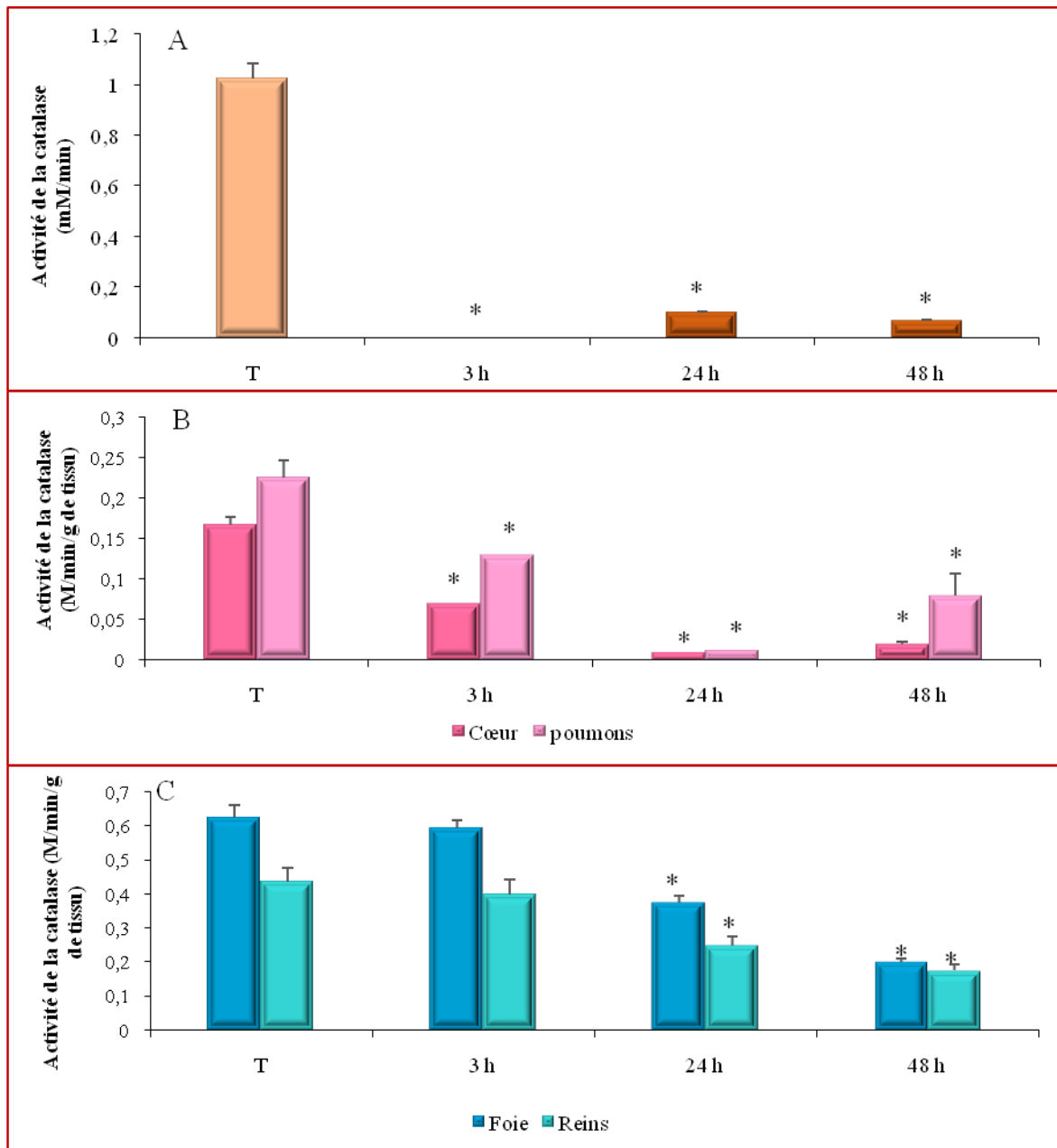


Figure 17 : Effet d'une DL50 du venin de *Cerastes cerastes* sur l'activité enzymatique de la catalase. L'activité de la catalase a été mesurée dans les sérums (A), dans le myocarde et le parenchyme pulmonaire (B) et dans les tissus hépatique et rénal (C) après 3, 24 et 48 h d'envenimation des souris. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM.

* $P < 0,05$: Activité de la catalase des groupes de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparée à celle du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

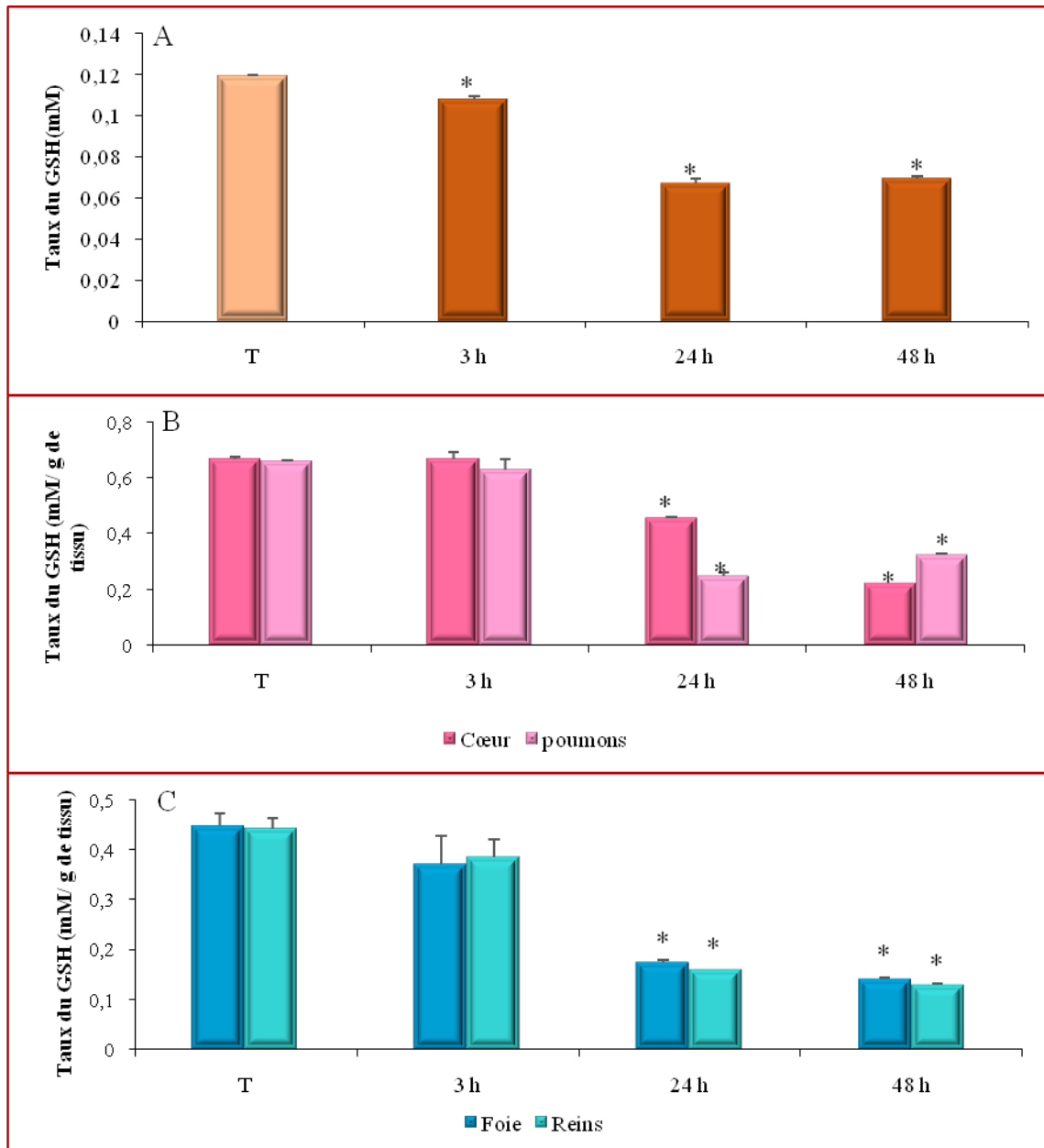


Figure 18 : Effet d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes* sur le taux de glutathion réduit. Le taux du GSH a été mesuré dans les sérums (A), dans le myocarde et le parenchyme pulmonaire (B) et dans les tissus hépatique et rénal (C) après 3, 24 et 48 h d'envenimation des souris. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM.

* $P < 0,05$: Taux du GSH des groupes de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparé à celui du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

3.1.3 Effet du venin de *Cerastes cerastes* sur le myocarde et les parenchymes pulmonaire, rénal et hépatique

Le myocarde, les parenchymes pulmonaire, rénal et hépatique des animaux injectés avec le venin de *C. cerastes* ont montré des altérations sévères associées à une infiltration de cellules inflammatoires. Les altérations au niveau du myocarde sont caractérisées par une dégénérescence des fibres myocardiques, un œdème interstitiel et une hémorragie (Figure 19B).

Les altérations observées au niveau du parenchyme pulmonaire sont caractérisées par des œdèmes et une forme irrégulière des alvéoles entourées par des cloisons épaisses (Figure 19D).

Il semble que le venin de *Cerastes cerastes* a induit une dégénérescence des hépatocytes associée à une augmentation du nombre de noyaux pycnotiques, une dilatation de la paroi sinusoïdale et une congestion de la veine centro-lobulaire (Figure 19F).

Des altérations au niveau du cortex, caractérisées par des lésions tubulaires aiguës, une perte de l'architecture des tubules, des nécroses, une hémorragie et un œdème interstitiel associé à une infiltration des cellules inflammatoires sont observées au niveau du tissu rénal des souris envenimées. Une dilatation des tubules et des fragments de cellules sont observés au niveau de la lumière tubulaire. Les glomérules présentent des espaces capsulaires élargies (Figure 19H). L'analyse tissulaire des animaux témoins a révélé une architecture normale (Figure 19A, C, E et G).

Les résultats de l'analyse histologique montrent une corrélation entre les lésions tissulaires induites par le venin de *C. cerastes*, l'infiltration des cellules immunitaires et l'augmentation des activités de l'EPO et de la MPO. Des altérations tissulaires similaires ont été observées au niveau du parenchyme hépatique et de myocarde après injection d'une dose équivalente à 2 DL50 du venin de *Cerastes cerastes* de l'Égypte (Salama et al., 2018).

Les différentes populations cellulaires infiltrées au niveau des tissus lésés seraient impliquées dans le développement des dommages tissulaires suite à la sécrétion de nombreux médiateurs de l'inflammation. En effet, la production de l'interleukine 8 par les cellules endothéliales sous l'effet du venin entraînerait l'adhésion des polynucléaires et leur migration à travers l'endothélium vasculaire vers les tissus. Les polynucléaires activés libèrent des médiateurs tels que les protéases et les radicaux libres oxygénés. Ces médiateurs seraient à l'origine du déclenchement des lésions tissulaires (D'suze et al., 2003; Coelho et al., 2007).

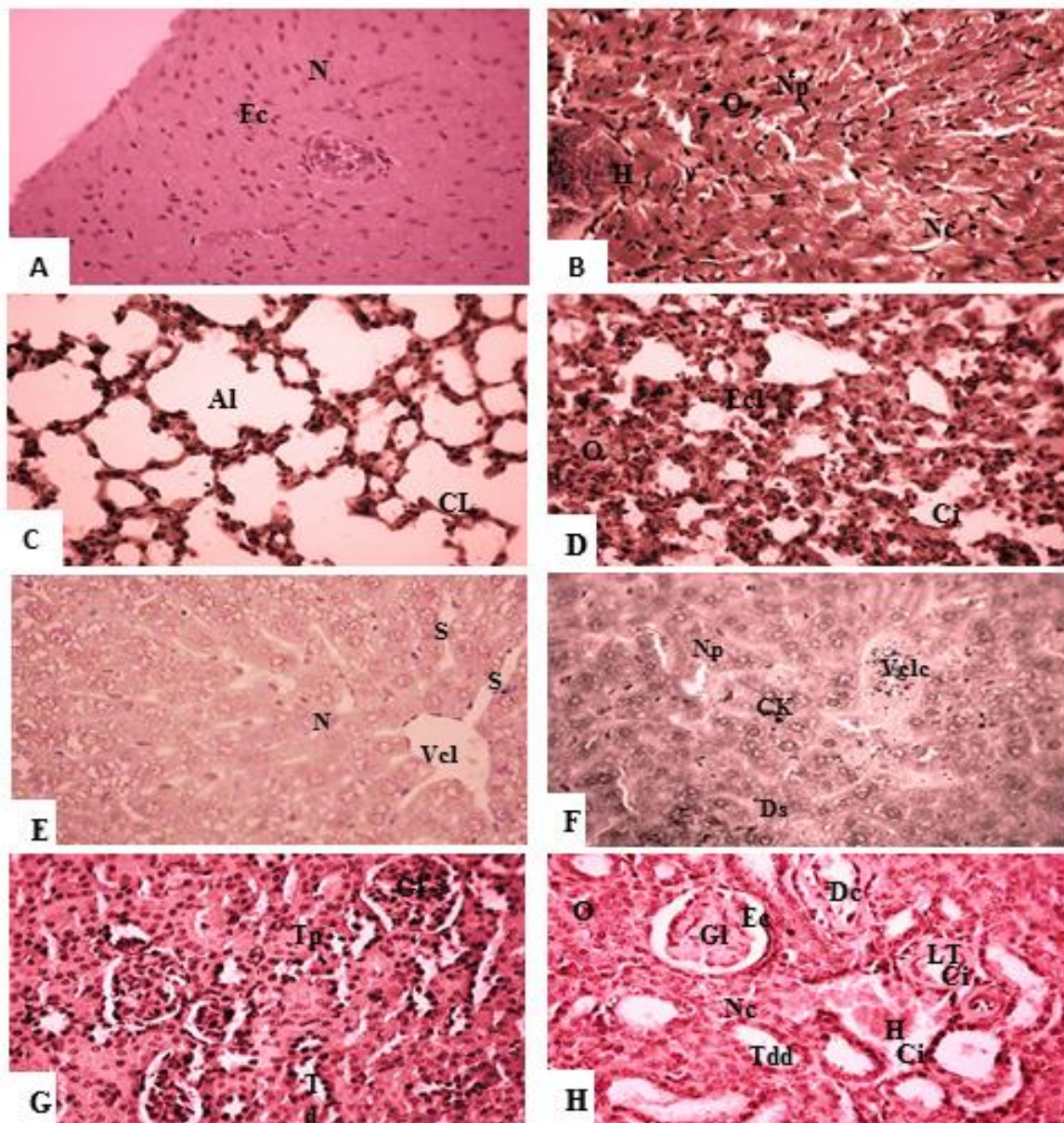


Figure 19 : Altérations histologiques induites par le venin de *Cerastes cerastes* au niveau du myocarde et des parenchymes hépatique, pulmonaire et rénal : les panels (A, C, E et G) montrent respectivement des contrôles des tissus cardiaque, pulmonaire, hépatique et rénal. Les panels (B, D, F et H) montrent les modifications histologiques au niveau des tissus cardiaque, pulmonaire, hépatique et rénal après 24 h d'envenimation. VCL: Veine centrolobulaire, CCLV: Veine centrolobulaire congestionnée , CK: Cellule de Kupffer, N: noyaux, NP: Noyaux pycnotiques, S : sinusoire, DS: dilatation sinusoidale, Al: Alvéole, Ci: cellules inflammatoires, O: Oedème, Ecl: épaissement de cloison intra-alvéolaire, Fc: fibres cardiaques et H: hémorragie, G : Glomérule, TP : tube proximal, Td : tube distale, Tdd : tube distale dilaté, Dc : débris cellulaires, Ec : espace capsulaire, LT : lésion tubulaire (Coloration H.E. Grossissement x 400).

Une étude antérieure a montré que les lésions dans le tissu hépatique causées par le venin de *Naja haje* sont corrélées avec une élévation au niveau sérique de la bilirubine totale, de l'alanine aminotransférase, de l'aspartate aminotransférase, de la γ -glutamyltranspeptidase et de la phosphatase alcaline sériques reflétant une hépatotoxicité aiguë (Al-Quraishy et al., 2014).

3.2 Caractérisation pharmacologique de la cytotoxicité, de l'inflammation et du stress oxydatif induits par le venin de *C. cerastes*

3.2.1 Evaluation de l'implication des récepteurs minéralocorticoïdes dans la cytotoxicité, l'inflammation et le stress oxydatif induits par le venin de *C. cerastes*

3.2.1.1 Evaluation de l'implication des récepteurs minéralocorticoïdes dans la cytotoxicité induite par le venin de *C. cerastes*

L'effet de la spironolactone, antagoniste de l'aldostérone, sur la cytotoxicité (*in vivo*) du venin de *Cerastes cerastes* a été déterminé par l'évaluation du rapport du nombre de souris vivantes sur le nombre total de souris, après administration du traitement préalablement à l'injection d'une DL50 du venin de *Cerastes cerastes*. Les résultats montrent une augmentation du pourcentage de viabilité des souris envenimées prétraitées par la spironolactone dont la viabilité est de 100% (4 souris vivantes/4) comparée à celle du lot de souris envenimées n'ayant subi aucun traitement (2 souris vivantes/4) (Figure 20).

La spironolactone semble avoir un effet protecteur en réduisant le nombre de mortalité suite à une envenimation par *Cerastes cerastes*. Des études récentes ont montré que la spironolactone est efficace pour le traitement de l'hypertension, du syndrome métabolique, des maladies rénales chroniques et de la néphropathie diabétique lorsqu'elle est utilisée seule à forte dose ou à faible dose mais combinée avec une thérapie de fond. Elle exerce également des propriétés anti-arythmiques et réduit les hospitalisations et la mortalité chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque chronique ou d'infarctus post-cérébrale (Struthers et Unger, 2011; Messaoudi et al., 2012; Brown, 2013; Tamargo et al., 2014; Bauersachs et al., 2015; Schwenk et al., 2015).

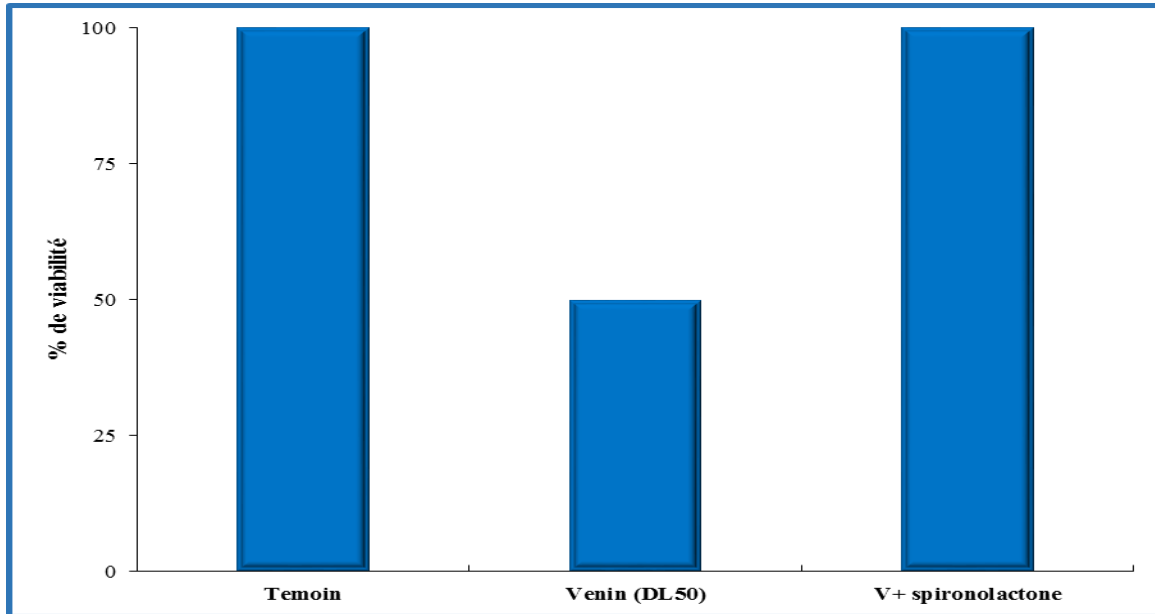


Figure 20 : Evaluation de l'effet de la spironolactone sur la toxicité induite *in vivo* par le venin de *Cerastes cerastes*. La cytotoxicité testée *in vivo* est évaluée par la mesure du pourcentage de viabilité des souris après administration de la spironolactone préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

3.2.1.2 Evaluation de l'implication des récepteurs minéralocorticoïdes dans l'inflammation induite par le venin de *Cerastes cerastes*

L'effet de la spironolactone sur l'inflammation induite par le venin de *Cerastes cerastes* est évalué par la mesure de l'activité enzymatique de la myéloperoxydase et éosinophile peroxydase dans le sérum et dans les tissus.

Une réduction significative des activités enzymatiques EPO et MPO est observée au niveau des sérums des souris envenimées prétraitées avec la spironolactone comparées à celles du lot des souris envenimées n'ayant reçu aucun traitement (Figure 21).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent également que l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs minéralocorticoïdes (RM), semble réduire considérablement l'infiltration des neutrophiles et des éosinophiles au niveau tissulaire induite par le venin de *Cerastes cerastes* (Figure 22). La spironolactone semble prévenir le recrutement des neutrophiles et des éosinophiles vers les organes cœur, poumons, foie et reins, en réponse au venin de *Cerastes cerastes*.

L'étude réalisée sur un modèle de souris de dystrophie musculaire de Duchenne a montré que les cellules myéloïdes infiltrées et regroupées dans les tissus endommagés présentent la capacité de produire le ligand naturel des récepteurs minéralocorticoïdes (RM), l'aldostérone, qui en excès, augmente les dommages tissulaires (Chadwick et al., 2016b). Cette étude a montré que les cellules qui expriment les enzymes clés impliquées dans la synthèse de l'aldostérone tel que « l'aldostérone synthase » sont les macrophages et les neutrophiles (Chadwick et al., 2016b).

Des études antérieures sur des muscles dystrophiques ont montré que le traitement avec des glucocorticoïdes anti-inflammatoires peut déplacer les macrophages d'un phénotype M1 pro-inflammatoire vers un phénotype anti-inflammatoire M2 (de Carvalho et al., 2013). L'activation des récepteurs minéralocorticoïdes (RM) permet l'évolution des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire M1, alors que le traitement avec l'antagoniste non spécifique de RM la spironolactone favorise un phénotype anti-inflammatoire M2 (Bene et al., 2014). Ces données confirment que la spironolactone peut entraîner des effets anti-inflammatoires, contribuant ainsi à la prévention du recrutement des cellules inflammatoires vers les tissus observé chez les souris envenimées.

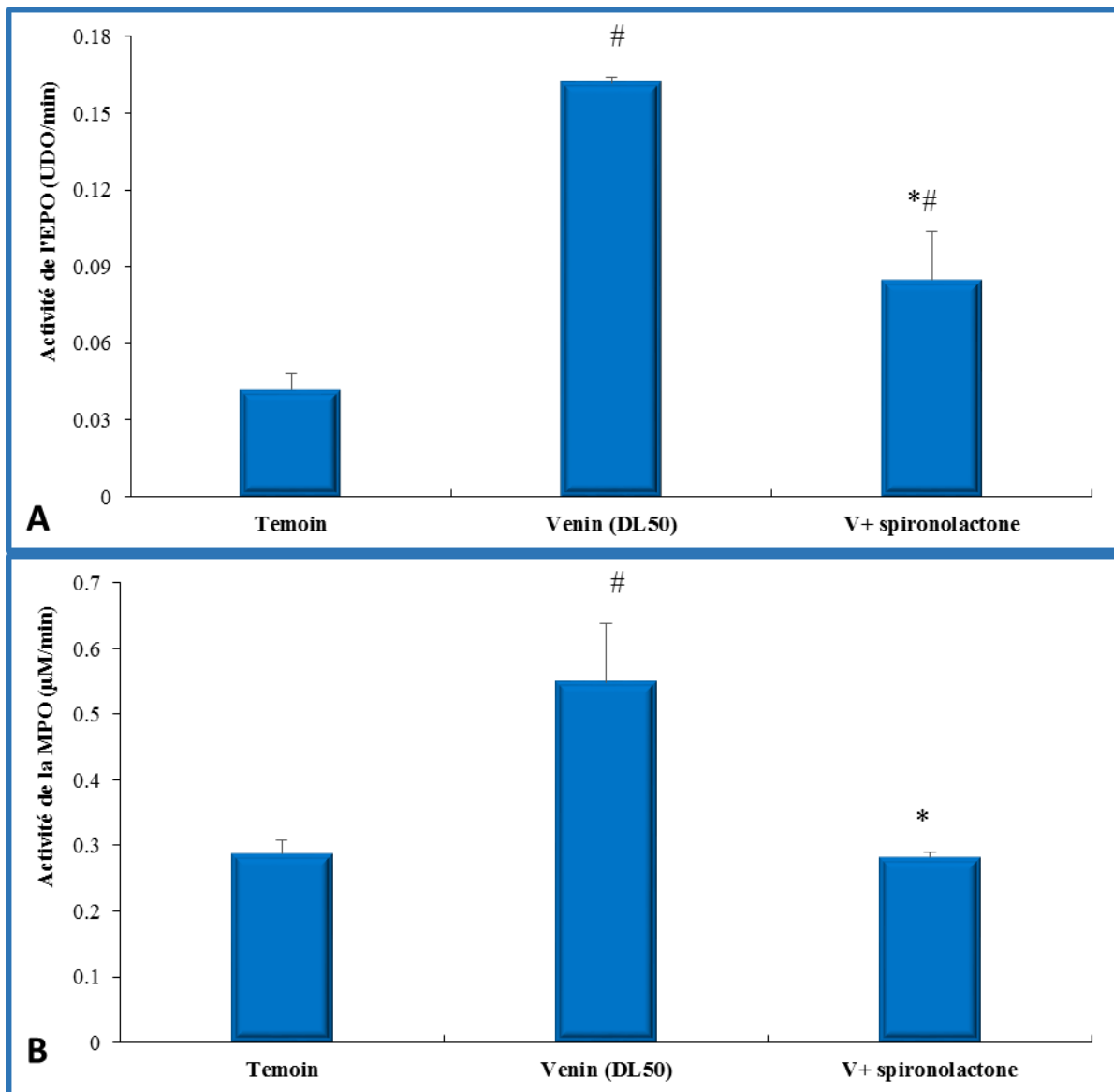


Figure 21 : Evaluation au niveau sérique de l'effet de la spironolactone sur l'activation des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles par le venin de *Cerastes cerastes*. L'activation des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles est évaluée par mesure des activités de l'éosinophile-peroxydase EPO (A) et de la myéloperoxydase MPO (B), après administration de la spironolactone préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

* $P < 0,05$; Activité de l'EPO ou de la MPO du groupe de souris prétraitées, comparée à celle du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Activité de l'EPO ou de la MPO du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparée à celle du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

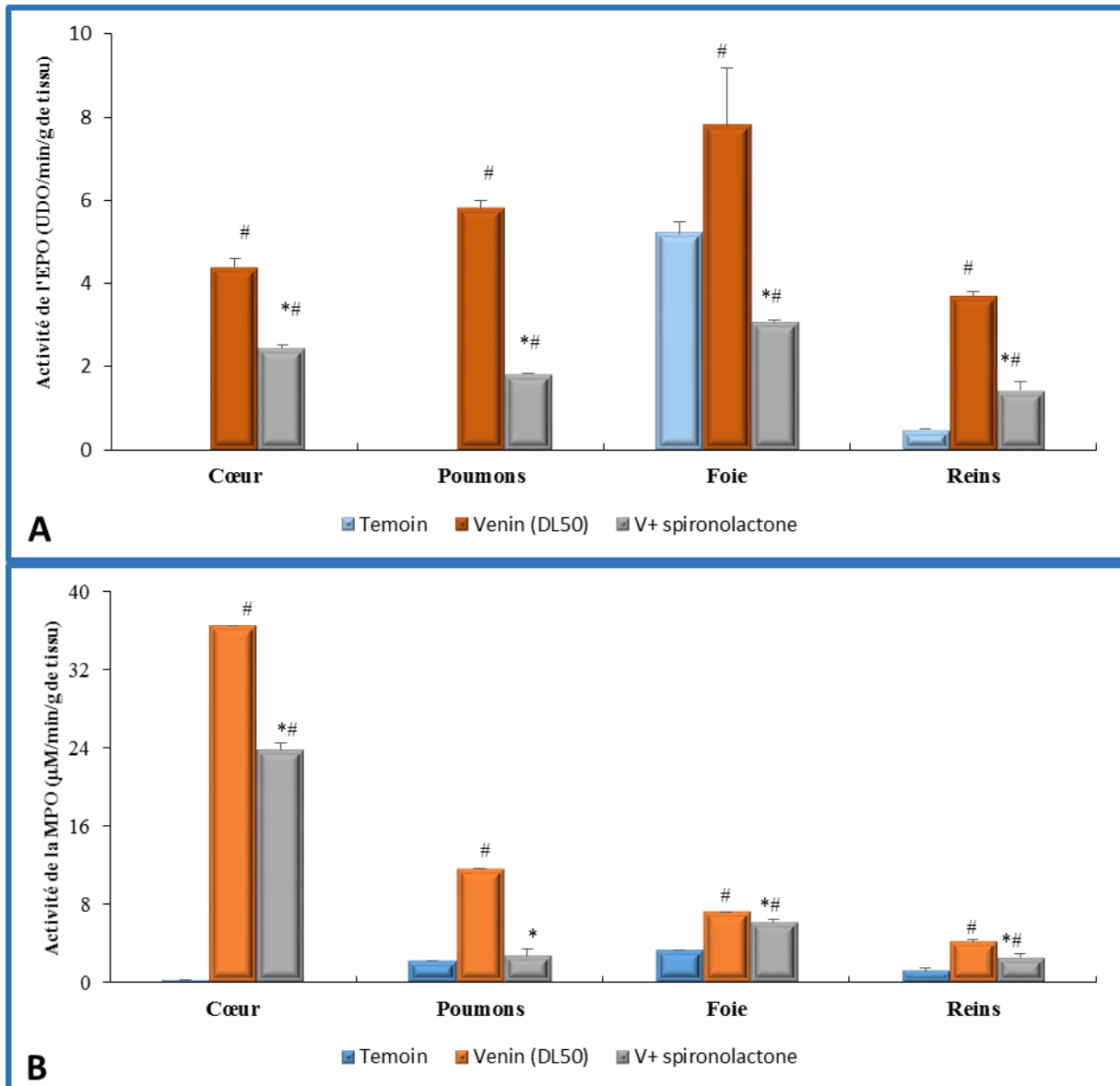


Figure 22 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet de la spironolactone sur l'inflammation induite par le venin de *Cerastes cerastes*. L'inflammation systémique est évaluée par la mesure de l'activité de l'EPO (A) et de la MPO (B) au niveau tissulaire, après administration de la spironolactone préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *C. cerastes*.

* $P < 0,05$; Activité de l'EPO ou de la MPO du groupe de souris prétraitées, comparée à celle du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Activité de l'EPO ou de la MPO du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparée à celle du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

3.2.1.3 Evaluation de l'implication des récepteurs minéralocorticoïdes dans le stress oxydatif induit par le venin de *Cerastes cerastes*

Les résultats obtenus montrent une diminution considérable des taux sériques du NO et de MDA après administration de la spironolactone préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes* avec une normalisation du taux de NO (Figure 23A et B).

Une augmentation significative de l'activité enzymatique de la catalase au niveau sérique, est également observée après administration de la spironolactone préalablement à l'injection d'une DL50 du venin de *Cerastes cerastes*. Cependant, le taux sérique de GSH reste proche de la valeur observée chez les animaux envenimés (Figure 23C et D).

Les résultats obtenus montrent une diminution significative des taux du NO et du MDA et une augmentation significative de l'activité enzymatique de la catalase au niveau tissulaire, après administration de la spironolactone préalablement à l'injection d'une DL50 du venin de *Cerastes cerastes*. Une augmentation significative des taux du GSH est observée au niveau du myocarde et du parenchyme hépatique. Les valeurs de GSH restent cependant proches de celles des animaux envenimés dans le sérum et les tissus rénal et hépatique (Figure 24). La spironolactone semble prévenir la formation du stress oxydatif, en réponse au venin de *Cerastes cerastes*.

Les récepteurs des minéralocorticoïdes semblent être impliqués dans le stress oxydatif induit par le venin de *C. cerastes*. L'activation des récepteurs des minéralocorticoïdes joue un rôle crucial dans la pathogenèse de plusieurs maladies cardiovasculaires, rénales et artérielles (Kolkhof et al., 2015). Une étude comparative de l'expression de plusieurs gènes associés au stress oxydatif, après traitement des myotubes humains par l'antagoniste de RM (spironolactone) ou l'agoniste de RM (aldostérone), a montré que le traitement avec l'aldostérone semble augmenter l'expression des gènes associés au stress oxydatif et que ces gènes sont inhibés par la spironolactone (Chadwick et al., 2015; Chadwick et al., 2016b). La spironolactone semble empêcher l'inflammation, le stress oxydatif et l'apoptose induits *in vitro* par l'aldostérone au niveau des muscles striés et *in vivo* dans le cas des insuffisances cardiaques (Burniston et al., 2005; Young et Rickard, 2012).

L'inhibition des récepteurs des minéralocorticoïdes semble prévenir l'activation et l'infiltration des leucocytes et l'induction du stress oxydatif en réponse au venin de *Cerastes cerastes* contribuant aussi à la prévention de la cytotoxicité induite par ce venin.

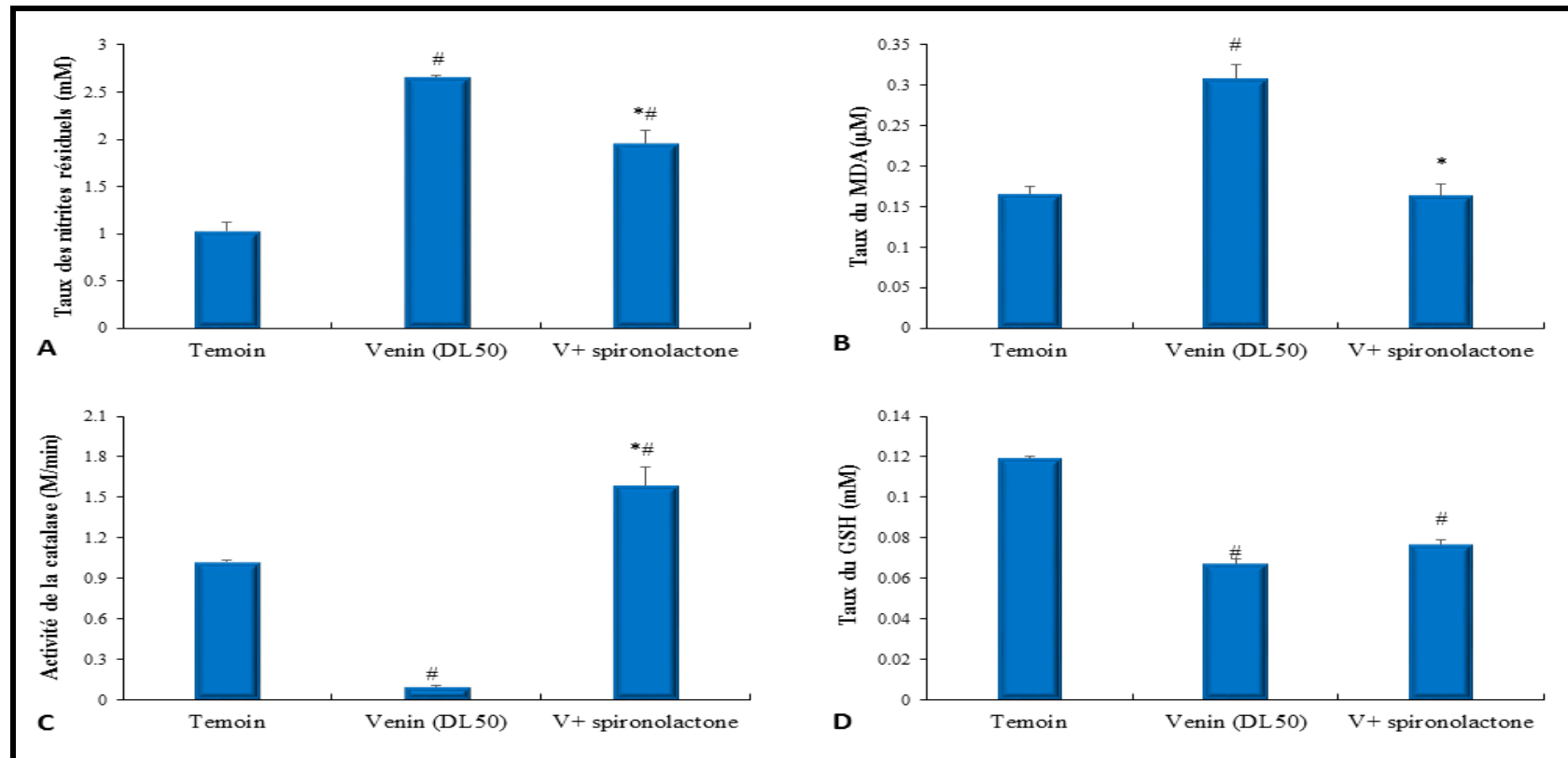


Figure 23 : Evaluation au niveau sérique de l'effet de la spironolactone sur le stress oxydatif induit par le venin de *Cerastes cerastes*. Le stress oxydatif est évalué par mesure des taux des nitrites résiduels (A) et des taux de Malondialdhyde MDA (B), de l'activité de la catalase (C) et des taux de GSH (D), après administration de la spironolactone préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

* $P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris prétraitées, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

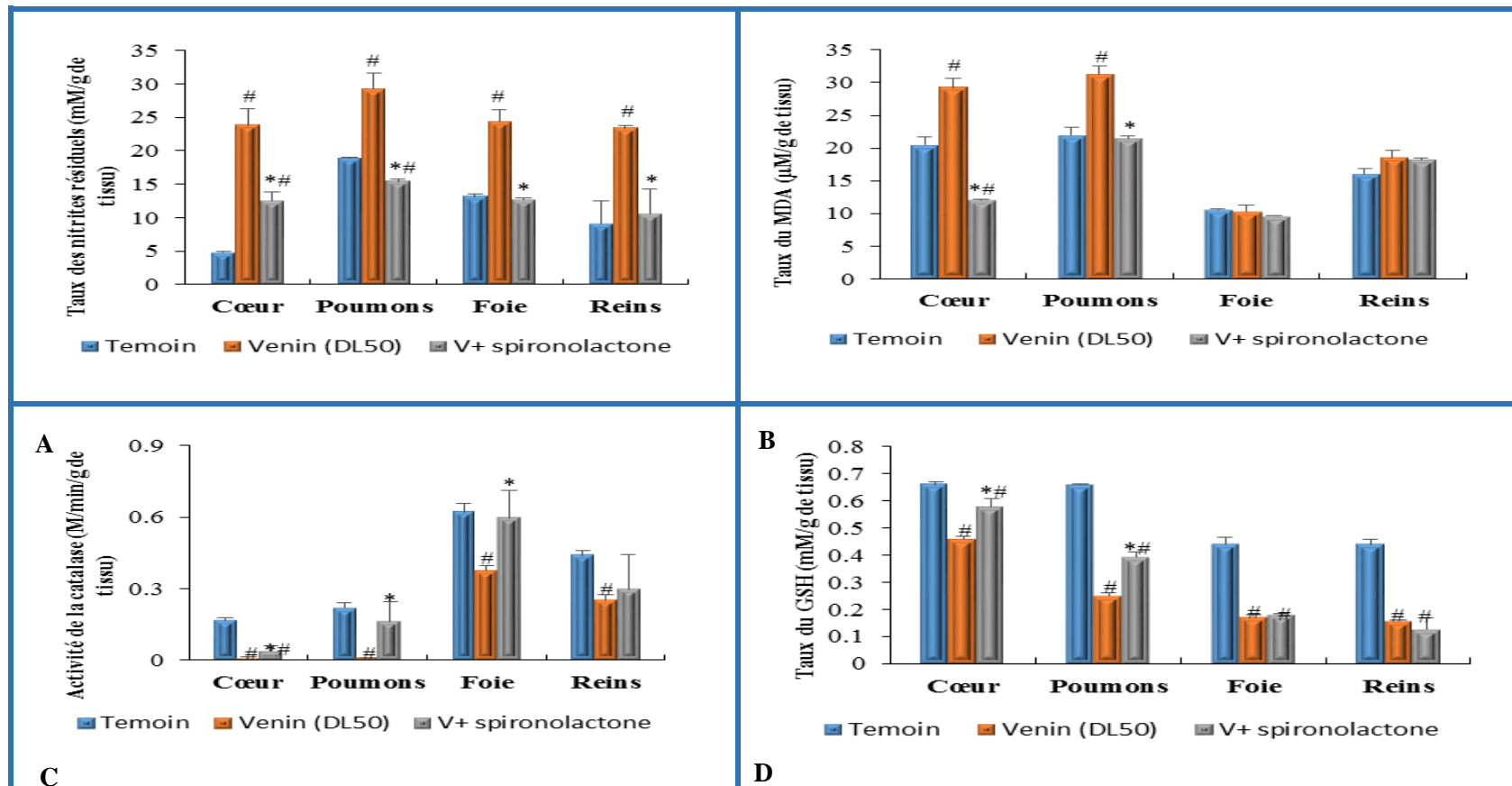


Figure 24 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet de la spironolactone sur le stress oxydatif induit par le venin de *Cerastes cerastes*.

Le stress oxydatif est évalué par la mesure des taux des nitrites résiduels (A) et des taux de Malondialdhyde MDA (B), de l'activité de la catalase (C) et des taux de GSH (D), après administration de la spironolactone préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

* $P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris prétraitées, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

3.2.1.4 Evaluation de l'effet de la spironolactone sur les altérations tissulaires induites par le venin de *Cerastes cerastes*

L'étude histologique a été réalisée au niveau du myocarde et des parenchymes pulmonaire, hépatique et rénale des souris envenimées recevant préalablement un prétraitement avec la spironolactone. L'antagoniste des récepteurs des minéralocorticoïdes utilisé semble réduire considérablement les altérations au niveau du myocarde induites par le venin de *C. cerastes*, les fibres myocardiques apparaissent identiques aux fibres des souris témoins. Une disparition de l'œdème interstitiel ainsi que l'hémorragie est observée (Figure 25A, B et C).

La spironolactone semble neutraliser partiellement les lésions pulmonaires et l'infiltration leucocytaire induites par le venin de *C. cerastes*. Un épaississement des parois alvéolaires est toujours observé, avec cependant une réduction de l'œdème et de l'hémorragique comparé au témoin (Figure 25D, E et F).

L'analyse du parenchyme hépatique a montré que la désorganisation est moins importante après prétraitement avec la spironolactone comparée à celle observée après administration d'une DL50 de venin de *C. cerastes*. Les cellules sont disposées en files radiaires autour de la veine centro-lobulaire non congestionnée avec une persistance de la dilatation de la paroi sinusoidale (Figure 25G,H et I).

L'administration de la spironolactone préalablement à l'envenimation, semble prévenir partiellement les altérations tissulaires induites par le venin de *C. cerastes* au niveau du cortex rénal. En effet, des tubules moins dilatés, une disparition de l'œdème et de l'hémorragie et une réduction des zones nécrotiques, sont observés. Une réduction de l'espace capsulaire est également observée (Figure 25J, K et L).

L'analyse histopathologique du myocarde et des parenchymes pulmonaire, hépatique et rénal des animaux prétraités avec la spironolactone a montré que les récepteurs minéralocorticoïdes semblent être impliqués dans la cytotoxicité induite par le venin de *C. cerastes*.

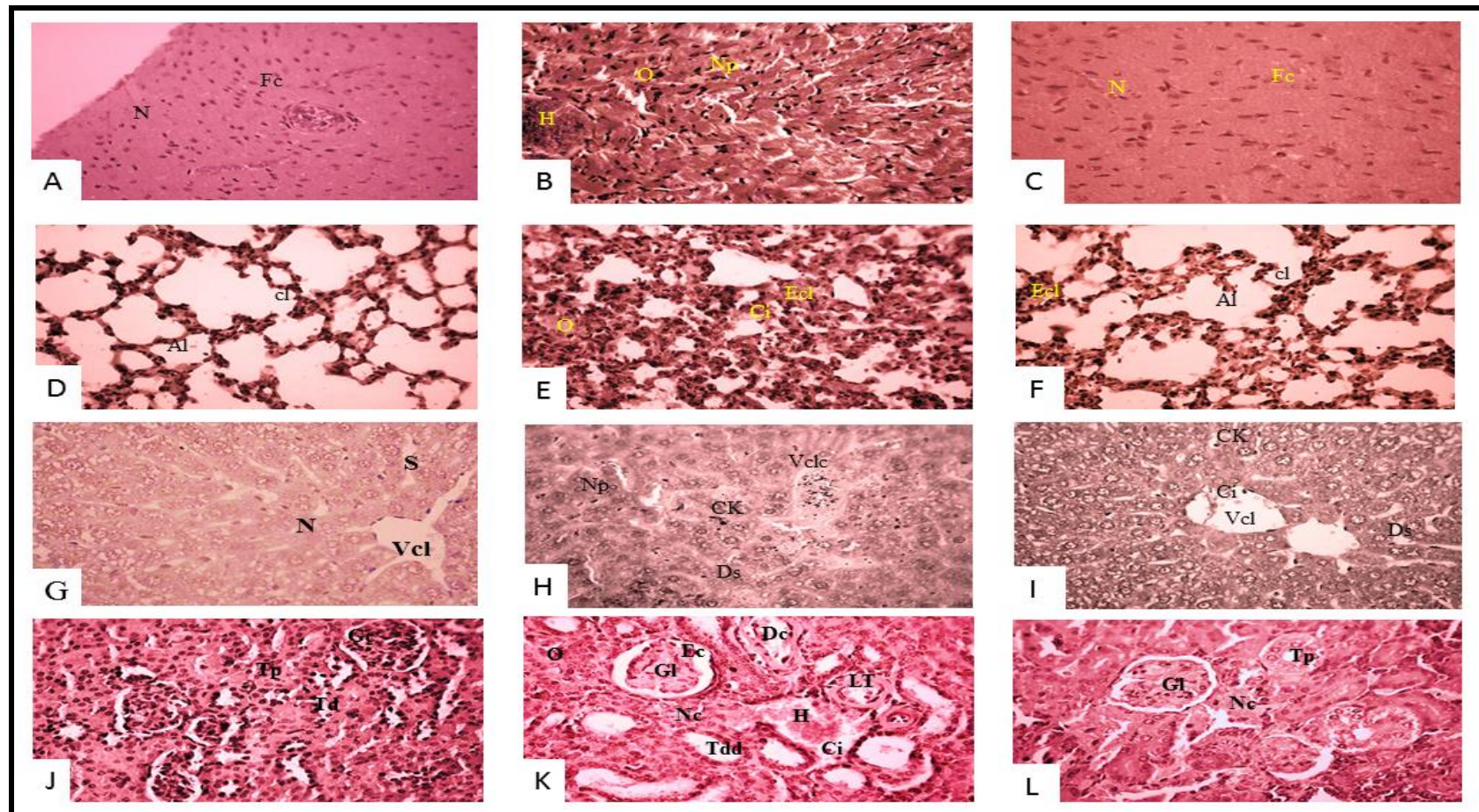


Figure 25 : Evaluation de l'effet de la spironolactone sur les altérations tissulaires induites par le venin de *Cerastes cerastes*. Les panels (A, D, G et J) montrent respectivement des contrôles des tissus cardiaque, pulmonaire, hépatique et rénal. Les panels (B, E, H et K) montrent les modifications histologiques au niveau des tissus cardiaque, pulmonaire, hépatique et rénal après 24 h d'envenimation. Les panels (C, F, I et L) montrent les modifications histologiques au niveau des tissus cardiaque, pulmonaire, hépatique et rénal après 24 h d'envenimation préalablement traités avec la spironolactone. VCL: Veine centrolobulaire, CCLV: Veine centrolobulaire congestionnée, CK: Cellule de Kupffer, N: noyaux, NP: Noyaux pycnotiques, S : sinusoid, DS: dilatation sinusoidale, Al: Alvéole, Ci: cellules inflammatoires, O: Oedème, Ecl: épaissement de cloison intra-alvéolaires, Fc: fibres cardiaques et H: hémorragie, G : Glomérule, TP : tube proximal, Td : tube distale, Tdd : tube distale dilaté, Dc : débris cellulaires, Ec : espace capsulaire, LT : lésion tubulaire (Coloration H.E. Grossissement x 400).

3.2.2 Evaluation de l'implication de la Cyclo-oxygénase 2 dans la cytotoxicité, l'inflammation et le stress oxydatif induits par le venin de *Cerastes cerastes*

3.2.2.1 Evaluation de l'implication de la Cyclo-oxygénase 2 dans la cytotoxicité induite par le venin de *Cerastes cerastes*

Les actions anti-inflammatoires des inhibiteurs non sélectifs de la COX sont dues à l'inhibition de la COX-2, alors que les effets secondaires indésirables, tels que les dommages causés au niveau de la muqueuse gastrique et intestinale et la toxicité rénale, sont dues à l'inhibition de la COX-1 (Bertolini et al., 2001). Ces données expliquent le choix de l'utilisation d'un inhibiteur sélectif la COX-2 tel que le celecoxib afin de prévenir la cytotoxicité induite par le venin de *Cerastes cerastes*.

L'effet de COX 2 sur la cytotoxicité *in vivo* du venin de *Cerastes cerastes* a été déterminé par le rapport du nombre de souris vivantes sur le nombre total de souris après administration du celecoxib (inhibiteur de la COX-2) préalablement à l'injection d'une DL50 du venin de *Cerastes cerastes*.

Les résultats montrent une augmentation dans le pourcentage de viabilité des souris envenimées prétraitées avec le celecoxib (4 souris vivantes /4) comparé au lot de souris envenimées n'ayant subi aucun traitement (2 souris vivantes/4) (Figure 26). Le celecoxib semble ainsi prévenir la cytotoxicité induite *in vivo* par le venin de *Cerastes cerastes*.

Le traitement avec le celecoxib a montré un effet cytoprotecteur en réduisant totalement le nombre de mortalité suite à une envenimation par *Cerastes cerastes*. L'inhibition sélective de la COX-2 par le celecoxib conduit à un effet prothrombique (Crofford et al., 2000; Mukherjee et al., 2001), alors que les molécules des venins de serpents induisent une hémorragie suggérant un effet vasculoprotecteur due à l'injection du celecoxib.

Les effets hémorragique et anticoagulant du venin de *Cerastes cerastes* semblent être inhibés par l'effet prothrombique du celecoxib expliquant ainsi la réduction du taux de mortalité après traitement avec le celecoxib préalablement à l'injection d'une DL50 du venin de *Cerastes cerastes*.

3.2.2.2 Evaluation de l'implication de la Cyclo-oxygénase 2 dans l'inflammation induite par le venin de *Cerastes cerastes*

L'implication de la Cyclo-oxygénase 2 dans l'inflammation induite par le venin de *Cerastes cerastes* a été évaluée par la mesure de l'activité de la MPO et l'EPO dans les

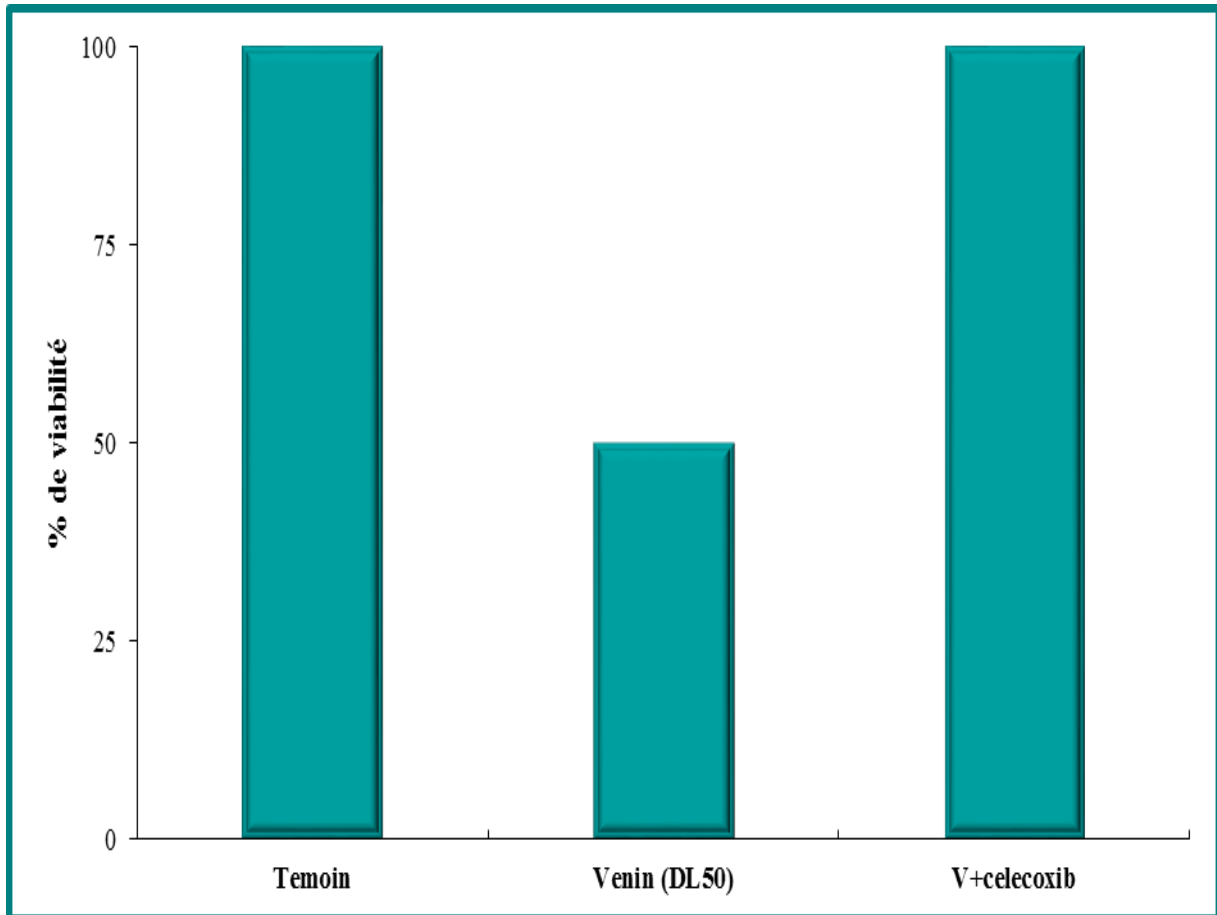


Figure 26 : Evaluation de l'effet de celecoxib sur la toxicité induite *in vivo* par le venin de *Cerastes cerastes*. La cytotoxicité testée *in vivo* est évaluée par la mesure du pourcentage de viabilité des souris après administration du celecoxib préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

sérums et les homogénats des tissus après prétraitement des souris envenimées avec le celecoxib.

Une réduction significative des activités enzymatiques EPO et MPO est observée au niveau des sérums des souris envenimées prétraitées avec celecoxib comparées à celles du lot de souris envenimées n'ayant subi aucun traitement (Figure 27).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que l'inhibiteur sélectif de la COX-2 (celecoxib), semble réduire significativement l'infiltration des neutrophiles et des éosinophiles au niveau tissulaire en réponse au venin de *C. cerastes*. Au niveau hépatique, la valeur de la MPO reste cependant proche de celle des animaux envenimés (Figure 28).

Suite à un prétraitement par le celecoxib, l'inhibition de l'infiltration des neutrophiles et des éosinophiles induite par le venin de *C. cerastes*, semble être due à l'effet anti-inflammatoire du celecoxib. Les inhibiteurs de la COX-2 présentent une activité anti-inflammatoire précoce au début de la réponse inflammatoire aigue, coïncidant avec l'expression de la protéine COX-2 (Gilroy *et al.*, 1998; Willoughby *et al.*, 2000).

3.2.2.3 Evaluation de l'implication de la Cyclo-oxygénase 2 dans le stress oxydatif induit par le venin de *Cerastes cerastes*

Le stress oxydant et l'inflammation sont des processus étroitement liés. L'inflammation pourrait être la cause ou la conséquence du stress oxydatif (Pasquier, 1995). L'évaluation de l'implication de la COX 2 dans le stress oxydant permet de déterminer si l'inflammation est impliquée dans l'initiation du stress oxydant généré par le venin de *Cerastes cerastes*.

Une diminution significative du taux sérique du NO sans retour à l'état normal est observée après prétraitement des souris envenimées avec le celecoxib accompagnée par une diminution significative et une normalisation du taux du MDA (Figure 29A et B).

Ces résultats montrent également une augmentation significative du taux sérique de l'activité enzymatique de la catalase, après administration du celecoxib préalablement à l'injection d'une DL50 du venin de *Cerastes cerastes*. Le taux sérique de GSH reste cependant proche de la valeur observée chez les animaux envenimés (Figure 29C et D).

Le celecoxib semble prévenir l'induction d'un stress oxydatif au niveau du système cardio-respiratoire. Les résultats montrent une diminution significative des taux du NO et du MDA et une augmentation significative des taux du GSH et de l'activité enzymatique de la catalase

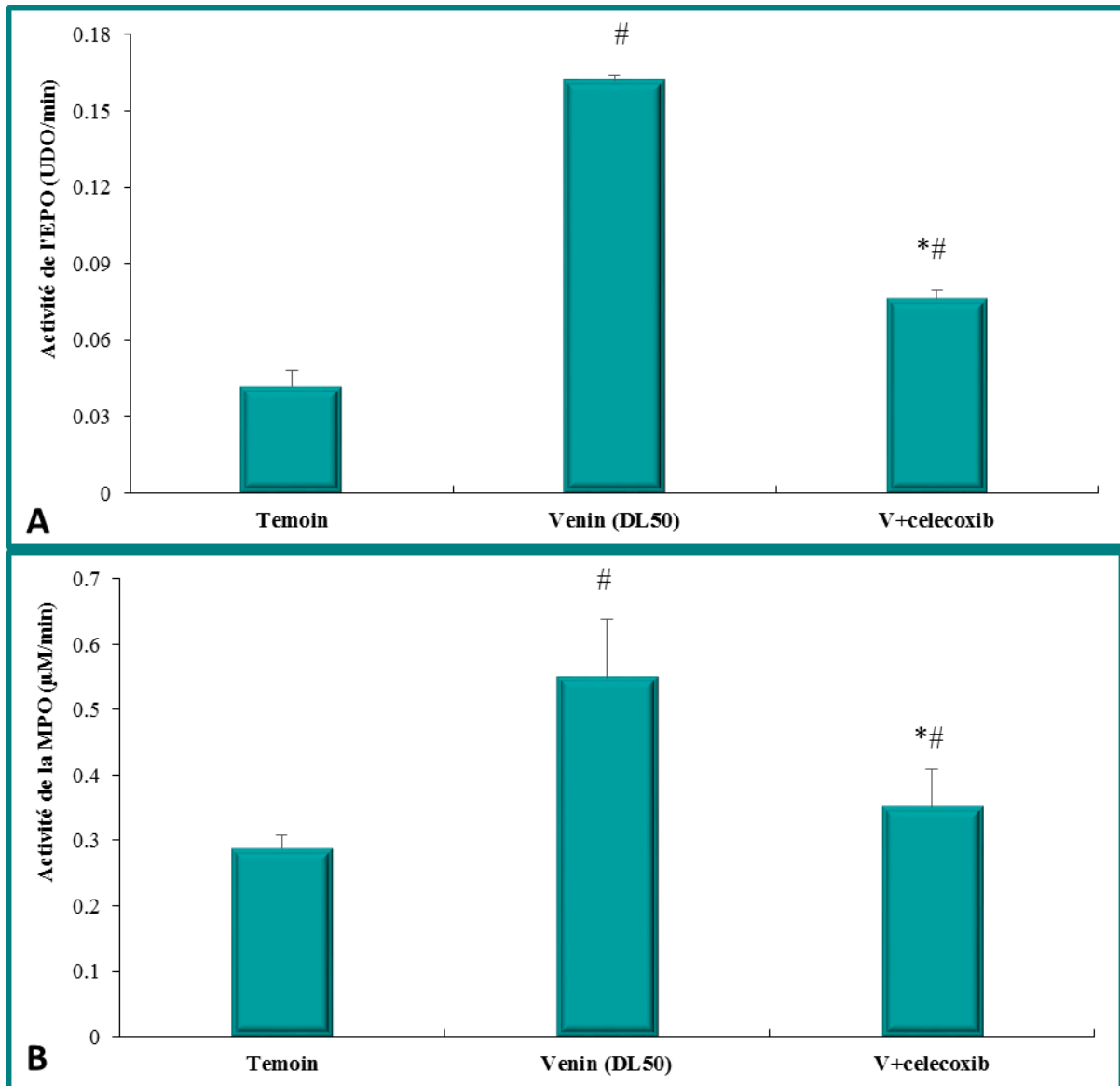


Figure 27 : Evaluation au niveau sérique de l'effet du celecoxib sur l'activation des polynucléaires neutrophiles et eosinophiles par le venin de *Cerastes cerastes*. L'activation des polynucléaires neutrophiles et eosinophiles est évaluée par la mesure des activités de l'éosinophile-peroxydase EPO (A) et de la myéloperoxydase MPO (B), après administration du celecoxib préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

* $P < 0,05$; Activité de l'EPO ou de la MPO du groupe de souris prétraitées, comparée à celle du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Activité de l'EPO ou de la MPO du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparée à celle du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

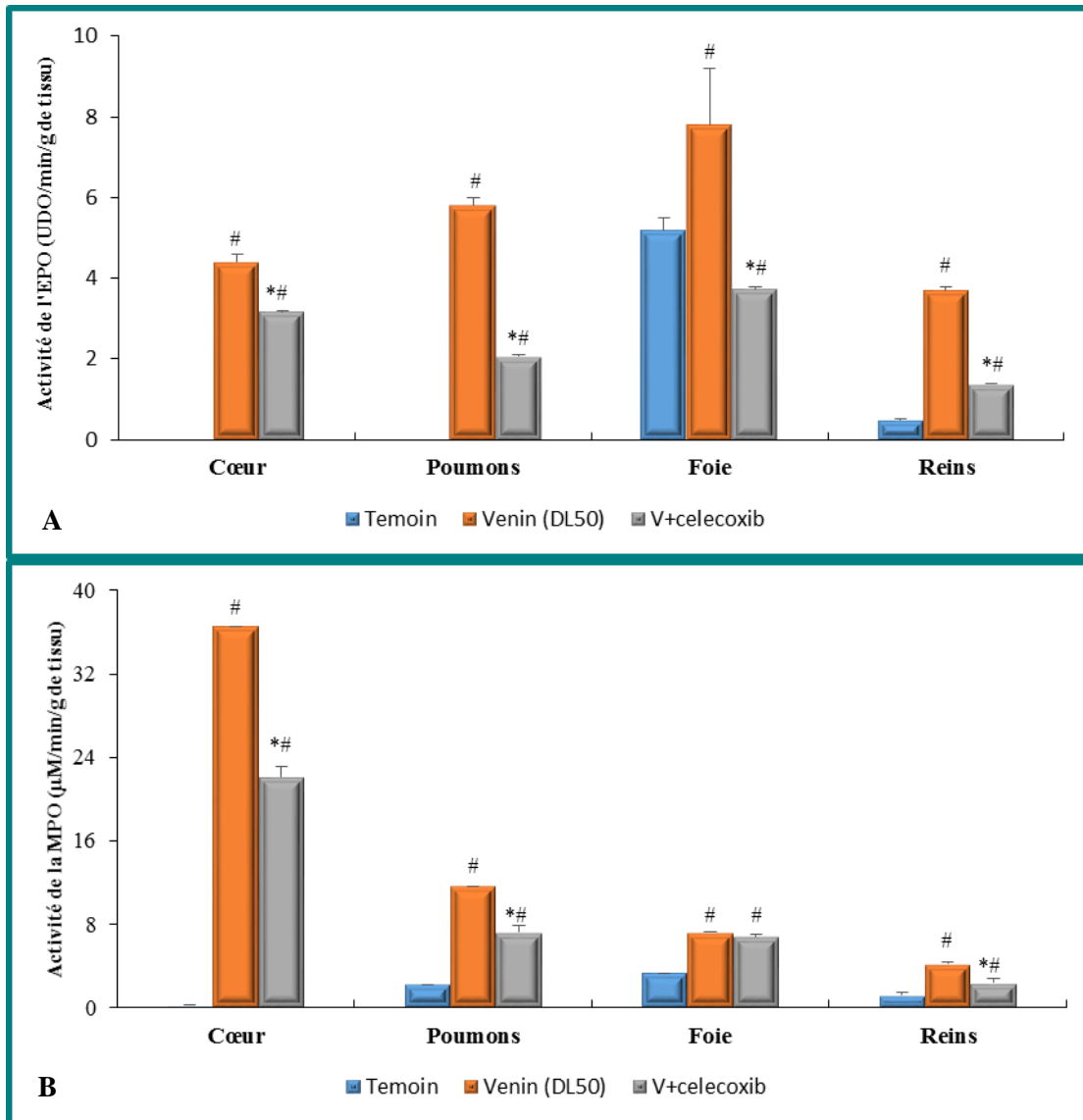


Figure 28 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet du celecoxib sur l'inflammation induite par le venin de *Cerastes cerastes*. L'inflammation systémique est évaluée par la mesure de l'activité de l'EPO (A) et de la MPO (B), après administration du celecoxib préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

* $P < 0,05$; Activité de l'EPO ou de la MPO du groupe de souris prétraitées, comparée à celle du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Activité de l'EPO ou de la MPO du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparée à celle du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

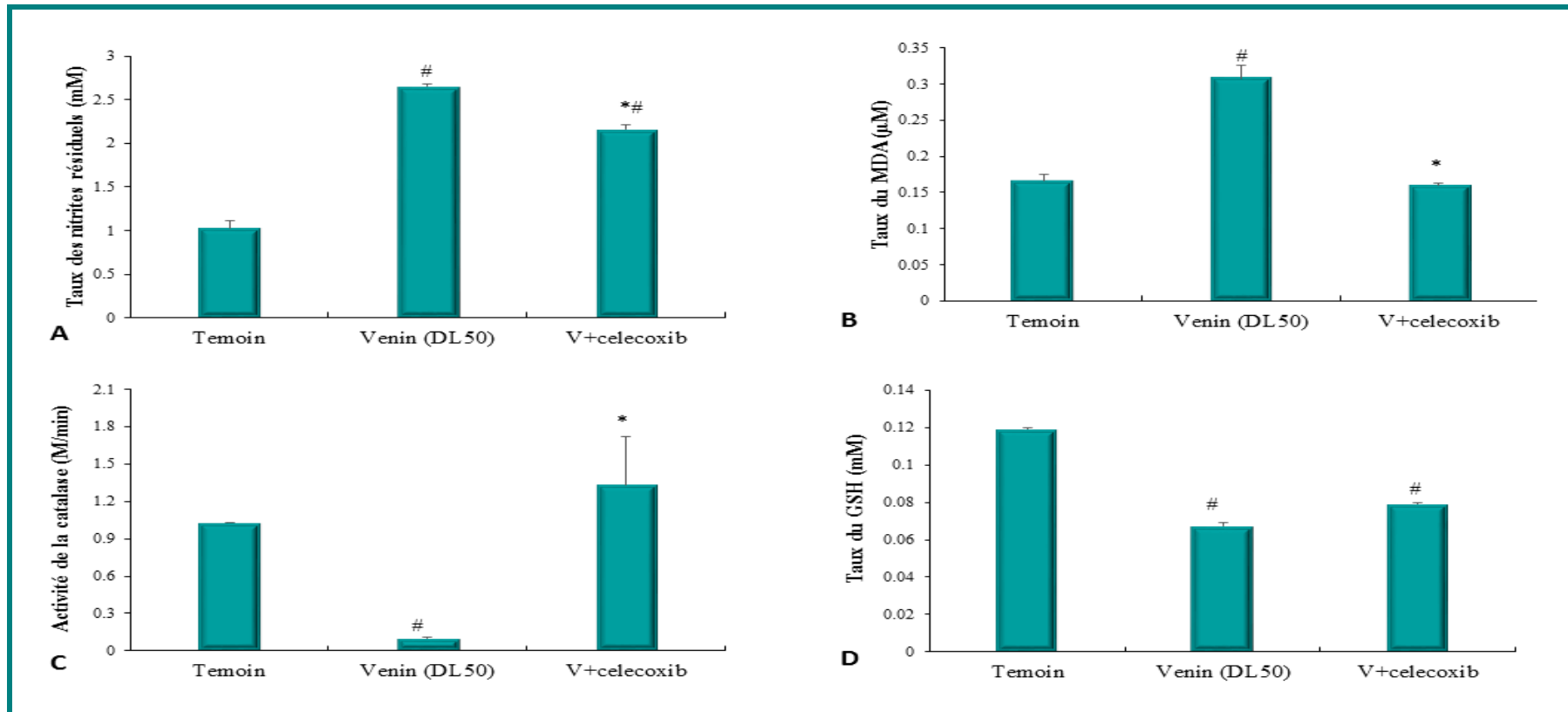


Figure 29 : Evaluation au niveau sérique de l'effet du celecoxib sur le stress oxydatif induit par le venin de *Cerastes cerastes*. Le stress oxydatif est évalué par la mesure des taux des nitrites résiduels (A) et des taux de Malondialdhyde MDA (B), de l'activité de la catalase (C) et des taux de GSH (D), après administration du celecoxib préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

* $P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris prétraitées, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

au niveau du myocarde et au niveau pulmonaire, après administration du celecoxib préalablement à l'injection d'une DL50 du venin de *Cerastes cerastes* (Figure 30).

L'évaluation des paramètres pro- et antioxydants au niveau hépatique et rénal après prétraitement des animaux envenimés avec le celecoxib, a montré que ce traitement semble avoir peu d'effets sur les paramètres étudiés. Les résultats obtenus après utilisation du celecoxib pourraient être expliqués par la pharmacocinétique du médicament qui peut influencer sa concentration dans les tissus.

Les venins de *Bothrops atrox*, *Bothrops jararaca* et *Bothrops asper* sont capables d'induire une expression protéique de la COX-2, sans modification dans l'expression de la protéine COX-1 (Moreira et al., 2007; Moreira et al., 2009b). L'utilisation d'un inhibiteur sélectif de la COX-2 semble être nécessaire pour prévenir les effets toxiques dus aux venins de serpents.

3.2.2.4 Evaluation de l'effet du celecoxib sur les altérations tissulaires induites par le venin de *Cerastes cerastes*

L'étude histologique a été réalisée au niveau du myocarde et des parenchymes pulmonaire, hépatique et rénal des souris envenimées ayant reçu au préalable le celecoxib. L'analyse des tissus a révélé l'effet protecteur du celecoxib sur les altérations tissulaires induites par le venin de *C. cerastes* (Figure 31).

L'utilisation du celecoxib semble avoir inhibé l'œdème et l'hémorragie induits par le venin, en effet, le myocarde apparaît sain sans aucune altération tissulaire. Une disparition du noyau de certaines cellules est cependant observée (Figure 31A,B et C).

L'analyse du parenchyme pulmonaire a révélé des parois alvéolaires moins épaisses comparées à celle du témoin envenimé (Figure 31E et F). Une réduction de l'œdème, de l'hémorragie et de l'infiltration leucocytaire est cependant observée.

L'analyse du parenchyme hépatique a montré l'effet hépato-protecteur partiel du celecoxib contre les effets toxiques du venin de *C. cerastes*. Le parenchyme hépatique est moins désorganisé avec des hépatocytes vacuolisés et une persistance de la dilatation de la paroi sinusoidale ; la veine centro-lobulaire est cependant non congestionnée (Figure 31G,H et I).

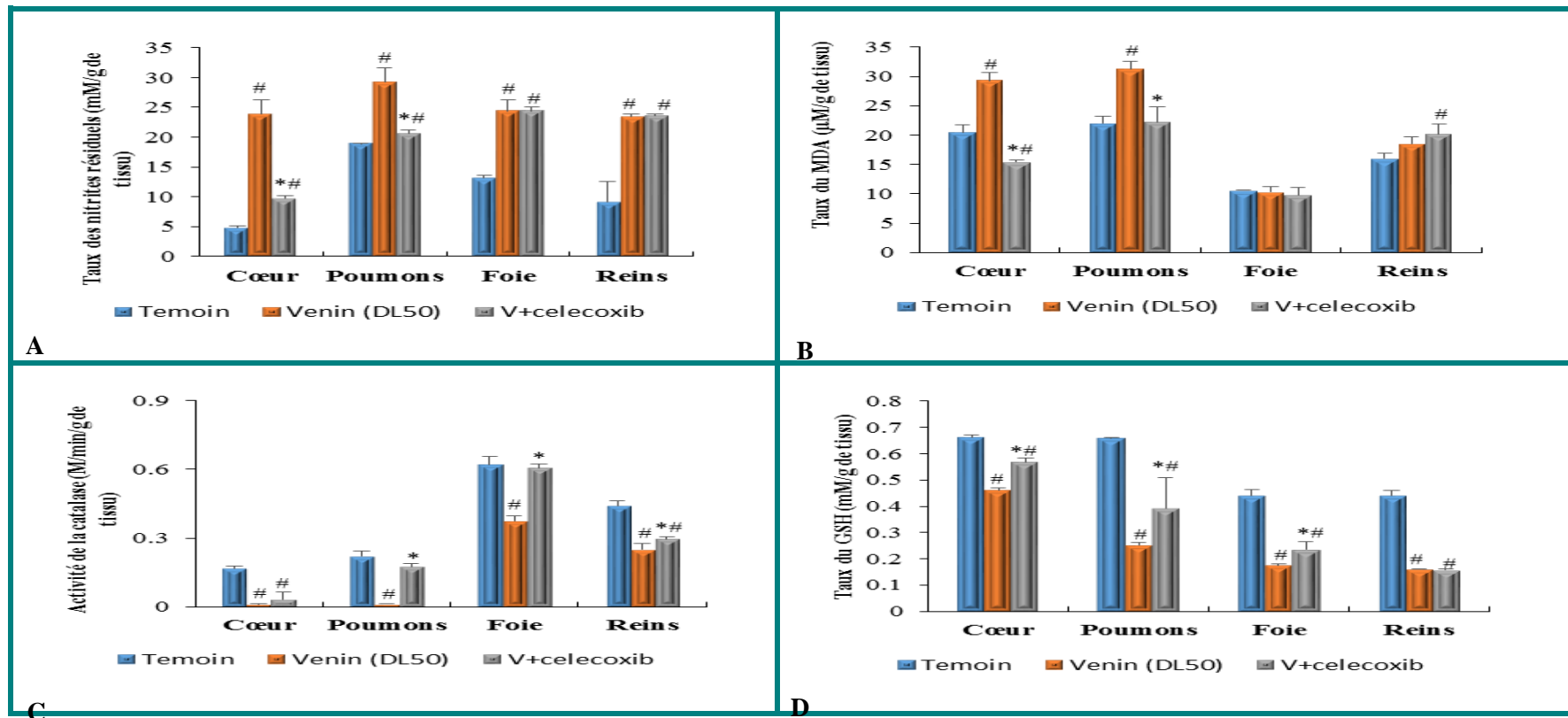


Figure 30 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet du celecoxib sur le stress oxydatif induit par le venin de *Cerastes cerastes*. Le stress oxydatif est évalué par mesure des taux des nitrites résiduels (A) et des taux de Malondialdehyde MDA (B), de l'activité de la catalase (C) et des taux de GSH (D), après administration du celecoxib préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

* $P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris prétraitées, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

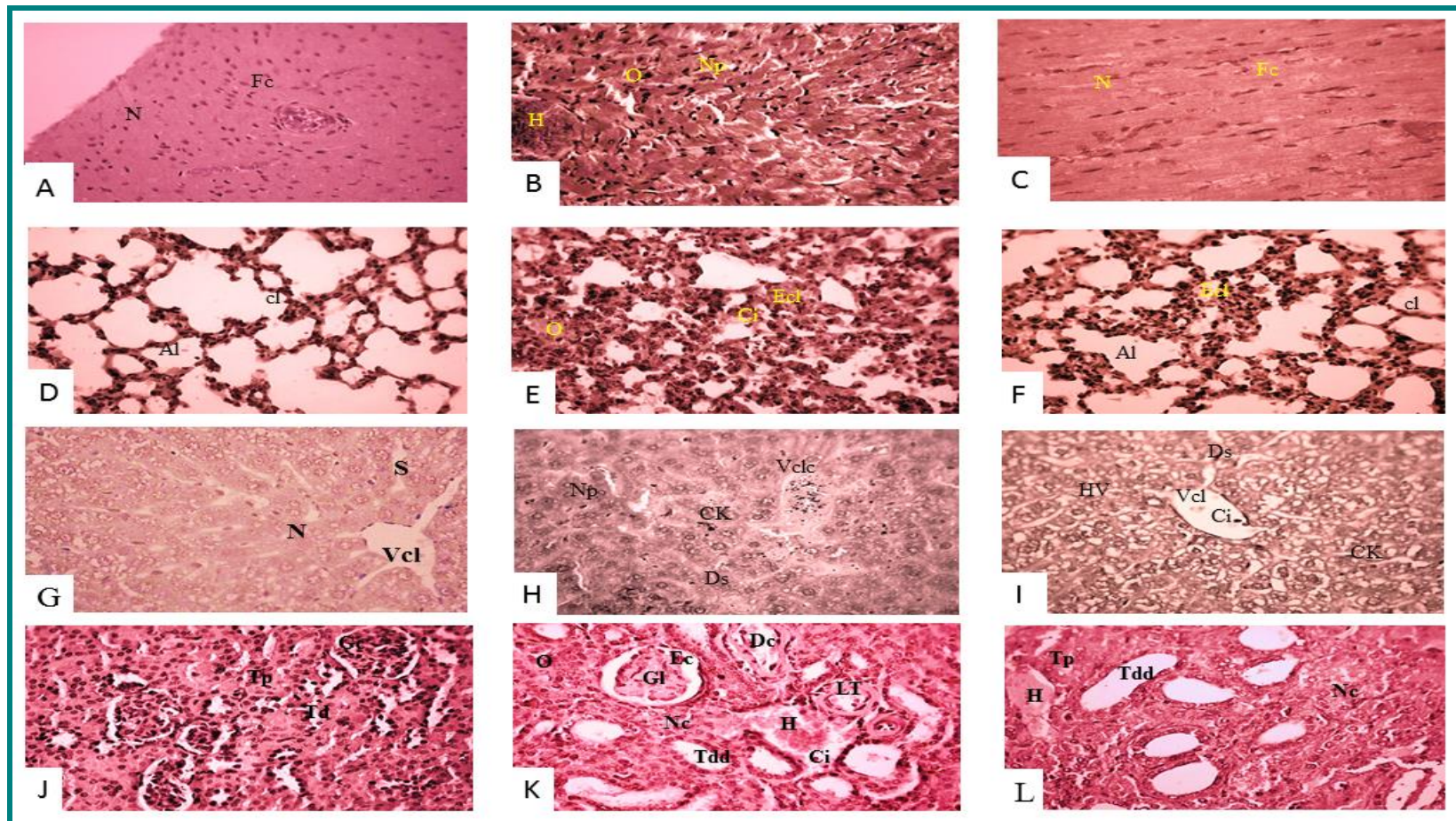


Figure 31 : Evaluation de l'effet du celecoxib sur les altérations tissulaires induites par le venin de *Cerastes cerastes*. Les panels (A, D, G et J) montrent respectivement des contrôles des tissus cardiaque, pulmonaire, hépatique et rénal. Les panels (B, E, H et K) montrent les modifications histologiques au niveau des tissus cardiaque, pulmonaire, hépatique et rénal après 24 h d'envenimation. Les panels (C, F, I et L) montrent les modifications histologiques au niveau des tissus cardiaque, pulmonaire, hépatique et rénal après 24 h d'envenimation préalablement traités avec le celecoxib. VCL: Veine centrolobulaire, CCLV: Veine centrolobulaire congestionnée, CK: Cellule de Kupffer, N: noyaux, NP: Noyaux pycnotiques, S : sinusoides, DS: dilatation sinusoidale, Al: Alvéole, Ci: cellules inflammatoires, O: Oedème, Ecl: épaissement de cloison intra-alvéolaire, Fc: fibres cardiaques et H: hémorragie, G : Glomérule, TP : tube proximal, Td : tube distale, Tdd : tube distale dilaté, Dc : débris cellulaires, Ec : espace capsulaire, LT : lésion tubulaire. (Coloration H.E. Grossissement x 400).

Au niveau du parenchyme rénal, le celecoxib semble avoir une très faible protection. L'œdème et la nécrose sont réduits mais la dilatation des tubules et l'hémorragie persistent (Figure 31J, K et L).

L'analyse des différents tissus après prétraitement avec le celecoxib montre l'implication de la COX 2 dans le recrutement des cellules immunitaires et les altérations tissulaires induites par le venin de *Cerastes cerastes*.

3.2.3 Evaluation de l'implication de la NO synthase dans la cytotoxicité, l'inflammation et le stress oxydatif induits par le venin de *Cerastes cerastes*

3.2.3.1 Evaluation de l'implication de la NO synthase dans la cytotoxicité induite par le venin de *Cerastes cerastes*

L'implication de la NO synthase dans la cytotoxicité induite *in vivo* par le venin de *Cerastes cerastes* a été déterminée par calcul du rapport du nombre de souris vivantes sur le nombre total de souris après administration du L-NAME préalablement à l'injection d'une DL50 du venin de *Cerastes cerastes*.

Les résultats montrent une augmentation du pourcentage de viabilité des souris envenimées prétraitées avec le L-NAME avec un pourcentage de viabilité égal à 75% (3 souris vivantes /4) comparé à celui du lot de souris envenimées n'ayant subi aucun traitement (2 souris vivantes /4), (Figure 32).

Le L-NAME semble prévenir l'effet toxique du venin. La neutralisation partielle du taux de mortalités induites par le venin *Cerastes cerastes*, suite à un prétraitement avec le L-NAME, pourrait être expliquée par une diminution de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique conduisant à l'augmentation de la pression sanguine et à des changements dans la réactivité vasculaire (Kopincová *et al.*, 2012).

3.2.3.2 Evaluation de l'implication de la NO synthase dans l'inflammation induite par le venin de *Cerastes cerastes*

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) peuvent être libérées par les cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins. Lorsque les cellules endothéliales sont soumises à l'effet de concentrations non cytotoxiques de ERO, les PN adhèrent plus fortement ; ce phénomène peut donc être à l'origine d'une pénétration accrue de leucocytes dans les tissus (Sellak *et al.*, 1994; Pasquier, 1995).

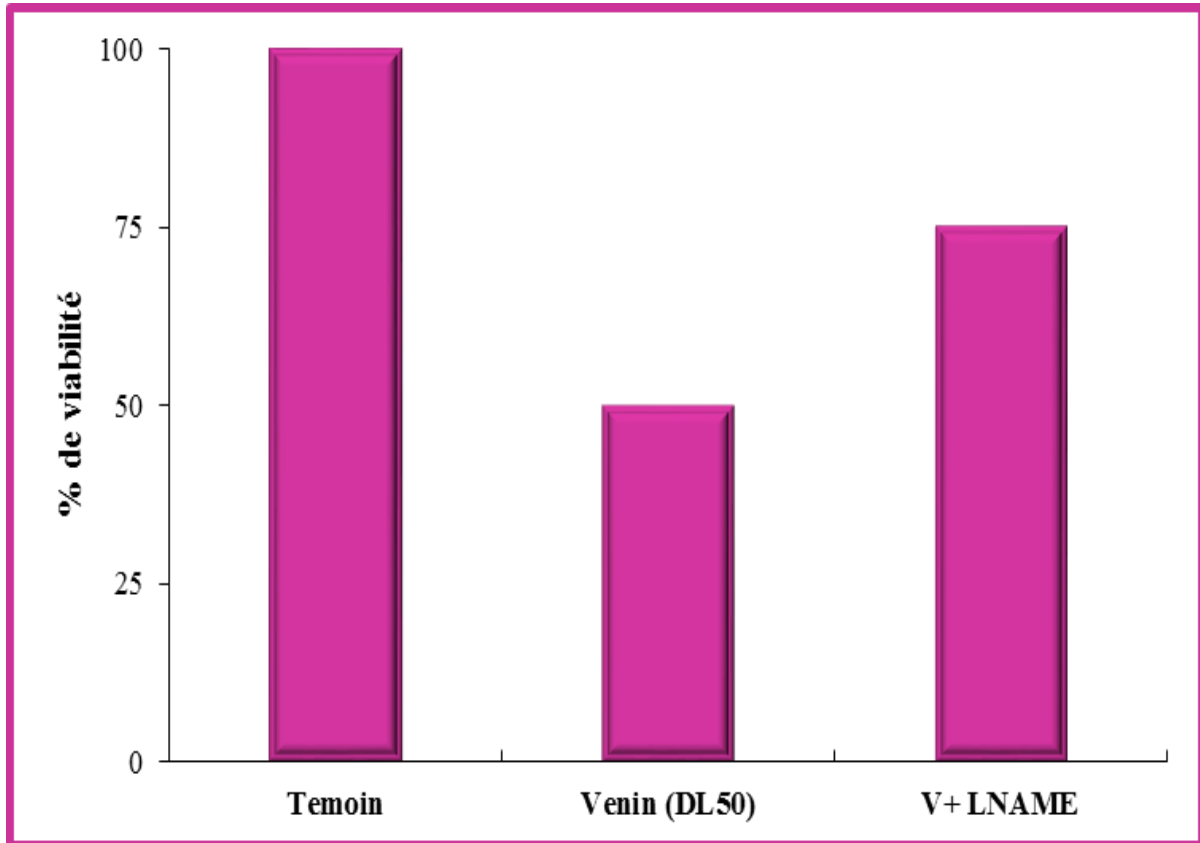


Figure 32 : Evaluation de l'effet du L-NAME sur la toxicité induite *in vivo* par le venin de *Cerastes cerastes*. La cytotoxicité testée *in vivo* est évaluée par la mesure du pourcentage de viabilité des souris après administration du L-NAME préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

L'évaluation de l'implication de la NOs dans le recrutement des cellules immunitaires permet de déterminer si le stress oxydant est impliqué dans la génération de l'inflammation due à l'envenimation par le venin de *Cerastes cerastes*.

Une réduction significative des activités enzymatiques EPO et MPO est observée au niveau des sérums des souris envenimées prétraitées avec le L-NAME comparées à celles du lot de souris envenimées n'ayant subi aucun traitement (Figure 33).

Les résultats obtenus dans cette étude indiquent aussi que le L-NAME, un inhibiteur non sélectif de la NO synthase, réduit considérablement l'infiltration des neutrophiles et des éosinophiles au niveau tissulaire en réponse au venin de *C. cerastes* (Figure 34). Il semble que l'inhibition de la synthèse du NO lors d'une envenimation est capable de prévenir l'activation et le recrutement des neutrophiles et des éosinophiles vers les organes cœur, poumons, foie et reins.

L'augmentation des activités de l'éosinophile peroxydase et de la myéloperoxydase pourrait être expliquée par le chimiotactisme des polynucléaires éosinophiles et neutrophiles vers le site inflammatoire suite à leur activation par les médiateurs inflammatoires. Le L-NAME semble prévenir partiellement la libération des médiateurs inflammatoires impliqués dans le recrutement des cellules immunitaires.

Le venin de *Bothrops atrox* induit l'augmentation des taux sériques de l'oxyde nitrique et des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IFN- γ (Barros et al., 1998). Les neutrophiles joueraient un rôle important dans la synthèse des cytokines inflammatoires IL-1b et IL-6 et de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 en augmentant l'expression de ces molécules et la libération d'oxyde nitrique par les cellules adjacentes (Escocard et al., 2006). La NO synthase semble être impliquée dans l'inflammation induite par les venins de serpent.

3.2.3.3 Evaluation de l'implication de la NO synthase dans le stress oxydatif induit par le venin de *Cerastes cerastes*

Les résultats obtenus montrent une diminution significative des taux du NO et du MDA au niveau sérique et tissulaire, après administration du L-NAME préalablement à l'injection d'une DL50 du venin de *Cerastes cerastes*. Le L-NAME semble prévenir la libération du NO et la formation du MDA au niveau tissulaire (Figures 35 et 36).

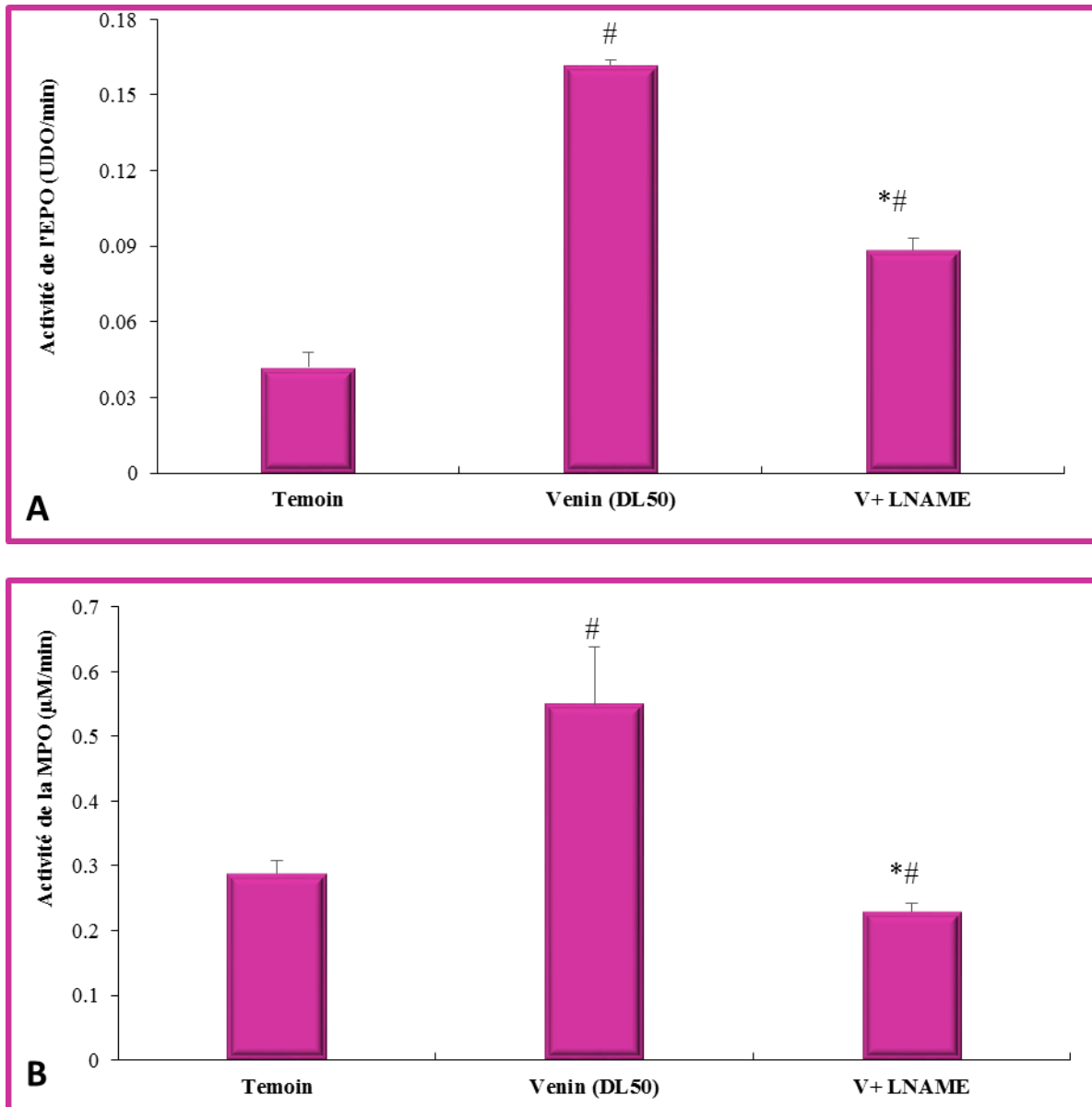


Figure 33 : Evaluation au niveau sérique de l'effet du L-NAME sur l'activation des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles par le venin de *Cerastes cerastes*. L'activation des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles est évaluée par la mesure des activités de l'éosinophile-peroxydase EPO (A) et de la myéloperoxydase MPO (B), après administration du L-NAME préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

* $P < 0,05$; Activité de l'EPO ou de la MPO du groupe de souris prétraitées, comparée à celle du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Activité de l'EPO ou de la MPO du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparée celle du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

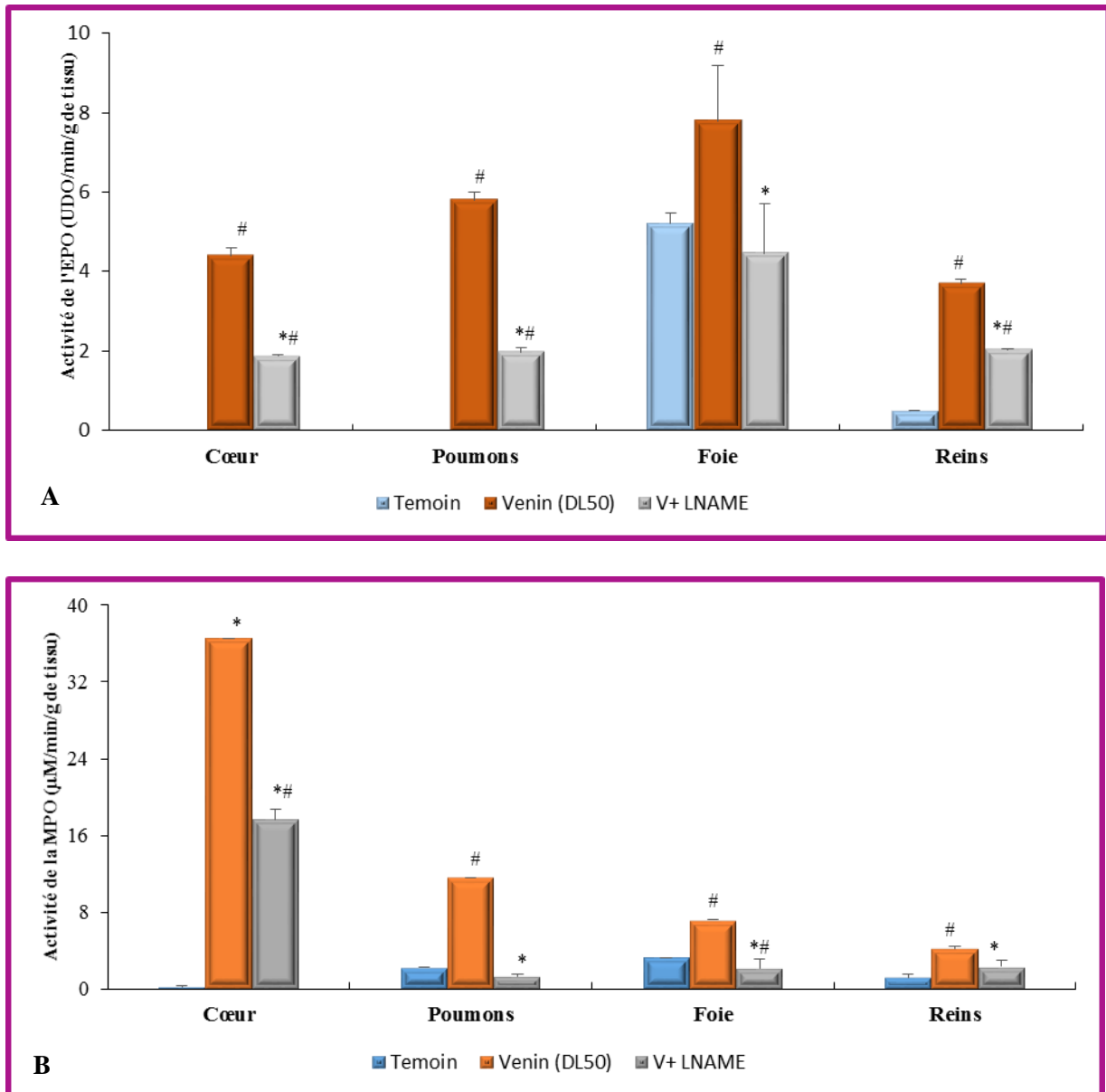


Figure 34 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet du L-NAME sur l'inflammation induite par le venin de *Cerastes cerastes*. L'inflammation systémique est évaluée par mesure de l'activité de l'EPO (A) et de la MPO (B), après administration du L-NAME préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

* $P < 0,05$; Activité de l'EPO ou de la MPO du groupe de souris prétraitées, comparée à celle du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Activité de l'EPO ou de la MPO du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparée celle du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

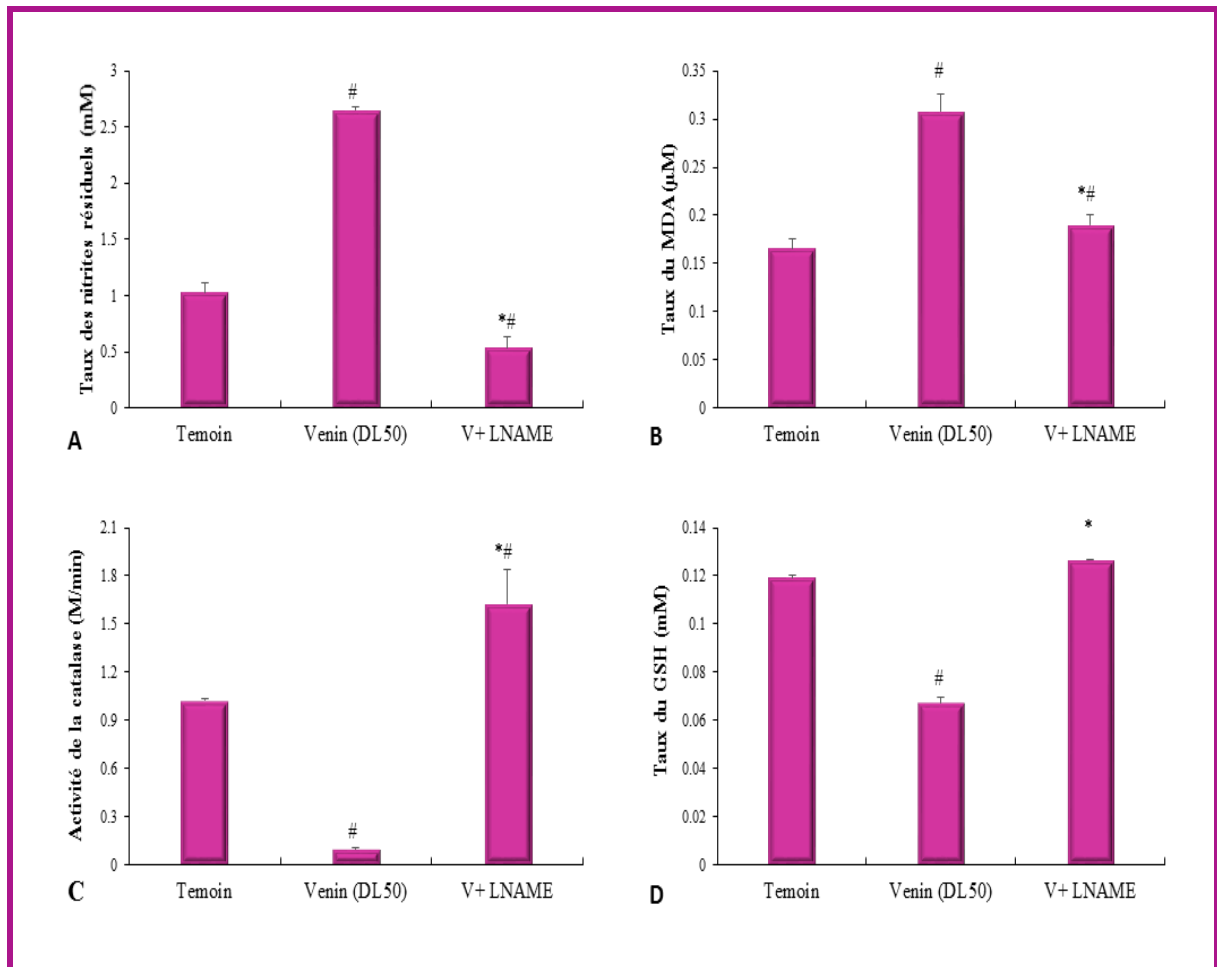


Figure 35 : Evaluation au niveau sérique de l'effet du L-NAME sur le stress oxydatif induit par le venin de *Cerastes cerastes*. Le stress oxydatif est évalué par la mesure des taux des nitrites résiduels (A) et des taux de Malondialdhyde MDA (B), de l'activité de la catalase (C) et des taux de GSH (D), après administration du L-NAME préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

* $P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris prétraitées, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

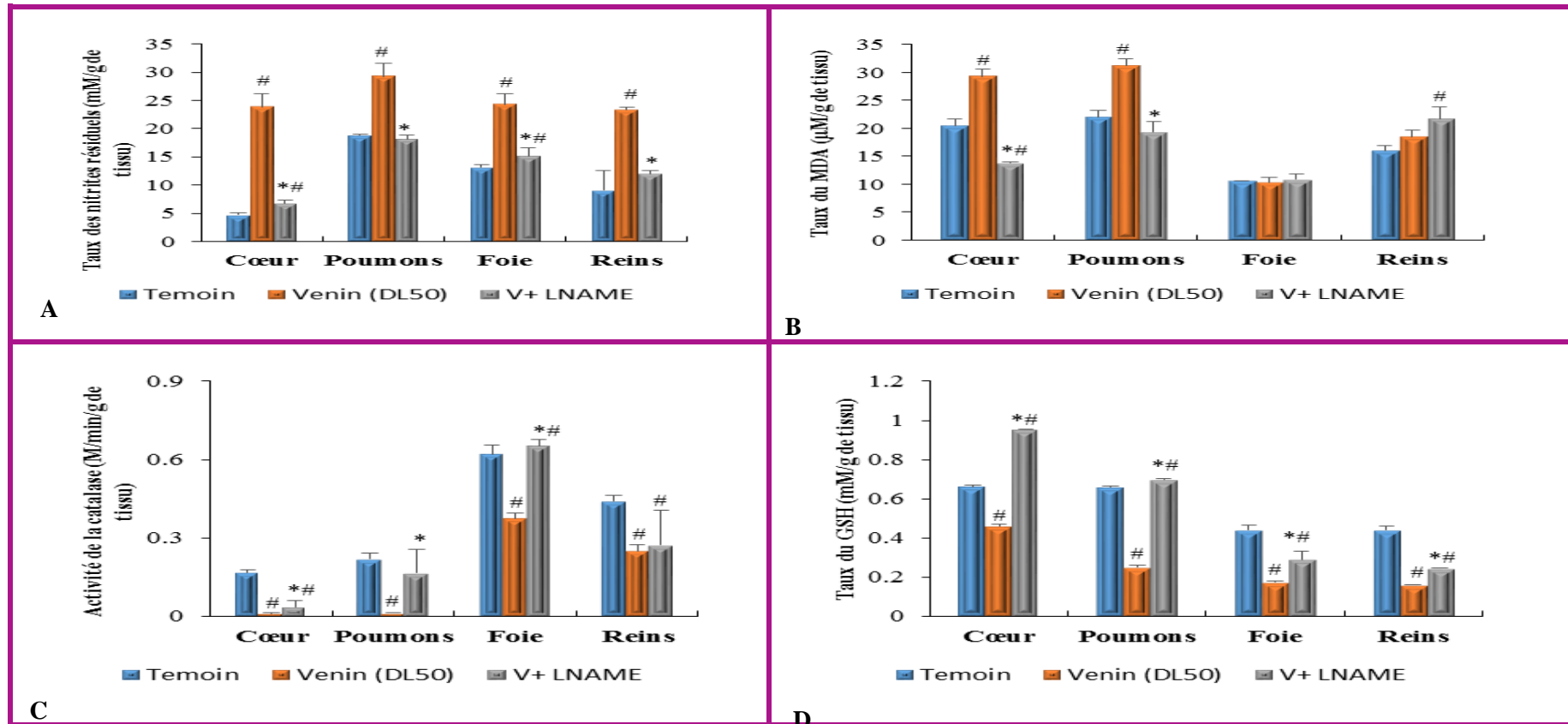


Figure 36 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet du L-NAME sur le stress oxydatif induit par le venin de *Cerastes cerastes*. Le stress oxydatif est évalué par la mesure des taux des nitrites résiduels (A) et des taux de Malondialdhyde MDA (B), de l'activité de la catalase (C) et des taux de GSH (D), après administration du L-NAME préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

* $P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris prétraitées, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

Le monoxyde d'azote (NO) est un gaz radicalaire inorganique synthétisé à partir de la L-arginine via la NO synthase. Il peut former avec l'anion superoxyde le peroxyde nitrite (HOONO), un oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques. L'un des effets délétères les plus importants de l'attaque des radicaux libres est l'oxydation des acides gras insaturés, connue sous le nom de peroxydation lipidique (Yalçinkaya et al., 2013). L'utilisation du L-NAME semble prévenir le stress oxydant/nitrosant et prévenir indirectement la peroxydation lipidique induite par le venin de *Cerastes cerastes*.

Les résultats obtenus montrent également une augmentation significative des taux de GSH et de l'activité de la catalase au niveau sérique et tissulaire, après administration du L-NAME préalablement à l'injection d'une DL50 du venin de *Cerastes cerastes*. Le L-NAME semble induire un effet préventif antioxydant en empêchant la diminution de l'activité de la catalase et du taux de GSH au niveau tissulaire.

Le maintien de l'homéostasie dans les cellules nécessite une interaction complexe entre les pro-oxydants et les antioxydants. Le stress oxydatif survient à la suite d'un déplacement de cet équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants vers la formation excessive de radicaux libres (Agarwal et al., 2006). Le L-NAME semble prévenir le déséquilibre de la balance pro-/anti-oxydants engendré par le venin de *Cerastes cerastes*.

De nombreuses études ont rapporté l'importance du NO dans la régulation du système circulatoire, non seulement il dilate les vaisseaux sanguins, il influence aussi la contractilité myocardique (Moncada et al., 1989; Paulus, 1994). Il est aussi capable d'interagir avec un certaines molécules, en particulier le superoxyde, en formant le peroxyde nitrite, qui, à son tour, peut provoquer des effets bactéricides ou cytotoxiques (Robbins et Grisham, 1997). La dérégulation du NO et l'augmentation du stress oxydant et nitrosant sont impliqués dans la pathogenèse de l'insuffisance cardiaque (Pacher et al., 2005; Takimoto et Kass, 2007). L'utilisation du L-NAME a inhibé l'hypertrophie cardiaque et les défaillances cardiaques dues à une stimulation adrénergique (Heymes et al., 1999; Umar et al., 2009).

3.2.3.4 Evaluation de l'effet du L-NAME sur les altérations tissulaires induites par le venin de *Cerastes cerastes*

L'étude histologique a été réalisée au niveau du myocarde, des parenchymes pulmonaire, hépatique et rénal des souris envenimées ayant reçu au préalable le L-NAME en prétraitement.

Le myocarde, des souris ayant reçu le L-NAME avant d'être envenimées, révèle une organisation des fibres cardiaques identiques à celles des fibres des souris témoins (Figure 37A, B et C).

Au niveau pulmonaire, il semble que les lésions, l'infiltration leucocytaire ainsi que l'épaississement des parois alvéolaires soient partiellement neutralisés par le prétraitement au L-NAME. Une réduction de l'œdème et de l'hémorragique est également observée (Figure 37D, E et F).

L'utilisation du L-NAME a permis de prévenir la désorganisation du parenchyme hépatique et la congestion de la veine centro-lobulaire induites par le venin de *Cerastes cerastes*. Des hépatocytes vacuolisés et une dilatation sinusoidale sont cependant observés (Figure 37G, H et I).

Le L-NAME semble être aussi capable de prévenir les altérations tissulaires induites par le venin de *C. cerastes* au niveau du cortex rénal. Une diminution de l'œdème, de l'hémorragie, des zones nécrotiques ainsi que la dilatation tubulaire sont cependant observées (Figure 37J, K et L).

L'analyse histologique du myocarde et des parenchymes pulmonaire, hépatique et rénal des animaux prétraités avec le L-NAME révèle l'implication du monoxyde d'azote dans les altérations tissulaires générées par le venin de *C. cerastes*.

3.2.4 Evaluation de l'effet de la vitamine C sur la cytotoxicité, l'inflammation et le stress oxydatif induits par le venin de *Cerastes cerastes*

3.2.4.1 Evaluation de l'effet de la vitamine C sur la cytotoxicité induite par le venin de *Cerastes cerastes*

La cytotoxicité du venin de *Cerastes cerastes* évaluée *in vivo* a été déterminée par le rapport du nombre de souris vivantes sur le nombre total des souris après administration de la vitamine C préalablement à l'injection d'une DL50 du venin de *C. cerastes*.

Les résultats montrent une augmentation du pourcentage de viabilité des souris envenimées prétraitées avec la vitamine C comparée à celle du lot de souris envenimées n'ayant reçu aucun traitement. La vitamine C semble prévenir partiellement la mortalité des souris envenimées avec un pourcentage de viabilité équivalent à 75% (3 souris vivantes/4) (Figure 38).

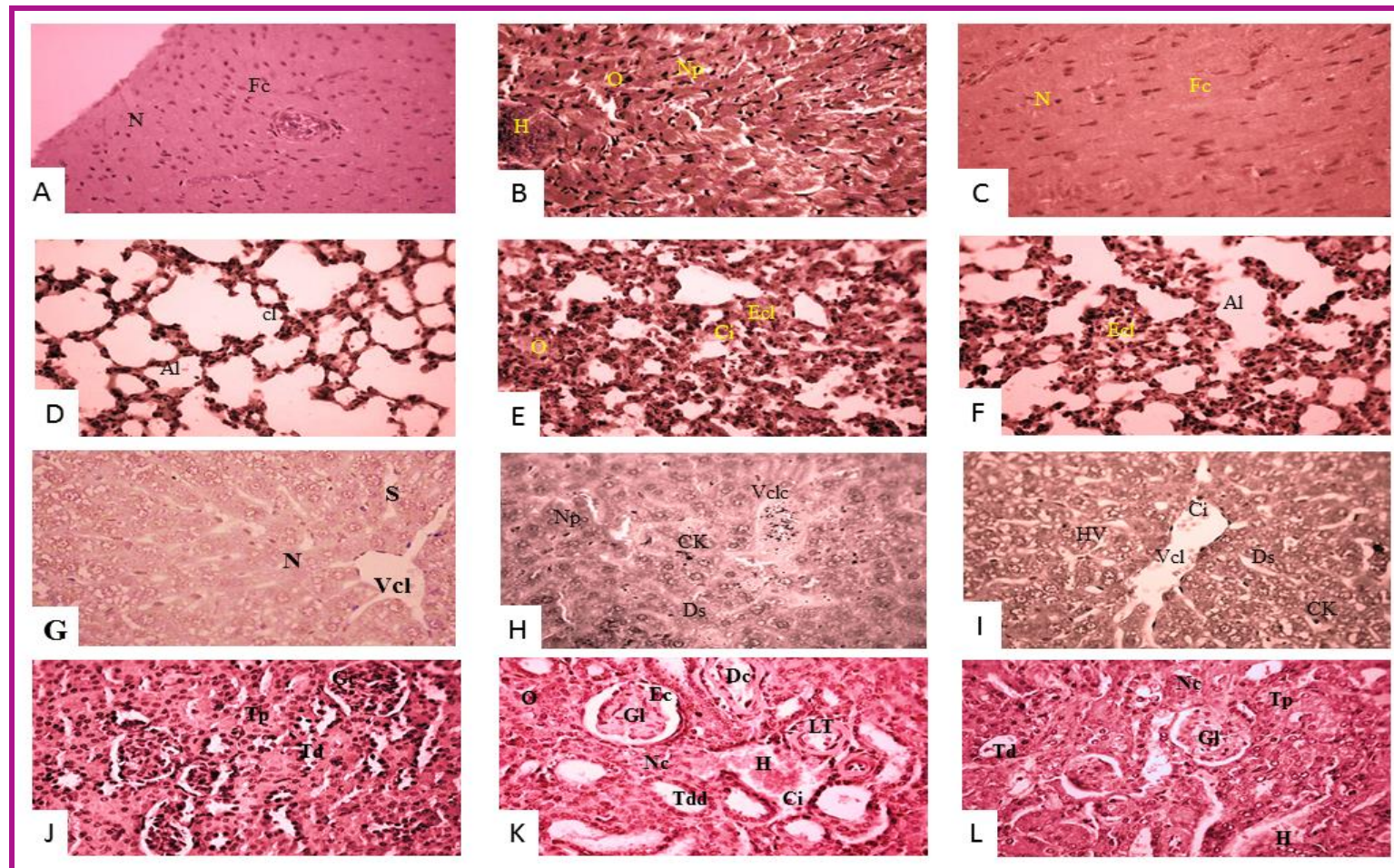


Figure 37 : Evaluation de l'effet du L-NAME sur les altérations tissulaires induites par le venin de *Cerastes cerastes*. Les panels (A, D, G et J) montrent respectivement des contrôles des tissus cardiaque, pulmonaire, hépatique et rénal. Les panels (B, E, H et K) montrent les modifications histologiques au niveau des tissus cardiaque, pulmonaire, hépatique et rénal après 24 h d'envenimation. Les panels (C, F, I et L) montrent les modifications histologiques au niveau des tissus cardiaque, pulmonaire, hépatique et rénal après 24 h d'envenimation préalablement traités avec le L-NAME. **VCL:** Veine centrolobulaire, **CCLV:** Veine centrolobulaire congestionnée, **CK:** Cellule de Kupffer, **N:** noyaux, **NP:** Noyaux pycnotiques, **S:** sinusoides, **DS:** dilatation sinusoidale, **Al:** Alvéole, **Ci:** cellules inflammatoires, **O:** Oedème, **Ecl:** épaissement de cloison intra-alvéolaire, **Fc:** fibres cardiaques et **H:** hémorragie, **G:** Glomérule, **TP:** tube proximal, **Td:** tube distale, **Tdd:** tube distale dilaté, **Dc:** débris cellulaires, **Ec:** espace capsulaire, **LT:** lésion tubulaire. (Coloration H.E. Grossissement x 400).

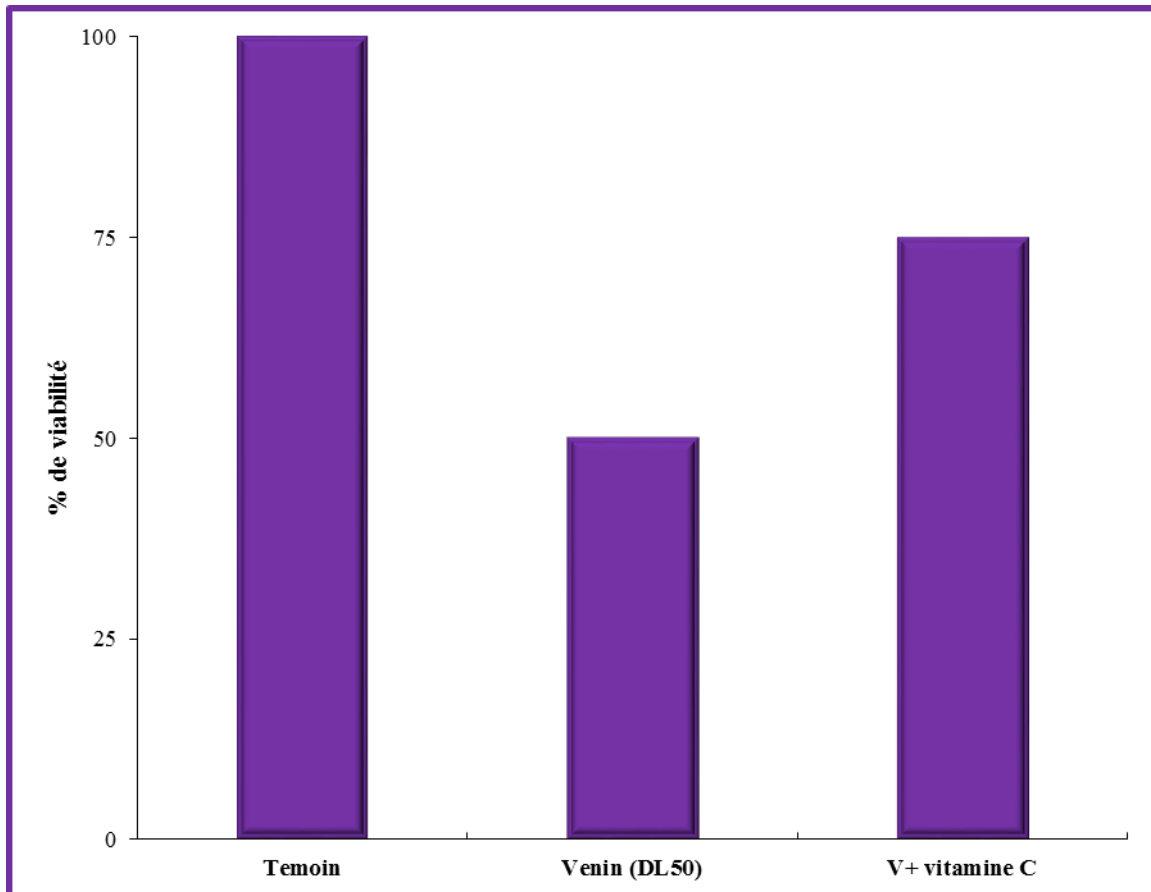


Figure 38 : Evaluation de l'effet de la vitamine C sur la toxicité induite *in vivo* par le venin de *Cerastes cerastes*. La cytotoxicité testée *in vivo* est évaluée par la mesure du pourcentage de viabilité des souris après administration de la vitamine C préalablement à l'injection d'une DL50 du venin de *Cerastes cerastes*.

L'hydrophilie élevée de la vitamine C limite son application dans la diminution du taux des espèces réactives d'oxygène *in vivo* et de l'activité de la PLA2 (Song *et al.*, 2004; Nanda *et al.*, 2007). Une étude réalisée sur les venins de *Bothrops moojeni* et de *Bothrops alternatus* a montré une réduction significative de l'activité protéolytique avec une faible inhibition de l'activité des PLA2 par la vitamine C (Oliveira *et al.*, 2016). La haute hydrophilie de la vitamine C semble être responsable de son faible effet protecteur contre la cytotoxicité du venin de *C. cerastes*.

3.2.4.2 Evaluation de l'effet de la vitamine C sur l'inflammation induite par le venin de *Cerastes cerastes*

L'effet de la vitamine C sur l'inflammation induite par le venin de *Cerastes cerastes* a été évalué par la mesure des activités de la myéloperoxydase et de l'éosinoperoxydase dans les sérums et dans les tissus.

Une réduction significative des activités de l'EPO et de la MPO est observée au niveau des sérums des souris prétraitées avec la vitamine C et envenimées comparées à celles des souris envenimées n'ayant subi aucun traitement, suggérant ainsi l'effet inhibiteur de la vitamine C sur l'activation des polynucléaires neutrophiles et des éosinophiles provoquée par le venin de *Cerastes cerastes* (Figure 39).

Les résultats de cette étude montrent également que la vitamine C réduit considérablement l'infiltration des neutrophiles et des éosinophiles dans les tissus des souris envenimées avec le venin de *Cerastes cerastes* (Figure 40). La vitamine C semble ainsi prévenir l'activation et le recrutement des neutrophiles et des éosinophiles vers les organes cœur, poumons, foie et reins, en réponse au venin de *C. cerastes*.

L'envenimation avec les venins de serpents se caractérise par une forte réponse inflammatoire déclenchant une rupture des vaisseaux sanguins, une production des cytokines, une migration des leucocytes et une mort cellulaire. La létalité du venin est associée à des facteurs inflammatoires induits par des enzymes tels que les protéases de type thrombine (Barros *et al.*, 1998). Les composés antioxydants seraient capables d'interagir avec les sites de liaison des cofacteurs dans la structure des protéases et de les modifier; l'interaction avec les sites de liaison des cofacteurs entraînerait une réduction de l'activité enzymatique (Patiño *et al.*, 2013; De Oliveira *et al.*, 2014). La vitamine C semble inhiber la migration des leucocytes et le déclenchement de la réponse inflammatoire par inhibition de l'activité des protéases du venin de *Cerastes cerastes*.

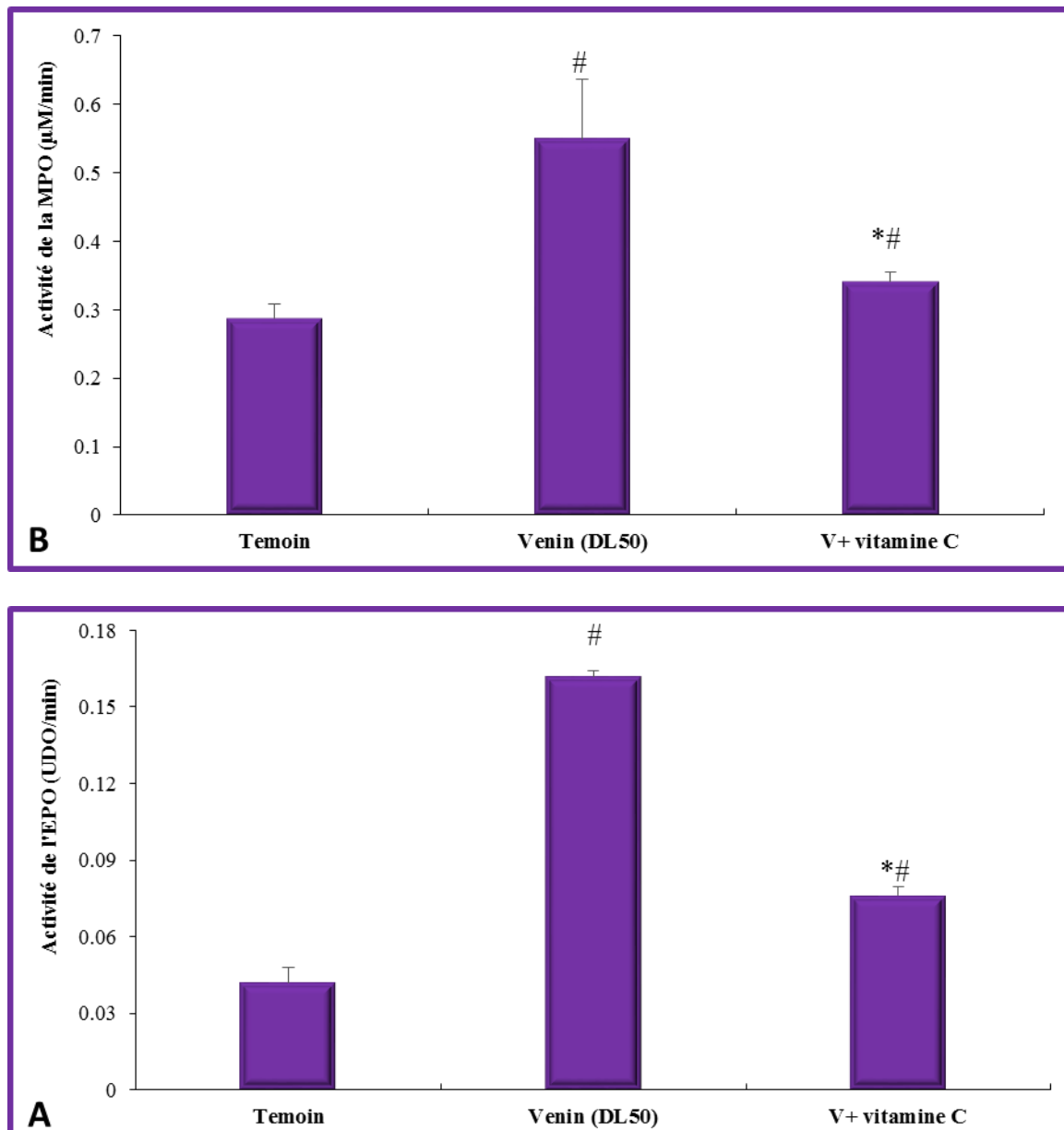


Figure 39 : Evaluation au niveau sérique de l'effet de la vitamine C sur l'activation des polynucléaires neutrophiles et eosinophiles par le venin de *Cerastes cerastes*. L'activation des polynucléaires neutrophiles et eosinophiles est évaluée par mesure des activités de l'éosinophile-péroxydase EPO (A) et de la myéloperoxydase MPO (B), après administration de la vitamine C préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

* $P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris prétraitées, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

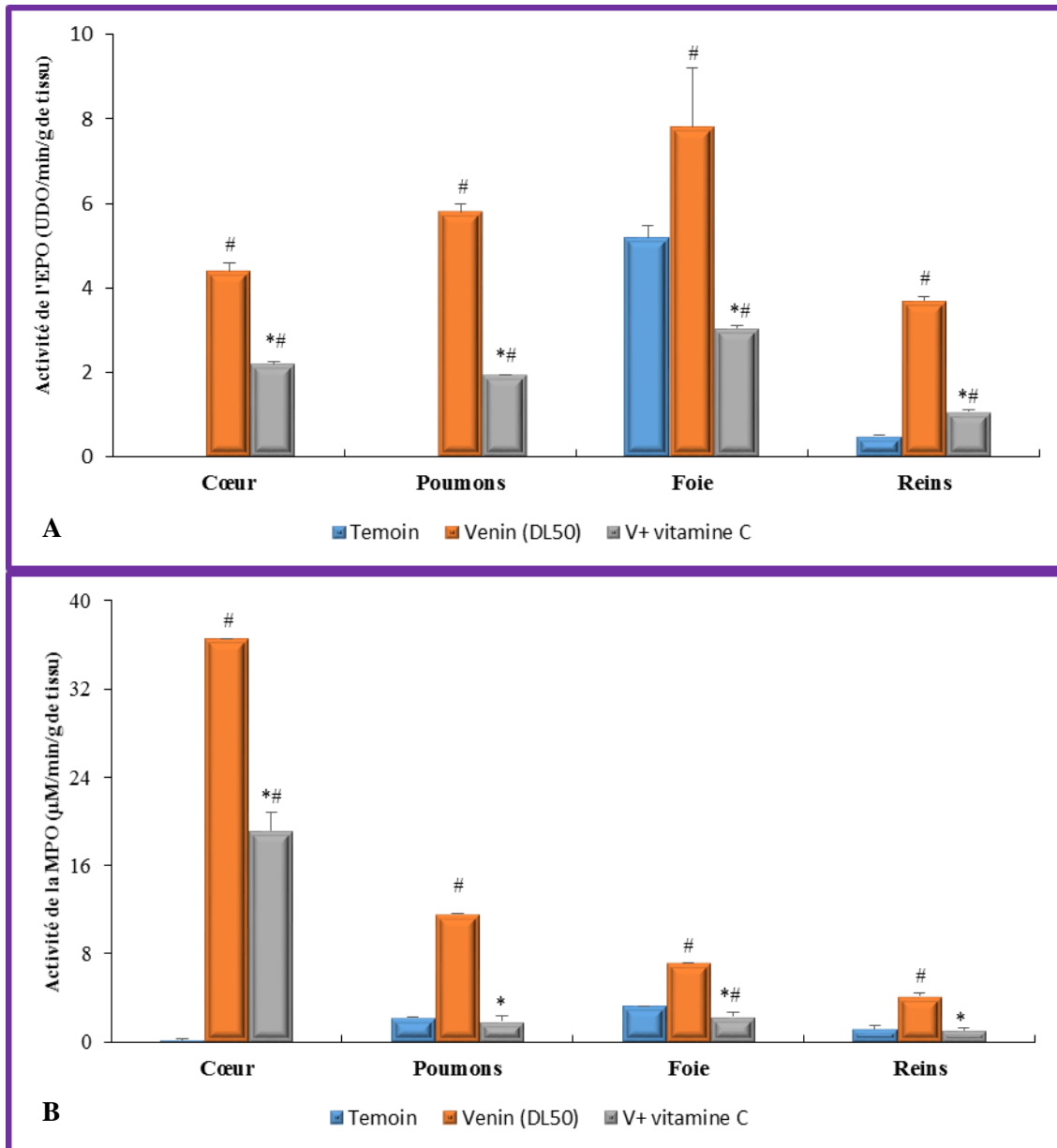


Figure 40 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet de la vitamine C sur l'inflammation induite par le venin de *Cerastes cerastes*. L'inflammation systémique est évaluée par la mesure de l'activité de l'EPO (A) et de la MPO (B), après administration de la vitamine c préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

* $P < 0,05$; Activité de l'EPO ou MPO du groupe de souris prétraitées, comparée à celle du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Activité de l'EPO ou MPO du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparée à celle du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

3.2.4.3 Evaluation de l'effet de la vitamine C sur le stress oxydatif induit par le venin de *Cerastes cerastes*

L'administration de la vitamine C préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *C. cerastes* induit une diminution significative des taux du NO et du MDA au niveau sérique et tissulaire (Figures 41 et 42).

Le prétraitement des animaux envenimés avec la vitamine C, induit une augmentation significative de l'activité de la catalase, sauf au niveau rénal où la valeur reste proche de celle des animaux envenimés. Une augmentation significative des taux du GSH au niveau du myocarde et des parenchymes pulmonaire et rénal a été également observée. Par ailleurs, une légère augmentation du taux de GSH au niveau hépatique est observée chez les souris envenimées et prétraitées avec la vitamine C, cette augmentation reste cependant non significative comparée au taux de GSH des animaux envenimés. La vitamine C semble induire un effet préventif en empêchant la génération du stress oxydatif par le venin de *C. cerastes*.

L'activité antioxydante de la vitamine C est attribuée à l'ascorbate, qui est un donneur d'un atome d'hydrogène responsable de la réduction des autres composés. Il agit sur les radicaux libres dans la phase aqueuse, mais n'est pas capable d'agir sur la peroxydation lipidique dans les compartiments lipophiles (Ozkanlar et Akcay, 2012). En plus de l'action directe sur les processus oxydatifs, les vitamines jouent également un rôle important en tant que cofacteurs enzymatiques, en contribuant à la régulation des processus physiologiques et stimulant l'immunité (Oliveira et al., 2016).

Le mécanisme d'interaction entre les antioxydants et les protéases n'a pas encore été clarifié, l'inhibition de l'activité protéolytique est probablement le résultat d'interactions moléculaires entre les antioxydants et le site actif des protéases (Patiño et al., 2013; De Oliveira et al., 2014). Le principal mécanisme d'inhibition exercé par l'acide glycolique sur les protéases isolées du venin de *Bothrops asper* se produirait par l'abstraction des protons en solution aqueuse et l'attaque nucléophile de l'acide déprotoné sur le groupe carbonyle présent dans un acide aminé appartenant au site catalytique de l'enzyme et responsable de la coordination du cofacteur (Traber et Stevens, 2011; Pereañez et al., 2013; Oliveira et al., 2016).

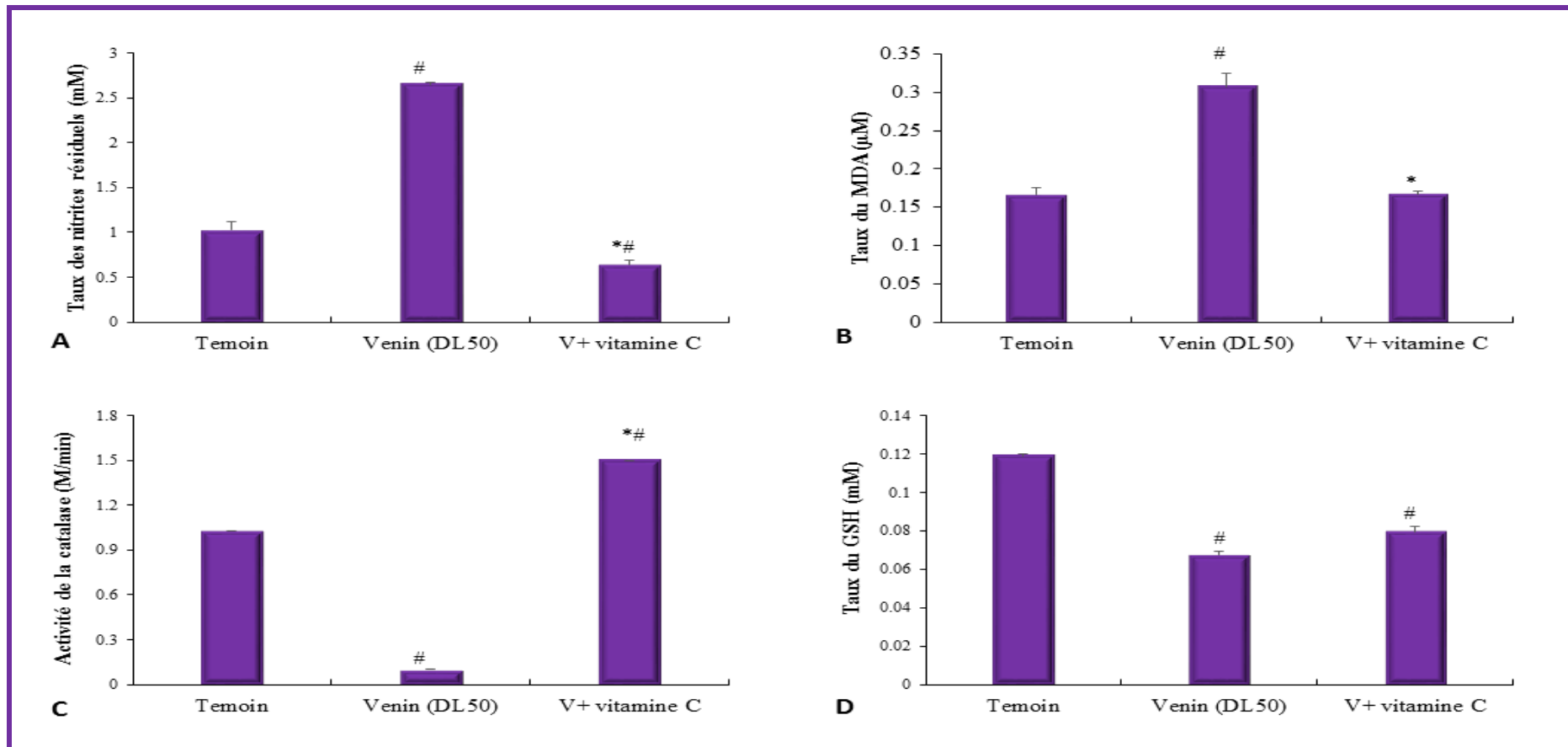


Figure 41 : Evaluation au niveau sérique de l'effet de la vitamine C sur le stress oxydatif induit par le venin de *Cerastes cerastes*. Le stress oxydatif est évalué par la mesure des taux des nitrites résiduels (A) et des taux de Malondialdhyde MDA (B), de l'activité de la catalase (C) et des taux de GSH (D), après administration de la vitamine C préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

* $P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris prétraitées, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

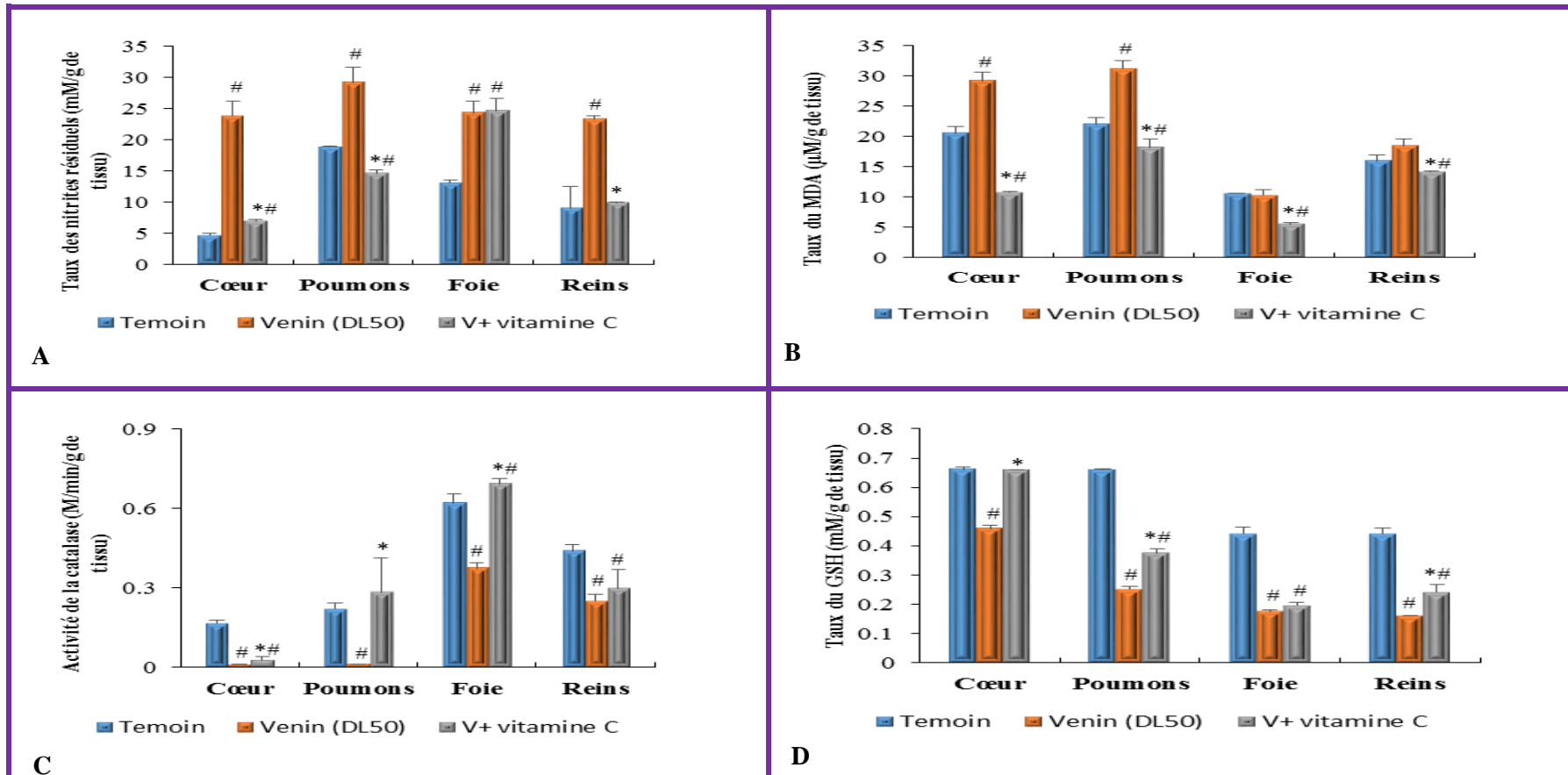


Figure 42 : Evaluation au niveau tissulaire de l'effet de la vitamine C sur le stress oxydatif induit par le venin de *Cerastes cerastes*. Le stress oxydatif est évalué par la mesure des taux des nitrites résiduels (A) et des taux de Malondialdhyde MDA (B), de l'activité de la catalase (C) et des taux de GSH (D), après administration de la vitamine C préalablement à l'injection d'une DL50 de venin de *Cerastes cerastes*.

* $P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris prétraitées, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

$P < 0,05$; Taux de NO, MDA, GSH ou activité de la catalase du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

Certains antioxydants endogènes liposolubles tels que les vitamines E et A inhibent fortement la sPLA2, alors que les anti-oxydants hydrosolubles ne présentent aucun effet (Jameel et al., 2005). Un certain degré d'hydrophobicité serait alors essentiel pour qu'un anti-oxydant soluble dans l'eau interagisse avec la PLA2 probablement avec la région hydrophobe de l'enzyme pour provoquer son inhibition (Mohamed et al., 2010). L'acide ascorbique semble inhiber significativement l'activité de la phospholipase induite par les venins de *B. jararacussu* et *B. alternatus* (Oliveira et al., 2016).

Ces informations nous amènent à suggérer que l'inhibition partielle du stress oxydatif par la vitamine C est due à la polarité de cette molécule.

3.2.4.4 Evaluation de l'effet de la vitamine C sur les altérations tissulaires induites par le venin de *Cerastes cerastes*

L'étude histologique a été réalisée au niveau du myocarde et des parenchymes pulmonaire, hépatique et rénale des souris envenimées recevant préalablement un prétraitement avec la vitamine C (Figure 43).

L'analyse du myocarde révèle une réduction considérable des altérations induites par le venin de *C. cerastes*, après utilisation de la vitamine C. Les fibres myocardiques présentent une structure semblable à celles des souris témoins. Une disparition de l'œdème interstitiel ainsi que l'hémorragie est observée (Figure 43A, B et C).

Une diminution des altérations pulmonaires est observée après prétraitement par la vitamine C. En effet, des structures pulmonaires quasi normales avec des épaissements très limités ont été observées, ainsi que l'absence d'œdème, de zones hémorragiques et d'infiltration leucocytaire chez les animaux ayant reçu la vitamine C préalablement au venin (Figure 43D, E et F).

Une réduction de la désorganisation du parenchyme hépatique est observée après prétraitement des souris avec la vitamine C comparée à la structure du parenchyme hépatique après administration d'une DL50 du venin de *C. cerastes*. Les hépatocytes sont vacuolisés, ils se disposent en files radiaires autour de la veine centro-lobulaire non congestionnée avec persistance de la dilatation de la paroi sinusoidale (Figure 43G, H et I).

L'administration de la vitamine C, préalablement à l'envenimation, semble avoir un effet protecteur contre les effets toxiques du venin de *C. cerastes* au niveau du cortex rénal.

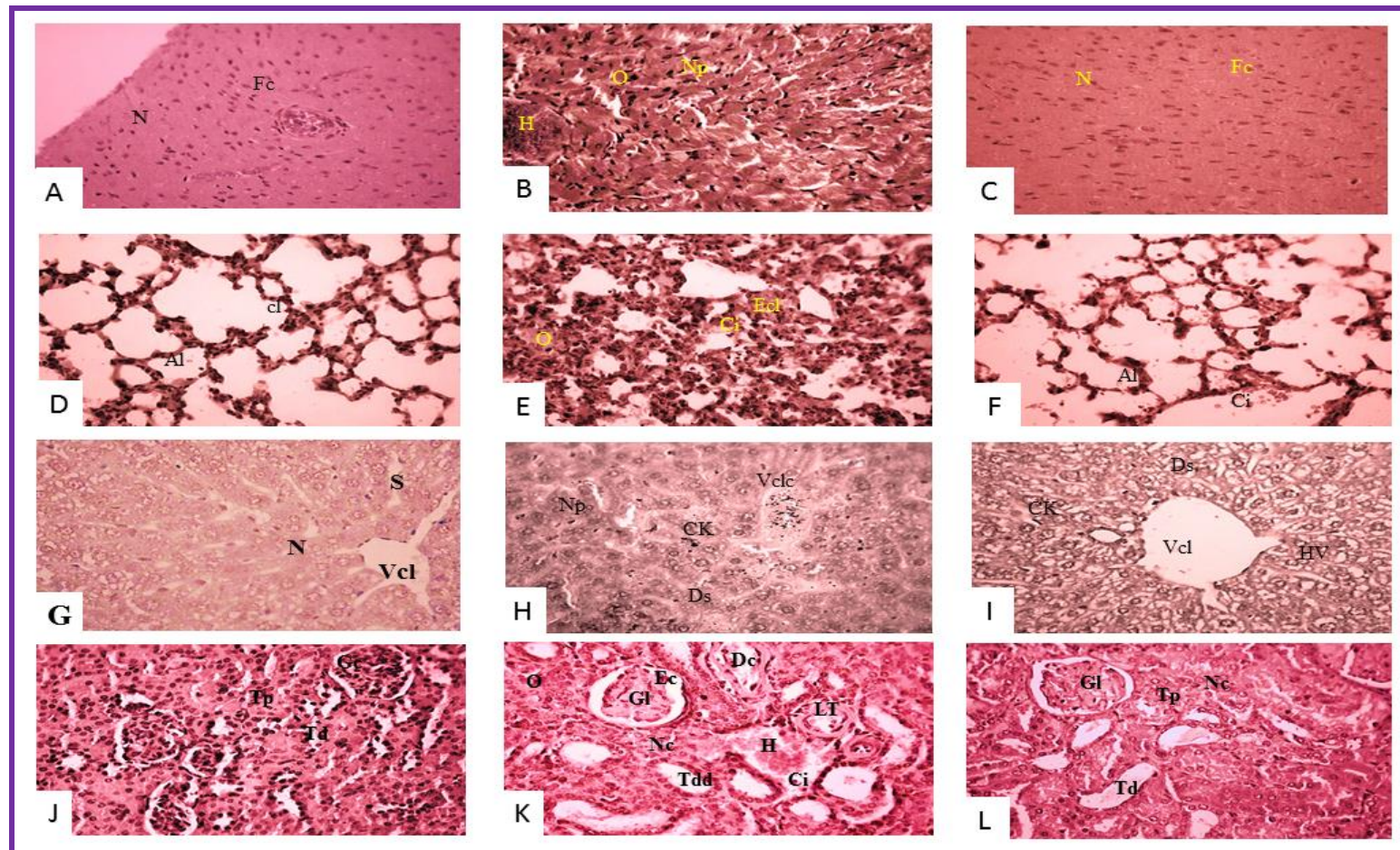


Figure 43 : Evaluation de l'effet de la vitamine C sur les altérations tissulaires induites par le venin de *Cerastes cerastes*. Les panels (A, D, G et J) montrent respectivement des contrôles des tissus cardiaque, pulmonaire, hépatique et rénal. Les panels (B, E, H et K) montrent les modifications histologiques au niveau des tissus cardiaque, pulmonaire, hépatique et rénal) après 24 h d'envenimation, Les panels (C, F, I et L) montrent les modifications histologiques au niveau des tissus cardiaque, pulmonaire, hépatique et rénal) après 24 h d'envenimation préalablement traités avec la vitamine C. VCL: Veine centrolobulaire, CCLV: Veine centrolobulaire congestionnée , CK: Cellule de Kupffer, N: noyaux, NP: Noyaux pycnotiques, S : sinusoid, DS: dilatation sinusoidale, Al: Alvéole, Ci: cellules inflammatoires, O: Oedème, Ecl: épaisseur de cloison intra-alvéolaire, Fc: fibres cardiaques et H: hémorragie, G : Glomérule, TP : tube proximal, Td : tube distale, Tdd : tube distale dilaté, Dc : débris cellulaires, Ec : espace capsulaire, LT : lésion tubulaire (Coloration H.E. Grossissement x 400).

En effet, des tubules moins dilatés, une disparition de l'œdème et de l'hémorragie et une réduction des zones nécrotiques sont observés (Figure 43J, K et L).

L'analyse histopathologique du myocarde et des parenchymes pulmonaire, hépatique et rénal des animaux prétraités avec la vitamine C révèle un effet protecteur des tissus contre les effets toxiques du venin de *C. cerastes* due à l'apport exogène d'un antioxydant.

3.3 Etude de la cytotoxicité de la fraction peptidique hautement toxique D3

3.3.1 Analyse spectrale UV-visible de la fraction D3

La fraction F3 est obtenue à la fin d'un profil chromatographique obtenu par filtration moléculaire sur Sephadex G-75 du venin de *Cerastes cerastes* (Chelghoum, 2009). Elle est dépourvue de toutes activités enzymatiques (amidolytique, phospholipasique A2, 5'-nucléotidase, ATPase, ADPase, pyrophosphatase, phosphatase alcaline et phosdiestérase), elle est cependant douée de faibles activités caséinolytique et arginine-estérase (Saoud, 2017).

La sous-fraction hautement cytotoxique D3 est issue du fractionnement de la F3 par une chromatographie échangeuse d'anions. L'analyse par spectroscopie UV-visible a montré que la fraction D3 absorbe à trois longueurs d'onde différentes (274, 266 et 218 nm) avec une forte absorption à 218 nm (DO = 1,923) (Figure 44). Cette fraction D3 semble être formée de polypeptides de faible masse moléculaire.

3.3.2 Evaluation *in vivo* de la cytotoxicité de la fraction peptidique D3

3.3.2.1 Infiltration des cellules inflammatoires induite par la fraction peptidique D3

Les résultats de l'évaluation de la réponse inflammatoire induite par la fraction peptidique D3 issue du venin de *C. cerastes* ont montré une augmentation significative de l'activité de l'EPO dans le sérum et dans le tissu hépatique comparée à celle des souris envenimés avec le venin de *C. cerastes*. Une légère augmentation de l'activité de l'EPO a été également observée au niveau du tissu cardiaque comparée à celle des souris témoins injectés avec NaCl 0,9%. Aucune modification significative des activités de l'EPO n'est cependant observée dans les tissus pulmonaires et rénaux (Figure 45A, C et E). Une augmentation significative de l'activité de la MPO a été observée dans le sérum et dans tous les tissus comparée à celle des souris témoins injectés avec NaCl 0,9%. L'infiltration des polynucléaires au niveau des tissus pulmonaires, hépatiques et rénaux semble être plus intense en réponse à la fraction peptidique D3 qu'au venin total. Les valeurs sérique et cardiaque de la MPO sont cependant proches de celles des animaux envenimés (Figure 45B, D et F).

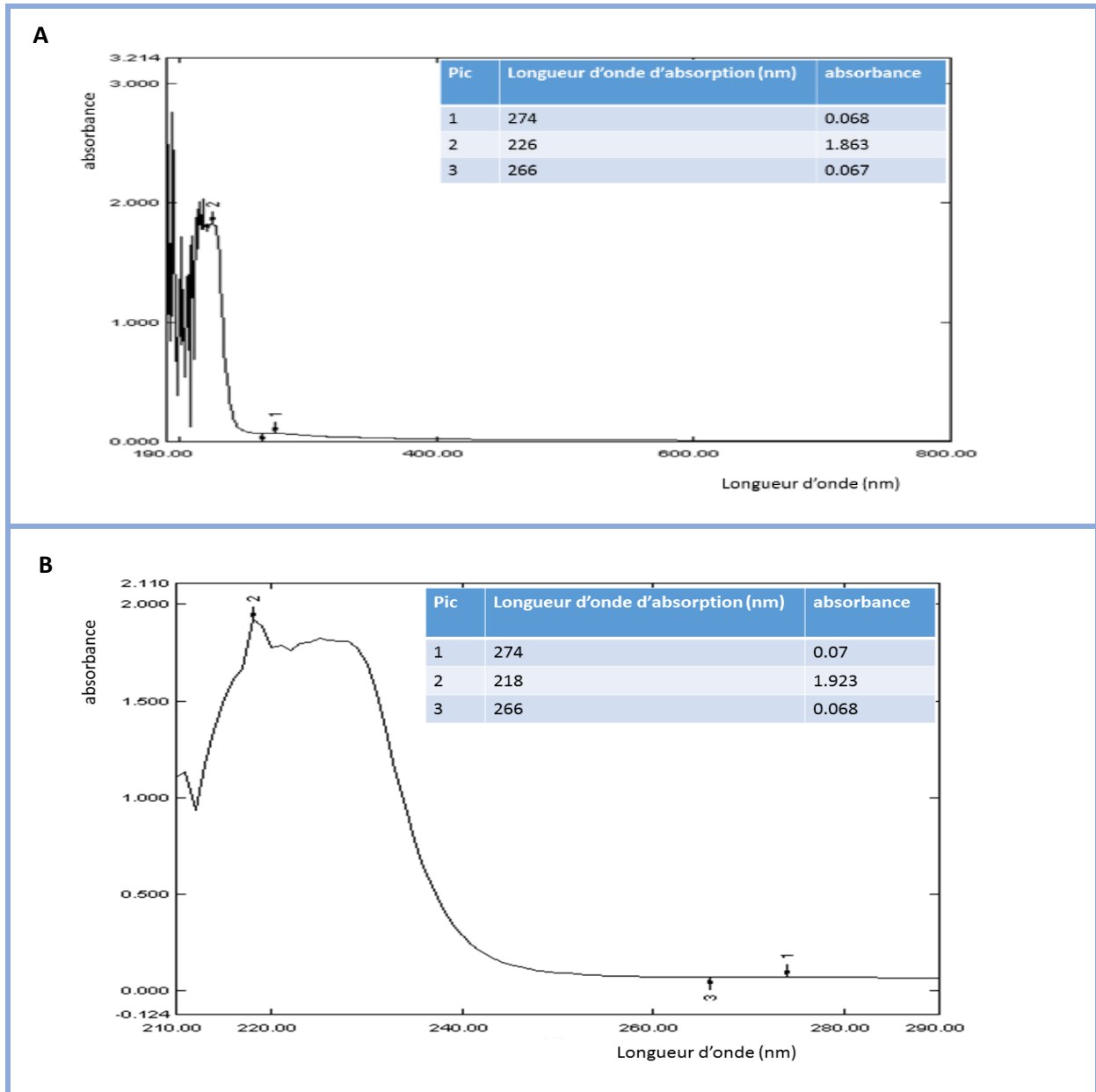


Figure 44 : Analyse spectrale de la fraction D3. *Spectre d'absorption UV-visible de la fraction D3 (A) et le zoom de ce spectre entre 210 et 290 nm (B).*

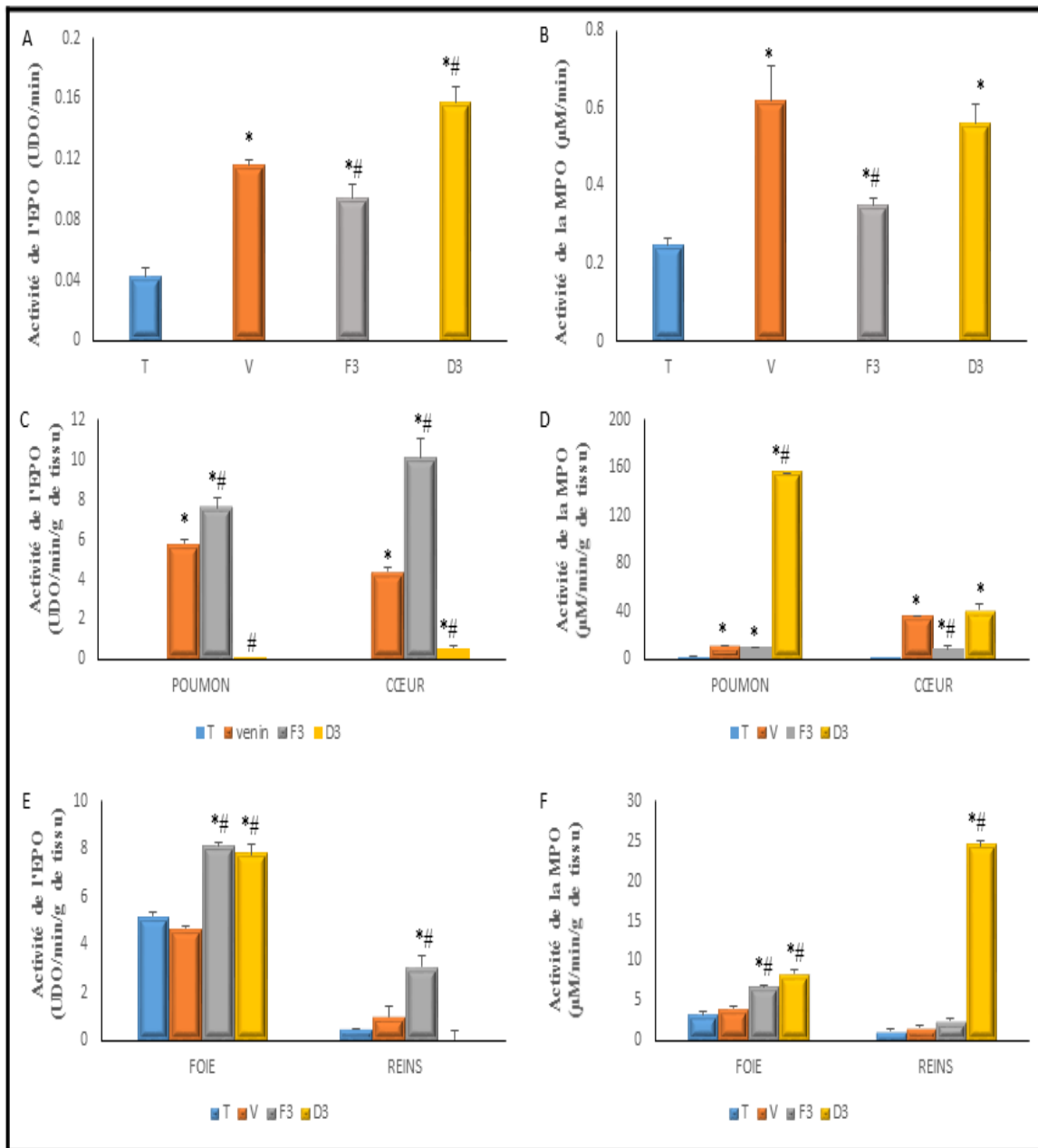


Figure 45: Réponse inflammatoire induite par la fraction D3. L'inflammation systémique est évaluée par la mesure de l'activité de l'EPO et de la MPO dans les sérums (A et B), dans le myocarde et le parenchyme pulmonaire (C et D) et dans les tissus hépatique et rénal (E et F) après 3h d'administration du venin ou des fractions F3 et D3. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM.

* $P < 0,05$; Activité de l'EPO ou MPO du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes* ou les fractions F3 et D3, comparée à celle du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

$P < 0,05$; Activité de l'EPO ou MPO du groupe de souris traitées avec les fractions F3 et D3, comparée à celle du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

L'effet cytotoxique de la fraction peptidique D3 semble être associé à une réponse inflammatoire systémique et à un recrutement des polynucléaires neutrophiles. La fraction D3 est douée de fortes des activités oedématisante et myotoxique non associée à l'hémorragie (Chelghoum, 2009).

3.3.2.2 Déséquilibre redox induit par la fraction peptidique D3

Une augmentation significative des taux des pro-oxydants (NO et MDA) et une diminution des taux des anti-oxydants sont observées à 3 h après l'administration de la fraction peptidique D3 comparé à ceux des animaux témoins (NaCl 0,9%) et à ceux des envenimés (venin : 1 DL50) (figure 46 et 47). La fraction D3, administrée à très faible dose, est capable d'induire un stress oxydant au niveau de tous les organes après 3 h. La cinétique du stress oxydant, observée suite à l'administration d'une dose létale du venin, a montré un déséquilibre redox après 3 h seulement au niveau des tissus pulmonaire et cardiaque et après 24 h au niveau des tissus hépatique et rénal. La fraction D3 semble être douée d'un pouvoir oxydant plus important que celui observé avec le venin total. Cette activité semble être due à une bio-distribution rapide des fractions de faible masse moléculaire comparée à celle des fractions de masse moléculaire plus élevée (Bjarnason et Fox, 1994).

3.4 Evaluation *in vitro* de la cytotoxicité induite par le venin de *Cerastes cerastes*

3.4.1 Effet du venin de *Cerastes cerastes* sur le foie isolé

Afin de confirmer les résultats obtenus dans l'étude de la cytotoxicité du venin de *C. cerastes* réalisée *in vivo*, l'intégrité de la membrane et les dommages tissulaires ainsi que le stress oxydatif ont été évalués dans les surnageants et les homogénats tissulaires d'un foie isolé après traitement avec le venin de *C. cerastes*.

Après incubation et perfusion du foie avec le venin (20 µg/ml), une augmentation significative de l'activité de la LDH est observée dans le surnageant de culture, elle est accompagnée d'une diminution significative de la LDH dans l'homogénat tissulaire, suggérant ainsi une libération du contenu cellulaire causée suite aux altérations tissulaires (Figure 48A). Les résultats obtenus après incubation du foie isolé pendant 3 h avec le venin ont révélé que ce dernier présente les mêmes effets observés dans l'étude *in vivo* après 24 h. Ces résultats ont montré une augmentation significative des biomarqueurs pro-oxydants (MDA et nitrites) et

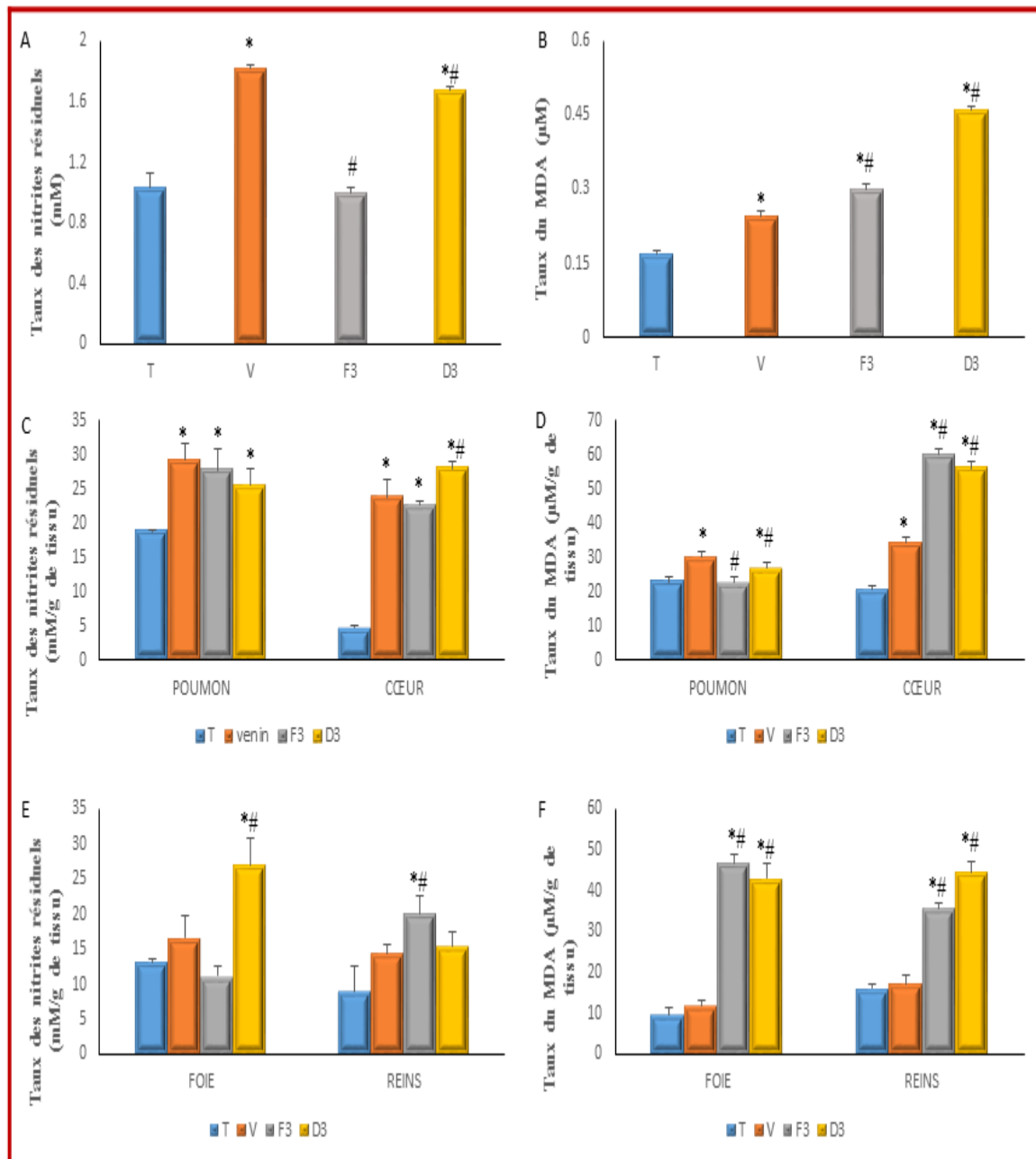


Figure 46 : Evaluation des biomarqueurs pro-oxydants après administration de la fraction D3. Le stress oxydatif est évalué par la mesure des taux de nitrites résiduels et de la peroxydation lipidique (MDA) dans les sérums (A et B), dans le myocarde et le parenchyme pulmonaire (C et D) et dans les tissus hépatique et rénal (E et F) après 3h d'administration du venin ou des fractions F3 et D3. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM.

* $P < 0,05$; Taux de NO et MDA du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes* ou les fractions F3 et D3, comparée à ceux du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

$P < 0,05$; Taux de NO et MDA du groupe de souris traitées avec les fractions F3 et D3, comparée à ceux du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

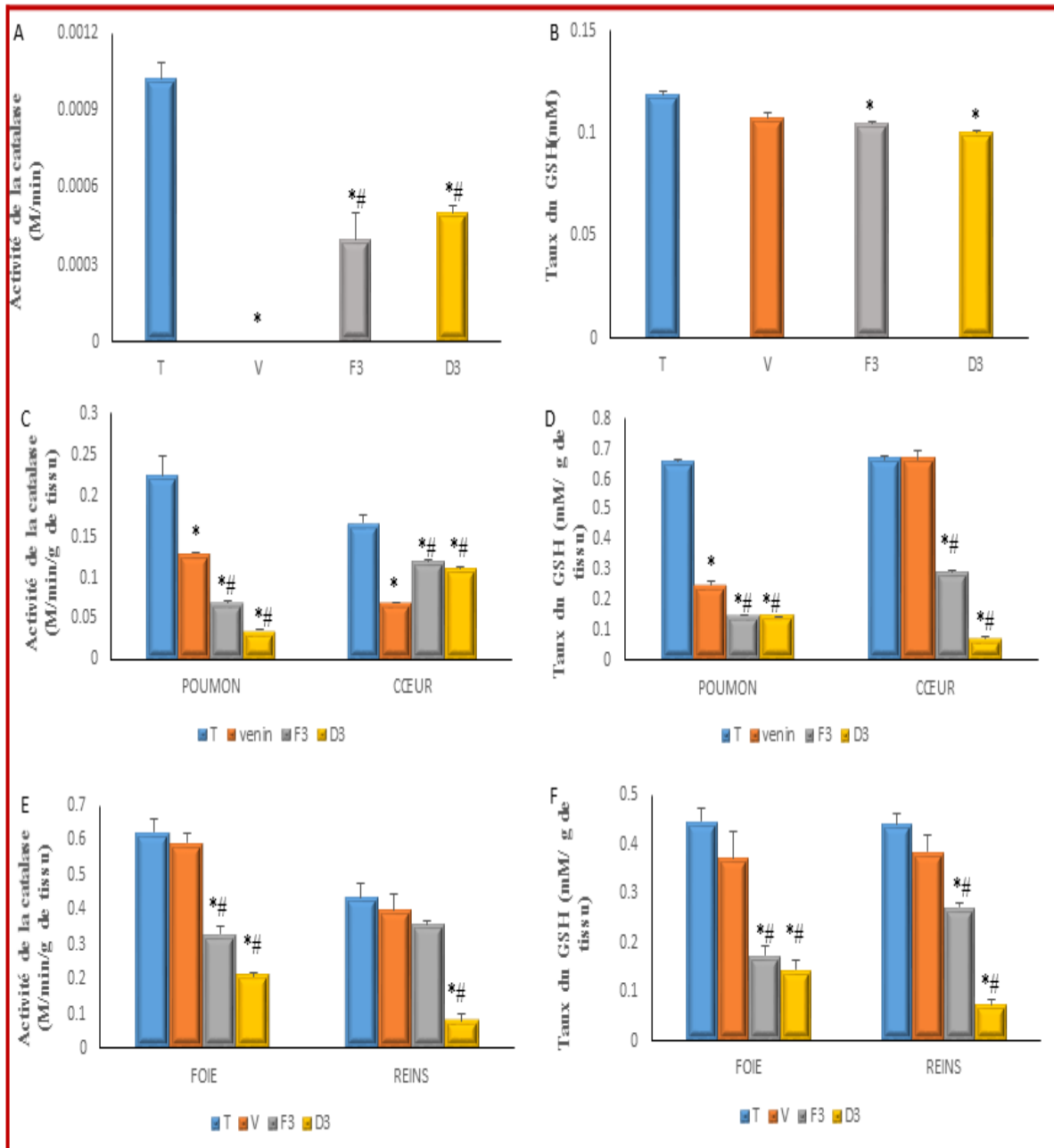


Figure 47 : Evaluation des biomarqueurs antioxydants après administration de la fraction D3. Le stress oxydatif est évalué par la mesure de l'activité de la catalase et du taux de GSH dans les sérums (A et B), dans le myocarde et le parenchyme pulmonaire (C et D) et dans les tissus hépatique et rénal (E et F) après 3h d'administration du venin ou des fractions F3 et D3. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM.

* $P < 0,05$; Taux de GSH ou activité de la catalase du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes* ou les fractions F3 et D3, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris témoins injectées avec NaCl 0,9%.

$P < 0,05$; Taux de GSH ou activité de la catalase du groupe de souris traitées avec les fractions F3 et D3, comparé(e) à celui (celle) du groupe de souris envenimées avec le venin de *C. cerastes*.

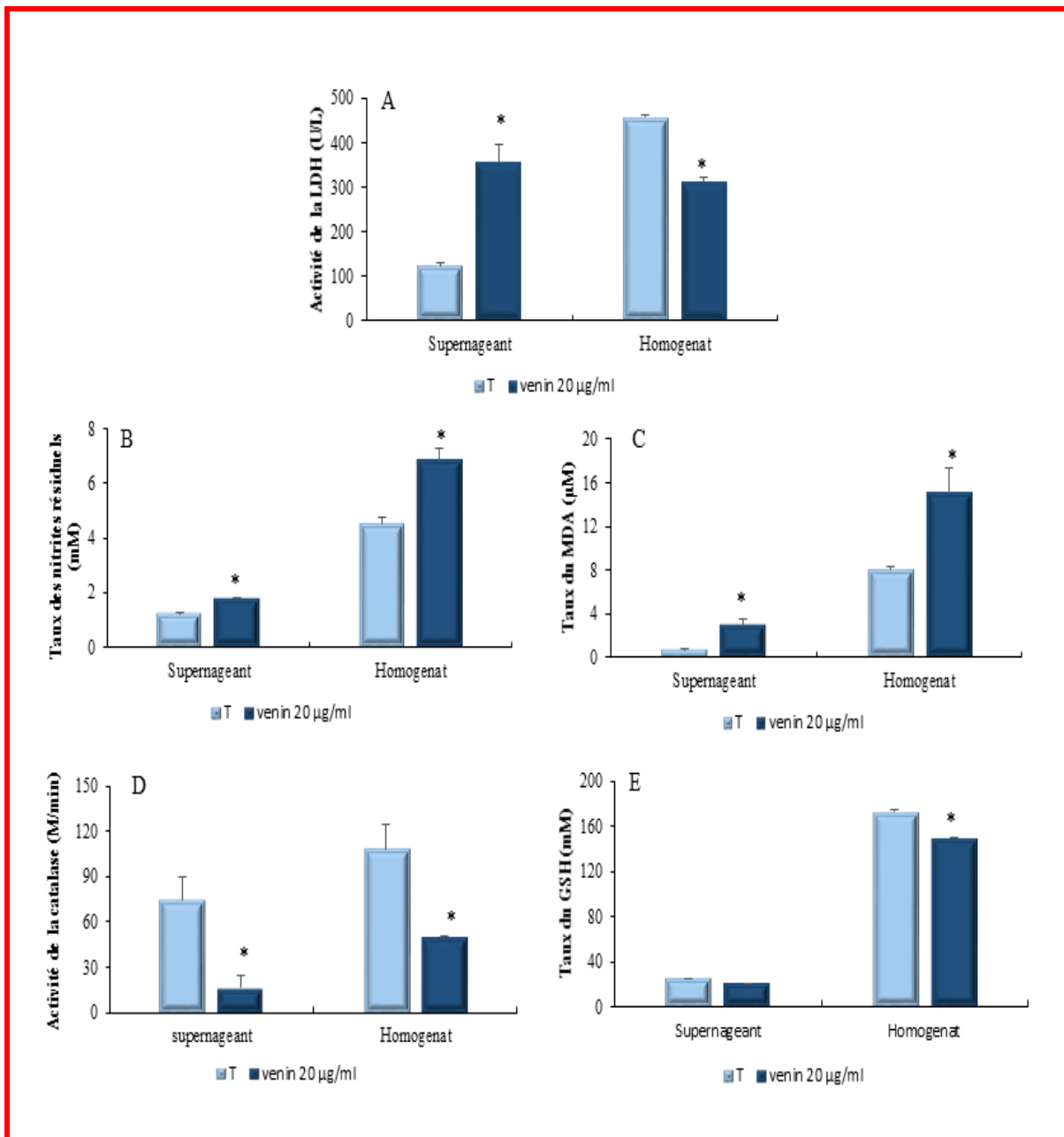


Figure 48 : Effets du venin de *Cerastes cerastes* sur le foie isolé. L'effet cytotoxique du venin est évalué par mesure de l'activité de la LDH (A). Le stress oxydatif est évalué par la mesure des taux des nitrites résiduels (B), du taux de MDA (C), de l'activité de la catalase (D) et des taux du GSH (E) dans le surnageant et l'homogénat du foie isolé après 24 h d'incubation avec le venin. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. * $P < 0,05$.

une diminution de l'activité de la catalase et du taux de GSH dans le surnageant et l'homogénat du foie isolé (Figure 48B-E).

La cinétique de la réponse inflammatoire et du stress oxydatif semble être liée à la cinétique de la biodistribution du venin dans les différents organes.

L'injection du venin d'*Echis pyramidum* a provoqué une hépatotoxicité en phase aiguë chez les souris avec des lésions hépatiques accompagnées d'une diminution significative des activités des enzymes antioxydantes, d'un appauvrissement des thiols totaux (T-SH) et d'une augmentation du TBARS (substances réactives à l'acide thiobarbiturique) dans le foie, montrant ainsi le rôle des ERO dans les lésions hépatiques (Al Asmari et al., 2015).

Le venin brut de *Naja haje* (0,025 µg/kg de poids corporel) a induit une peroxydation lipidique et une production d'oxyde nitrique dans le sérum et le foie avec une réduction concomitante du glutathion, de la catalase, de la glutathion réductase et des activités de la glutathion-S transférase. Ces résultats ont été associés à une induction de l'apoptose au niveau du foie (Al-Quraishy et al., 2014).

L'hépatotoxicité induite par le venin de *Cerastes cerastes* semble être médiée par les enzymes contenues dans ce venin, par activation de la réponse inflammatoire et par un déséquilibre de la balance oxydative.

3.4.2 Effet cytotoxique du venin de *Cerastes cerastes* sur des PBMC humaines

L'effet cytotoxique du venin de *C. cerastes* sur les cellules immunitaires humaines est analysé par l'évaluation de la viabilité cellulaire, la libération de la LDH et l'induction du stress oxydatif. L'incubation des PBMC avec le venin de *C. cerastes* pendant 24 h, entraîne une diminution significative de la viabilité cellulaire avec une IC₅₀ de 21 µg de venin/ml/10⁶ de cellules (Figure 49A). Les résultats obtenus ont montré que l'effet cytotoxique du venin de *C. cerastes* sur les PBMC est dose-dépendant. Cet effet est faible par rapport à celui de la molécule de référence la Cisplatine (Incel, Darrow®) dont l'IC₅₀ est de 14,6 µg/ml sur les PBMC (Costa et al., 2015).

Une augmentation significative de l'activité de la LDH est observée au niveau des surnageants des PBMC cultivées pendant 24 h à faibles doses de venin (1 µg/ml/10⁶ cellules). Aucune modification significative de l'état redox dans les PBMC cultivées n'est observée après 24 heures de traitement avec la même dose du venin (Figure 49B-F).

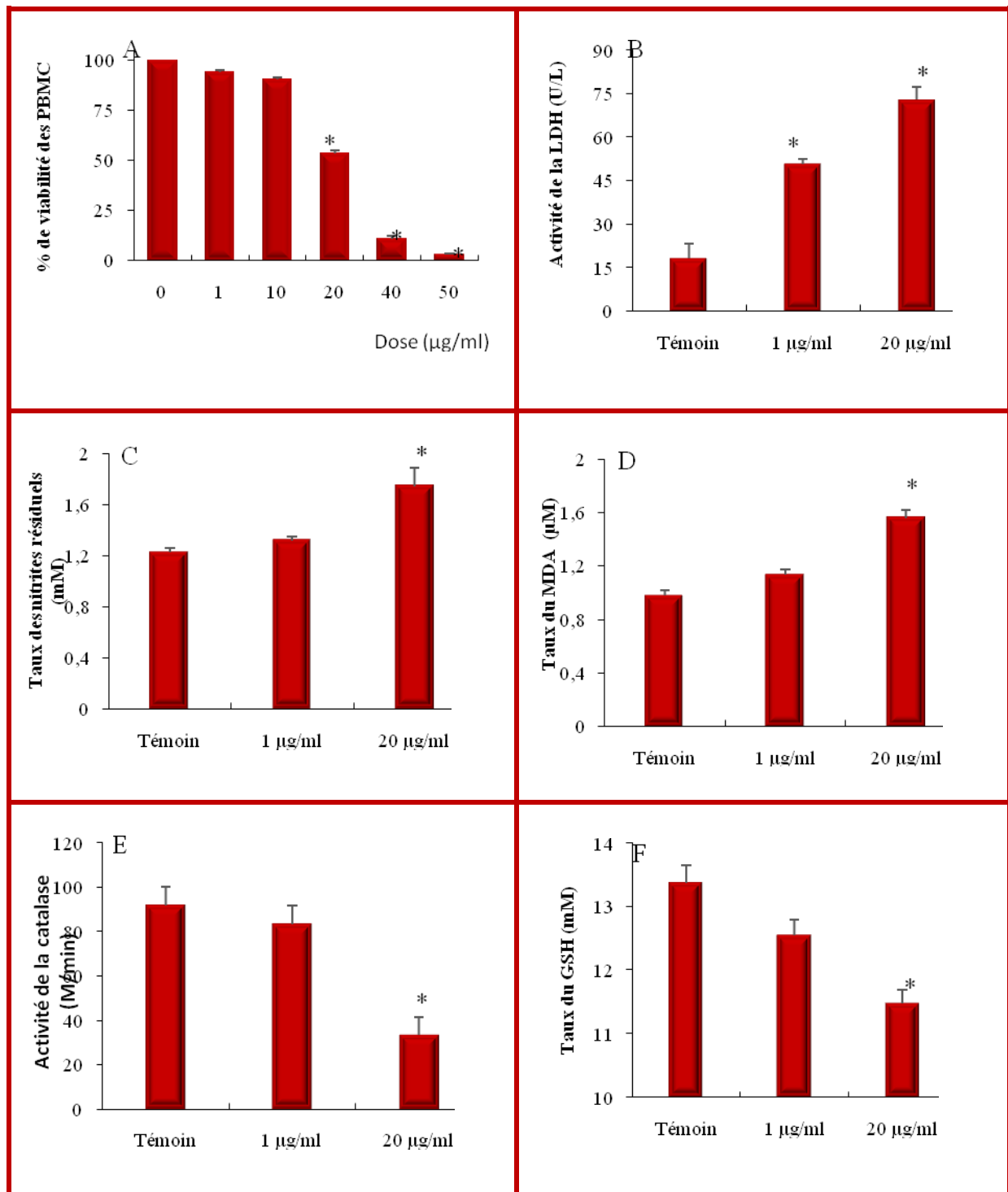


Figure 49 : Effets du venin de *Cerastes cerastes* sur les PBMC. L'effet cytotoxique du venin sur les PBMC a été évalué par le test exclusion au bleu de Trypan, après 24 h d'incubation (A) et la mesure de l'activité de la LDH (B), le stress oxydatif a été évalué par la mesure des taux des nitrites résiduels (C), le taux du MDA (D), l'activité de la catalase (E) et le taux du GSH (F) dans le surnageant de culture des PBMC après 24 h d'incubation avec le venin. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM. * $P < 0,05$.

Le venin à faibles doses semble être incapable d'induire un stress oxydatif, suggérant ainsi un effet direct des composants du venin. Ces derniers semblent affecter l'intégrité de la membrane et provoquer un relargage du contenu cellulaire des PBMC.

Une augmentation significative de l'activité de la LDH et un déséquilibre des marqueurs pro et antioxydants sont cependant observés après incubation des PBMC avec une forte dose du venin (20 µg/ml/10⁶ cellules). Il semblerait qu'en plus des effets directs des molécules du venin, les résultats obtenus révèlent, un effet indirect à fortes doses, caractérisé par l'induction d'un stress oxydatif.

D'autres études ont rapporté que les venins de serpents ou leurs composants purifiés tels que la PLA₂ et les L-amino oxydases n'ont aucun effet toxique sur les neutrophiles ou les PBMC humaines incubées avec le venin pendant moins de 12 h. Ces venins et leurs composants peuvent cependant stimuler ces cellules immunitaires et permettre la libération des médiateurs pro-inflammatoires (Nunes *et al.*, 2011; da Silva Setubal *et al.*, 2013; Pontes *et al.*, 2014). La cytotoxicité *in vitro* des venins de serpents semble être dose- et temps-dépendante.

3.4.3 Effet cytotoxique du venin de *C. cerastes* sur des hépatocytes murins isolés

L'intégrité de la membrane, les dommages cellulaires (activité de la LDH) et le stress oxydatif ont été évalués dans le surnageant de culture des hépatocytes après traitement avec le venin de *C. cerastes*.

Aucune modification significative de l'activité de la LDH et de l'état redox n'a été observée dans le surnageant de culture des hépatocytes isolés ; à faible dose de venin de *C. cerastes* (1 µg/ml/10⁶ cellules). Une augmentation significative de l'activité de la LDH est cependant observée avec un déséquilibre des marqueurs pro- et antioxydants après incubation des hépatocytes avec une forte dose du venin (20 µg/ml/10⁶ cellules) (Figure 50). Il semble que les faibles doses de venin n'ont aucun effet sur les hépatocytes ni sur l'intégrité de la membrane ni sur l'équilibre redox.

Les dommages hépatocellulaires se produisent lorsque la membrane des hépatocytes perd son intégrité et libère le contenu cellulaire. Les sinusoides hépatiques n'ont pas de membrane basale et l'endothélium présente une grande porosité (Silva *et al.*, 2011).

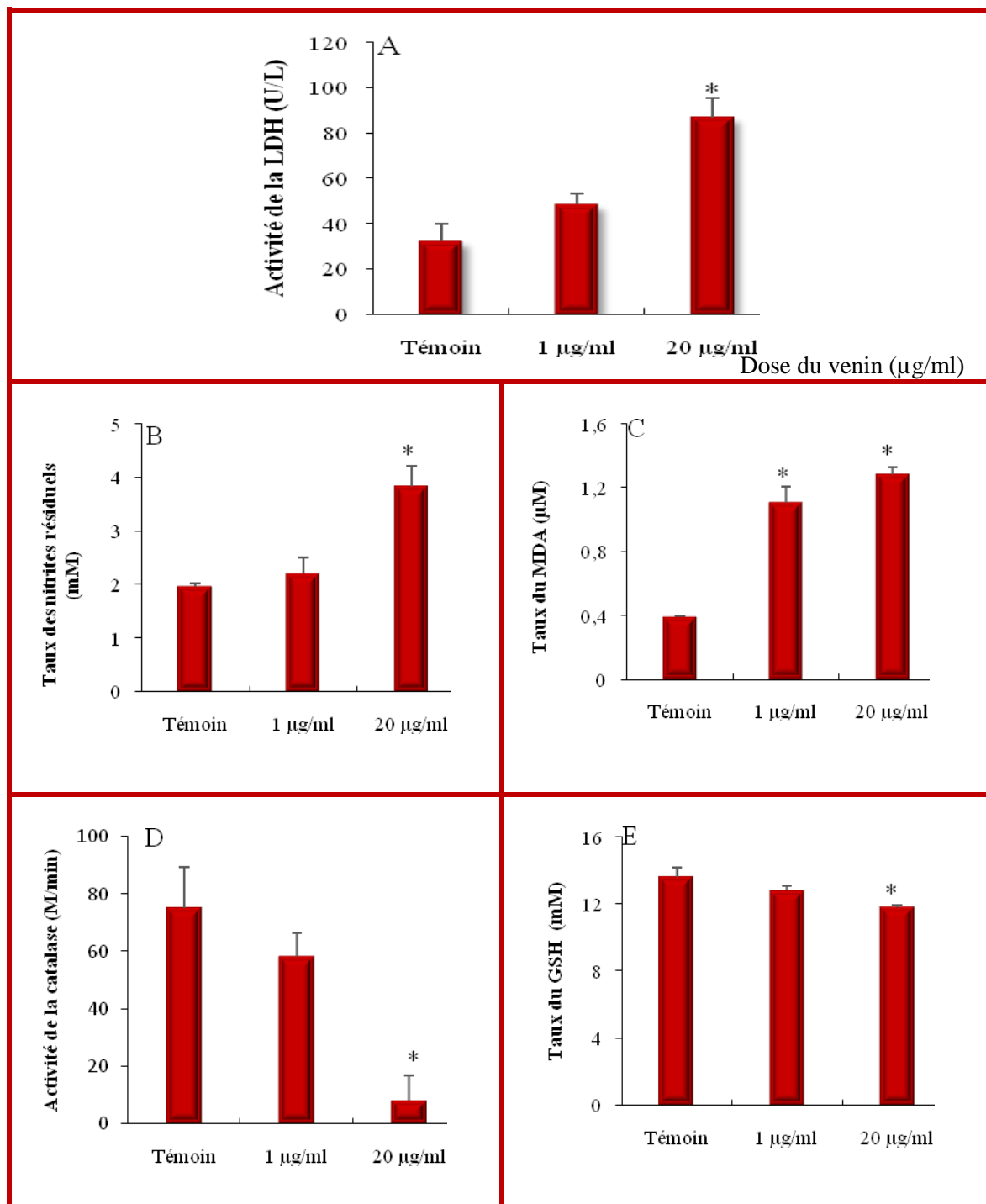


Figure 50 : Effets du venin de *Cerastes cerastes* sur les hépatocytes murins. L'effet cytotoxique du venin sur les hépatocytes est évalué par la mesure de l'activité de la LDH (A). Le stress oxydatif est évalué par la mesure des taux des nitrites résiduels (B), le taux du MDA (C), l'activité de la catalase (D) et le taux du GSH (E) dans le surnageant de culture des hépatocytes après 24 h d'incubation avec le venin. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. * $P < 0,05$.

Ces particularités anatomiques du foie sont probablement les causes de l'élévation du taux de la LDH dans le surnageant de culture des hépatocytes après traitement avec le venin de *C. cerastes*, indiquant ainsi une lésion tissulaire directe provoquée par le venin.

La peroxydation lipidique induite par le venin d'*Echis pyramidum* au niveau du parenchyme hépatique pourrait être attribuée à une disponibilité accrue d'acides gras qui se sont mobilisés après dégradation des phospholipides en présence de PLA2. Une corrélation directe a été observée entre le degré de peroxydation lipidique et l'hydrolyse des phospholipides médiés par le PLA2 (Sevanian et al., 1988). L'exposition *in vitro* des cellules endothéliales au venin de serpent a permis de générer des ERO intracellulaires conduisant à une apoptose. Cette apoptose a été accélérée par la buthionine sulfoximine (inhibiteur de la Gamma-glutamylcysteine synthétase) et le diéthylthiocarbamate (inhibiteur de Cu, Zn-superoxyde dismutase). Ces données indiquent que les taux intracellulaire du glutathion et du superoxyde jouent un rôle essentiel dans la cytotoxicité des venins de serpents (Suzuki et al., 1997). Le traitement par des antioxydants pourrait atténuer les dommages cellulaires induits par les venins de serpents par l'inhibition de la cascade oxydante et l'amélioration de la stabilisation de la membrane (Mukherjee et Maity, 1997; Alam et Gomes, 1998).

L'exposition des membranes cellulaires à la phospholipase de venin de *N. haje* diminue significativement les activités de Na⁺/K⁺ATPase, modifiant ainsi les gradients ioniques, désorganisant la bicouche lipidique membranaire et finissant éventuellement par la mort cellulaire (Chethankumar et Srinivas, 2008). Le venin de *N. haje* induit l'apoptose des hépatocytes par une transcription élevée du gène de la caspase-3 (Al-Quraishy et al., 2014). Ces résultats suggèrent que le venin de serpent peut augmenter l'expression de certains gènes pro-apoptotiques conduisant ainsi à une apoptose cellulaire.

Discussion générale

Discussion générale

L'inflammation et le stress oxydatif jouent un rôle central dans la pathophysiologie de l'envenimation par morsures de serpents. Dans cette étude, la réponse inflammatoire est caractérisée par une augmentation significative des activités de l'EPO et de la MPO dans les sérums et les tissus, suggérant un recrutement des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles en réponse au venin de *Cerastes cerastes*. La génération des médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-8, l'IL-1 β et IL-6 ainsi que la libération de PGE2 et des NETs (Neutrophil Extracellular Traps); peuvent être dues aux composants du venin (PLA₂ et L-aminooxydases). Ces molécules sont responsables de la libération des médiateurs inflammatoires et du recrutement des cellules immunitaires dans les tissus, déclenchant ainsi une réponse inflammatoire locale et systémique (Teixeira et al., 2003; Nunes et al., 2011; da Silva Setubal et al., 2013; Chérifi et al., 2014; Pontes et al., 2014).

La présente étude montre que le venin de *C. cerastes* induit un stress oxydatif au niveau des organes (cœur, poumons, foie et rein), suggérant que les neutrophiles et les éosinophiles représentent une source d'espèces réactives d'oxygène (ERO) et d'espèces réactives de l'azote (ERA). Ces derniers jouent un rôle central dans les lésions cellulaires et la nécrose à travers plusieurs mécanismes complexes, y compris la dénaturation des protéines, les dommages de l'ADN et la peroxydation des lipides membranaires (Bekheet et al., 2013).

Les résultats de cette étude concordent avec ceux d'autres études, qui ont montré l'implication du NO dans l'envenimation causée par le venin de serpent *Bothrops atrox* (Barros et al., 1998; Moreira et al., 2012; Zengin et al., 2013). Le NO est aussi impliqué dans la peroxydation lipidique au niveau du foie, du poumon et du cœur des souris après 3 h d'injection du venin de serpent *Echis pyramidum* (Al Asmari et al., 2015). Il est aussi impliqué dans les perturbations dues aux stress oxydants/nitrosants et de l'apoptose au niveau du foie, du cœur et des reins des rats traités avec le venin *Naja haje* (Moneim et al., 2015).

Les produits oxydants ont la capacité de diminuer ou d'inactiver les médiateurs antioxydants qui sont liés à la chronicité de la réponse inflammatoire dans les poumons ou dans d'autres organes (Fitzpatrick et al., 2011; Nadeem et al., 2014a; Nadeem et al., 2014b; Nadeem et al., 2014). Les traitements à l'aide d'antioxydants semblent réduire les effets cytotoxiques de la CR-LAAO du venin de *Calloselasma rhodostoma*, suggérant ainsi l'implication du peroxyde d'hydrogène dans les mécanismes de toxicité des venins de serpents (Costa et al., 2015).

Les effets cytotoxiques du venin de *C. cerastes* semblent se produire assez tôt (3 h) dans le poumon et le cœur et plus tardifs au niveau du foie et des reins (24 h). La cinétique de la réponse inflammatoire et du stress oxydatif pourrait être liée à la cinétique de la biodistribution du venin dans les différents organes. Cette hypothèse est soutenue par les résultats obtenus sur le foie isolé perfusé avec du venin et les résultats de la cytotoxicité induite *in vivo* par la fraction peptidique D3 de faible poids moléculaire où l'activité oxydante a été observée après 3 h. La pharmacocinétique des venins de *Viperidae* est complexe. Après une phase initiale d'absorption rapide, il s'en suit une phase d'absorption lente qui persiste pendant 72 h après l'envenimation (Audebert et al., 1994). Cette complexité de la pharmacocinétique semble être due à la présence des protéines de faible masse moléculaire (PLA2 et autres peptides) et de la fraction de masse moléculaire élevée de 20 à 100 kDa (métalloprotéinases et serine protéinases). Ces dernières présentent un volume de distribution plus faible et une demi-vie d'élimination plus élevée que celle des fractions de faible masse moléculaire (Bjarnason et Fox, 1994). La cytotoxicité du venin de *C. cerastes* semble être liée à la complexité des composants de venins de serpents.

Les effets *in vitro* du venin de serpent *Cerastes cerastes* sur les PBMC, les hépatocytes et le foie isolé, concordent avec les effets toxiques observés au niveau du sang périphérique et du foie après envenimation expérimentale. Lors d'une envenimation, l'effet de la phospholipase sur les phospholipides membranaires pourrait être parmi les facteurs responsables de la rupture des membranes cellulaires hépatiques et des dommages cellulaires (Mukherjee et Maity, 1998) et à l'origine des effets toxiques observés dans la présente étude.

La cytotoxicité du venin de *C. cerastes* évaluée *in vitro* sur les PBMC, les hépatocytes et le foie isolé est accompagnée d'une augmentation significative des taux de NO et de MDA et d'une diminution significative des taux de GSH et de l'activité de la catalase. Il semble que le stress oxydant est généré au niveau des PBMC et des hépatocytes isolés et cultivés avec le venin de *C. cerastes*. Le stress oxydatif induit par le venin de *C. cerastes* semble avoir plusieurs origines soit les cellules immunitaires (inflammatoire), soit les cellules non inflammatoires (mitochondriale). L'augmentation de la production d'oxydants n'est pas nécessairement associée à un dommage oxydatif, mais dans le cas de l'envenimation, l'augmentation des biomarqueurs pro-oxydants est souvent liée aux altérations tissulaires, ce qui est confirmé par une augmentation de l'activité de la LDH observée dans les surnageants de culture des PBMC et des hépatocytes isolées incubées avec le venin de *C. cerastes*. La dégradation des lipides membranaires en raison de l'activité enzymatique des enzymes PLA2

pourrait conduire à la libération des contenus intracellulaires provoquant un stress oxydatif (Fernandes et al., 2014).

L'exposition directe du venin de *viperidae* au sang humain a considérablement augmenté les marqueurs de stress, les enzymes cytoplasmiques, lysosomales et extracellulaires dégradant la matrice ainsi que les médiateurs pro-inflammatoires indiquant un état de stress oxydatif et une inflammation aigue (Santhosh et al., 2013).

Les ERO interviennent dans la régulation de l'apoptose, en effet, le NO joue le rôle de régulateur bi-fonctionnel de l'apoptose, les concentrations physiologiques de NO inhibent les voies apoptotiques, cependant le NO à des concentrations élevées inhibe les mécanismes protecteurs et déclenche des processus pro-apoptotiques (Nicotera et al., 1998; Jo et al., 2000). Les modifications de la transduction du signal cellulaire par les ERO transmettront des informations pour stimuler un dysfonctionnement de la croissance, de la différenciation et de la mort cellulaire (Lee et Lee, 2006). Il semble que les ERO, produites par le venin de *C. cerastes* (à fortes doses), pourraient participer également à la mort cellulaire. De nombreuses études ont rapporté que les venins de serpents possèdent une activité antitumorale potentielle et peuvent induire une apoptose des cellules normales et tumorales (Sarray et al., 2007; Zhang et Wei, 2007; Zhang et Wu, 2008; Bazaa et al., 2009; Gebrim et al., 2009; Rodrigues et al., 2009; Wang et al., 2009).

Dans cette étude, la spironolactone (antagoniste de récepteurs minéralocorticoïdes) et le L-NAME (inhibiteur non sélectif des NOS) ont pu améliorer les effets toxiques du venin de *Cerastes cerastes* observés au niveau des tissus pulmonaire, cardiaque, hépatique et rénale suggérant ainsi l'implication des récepteurs minéralocorticoïdes et de la NOS dans l'envenimation induite par le venin de *C. cerastes*. Des troubles cardiovasculaires ont été observés lors des envenimations ophidiennes (Gutiérrez et al., 2017). Le NO est impliqué dans la régulation du système circulatoire, il permet la dilatation des vaisseaux sanguins et influence la contractilité myocardique (Paulus, 1994). Le système rénine-angiotensine est également un facteur important dans la régulation de la circulation. L'utilisation du L-NAME (inhibiteur non sélectif des NOS) et de la spironolactone (antagoniste du récepteur des minéralocorticoïdes, approuvé par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux pour être utiliser comme inhibiteur du système rénine-angiotensine-aldostérone) semble être efficace pour réduire les effets du venin sur le système circulatoire.

Les effets inflammatoires induits par les venins semblent être le résultat de la libération des eicosanoïdes tels que les prostaglandines (PG), le thromboxane et les leucotriènes (Farsky et al., 1997; Zamuner et Teixeira, 2002; Moreira et al., 2007; Moreira et al., 2009a). Ces médiateurs sont impliqués dans le développement d'événements inflammatoires tels que la douleur, l'œdème, la chimiotaxie et l'activation des leucocytes au niveau du site inflammatoire (Chaves et al., 1995; Zamuner et Teixeira, 2002; Olivo et al., 2007; Teixeira et al., 2009). Dans les cas pathologiques, la formation de PGE₂ est liée principalement à la COX-2 quel que soit le type de cellule ou les différents stimuli pathologiques (Matsumoto et al., 1997). La COX-1 constitutive est principalement recrutée dans la biosynthèse immédiate des prostanoides, qui se produit quelques minutes après les stimuli, la COX-2 inductible quant à elle est nécessaire à la biosynthèse retardée des prostanoides, qui dure plusieurs heures après divers stimuli (James et al., 2001; Naraba et al., 1998). La COX-2 semble être impliquée dans la production de PG et la production de TXA₂ induisant un stress oxydant suite à l'injection du venin de *Cerastes cerastes*.

Les vitamines sont les principaux antioxydants obtenus par l'alimentation, elles sont impliquées dans les métabolismes énergétique et lipidique, la biosynthèse des acides aminés et des hormones. Elle est impliquée également dans le contrôle vasomotrice et le transport des ions métalliques et du glucose. Il semble que la maturation des cellules sanguines, la réparation des dommages de l'ADN, la formation des eicosanoïdes et la stimulation du système immunitaire nécessite aussi la vitamine C (You et al., 2009; Traber et Stevens, 2011; Du et al., 2011; Coquille et al., 2012). Les réactions inflammatoires chroniques dues à l'activité des PLA₂ des venins de serpents génèrent en continu des intermédiaires lipidiques à radicaux libres pro-inflammatoires et d'autres radicaux libres tels que les radicaux hydroxyle et superoxyde. L'acide ascorbique, un antioxydant puissant peut jouer le rôle d'une molécule anti-inflammatoire en inhibant l'activité de sPLA₂ et par conséquent réduire les effets toxiques des venins de serpents engendrés par l'activité des sPLA₂. Cependant, la synthèse d'un dérivé de l'acide L-ascorbique semble être nécessaire pour inhiber l'activité de PLA₂, en augmentant son hydrophobicité sans toutefois altérer ses propriétés antioxydantes (Mohamed et al., 2010).

Conclusion et perspectives

Conclusion

Les résultats obtenus dans cette étude, indiquent que la persistance de l'inflammation associée au stress oxydatif peut jouer un rôle dans la pathophysiologie induite lors de l'envenimation ophidienne, qui entraîne des défaillances au niveau des organes vitaux (coeur, poumons, foie et rein). L'augmentation des taux des pro-oxydants au niveau des différents organes est capable d'induire une diminution systémique des antioxydants. La cinétique de la réponse inflammatoire est celle du stress oxydant est complexe et ce à l'image de la complexité de la composition des venins de serpents. La fraction peptidique D3 douée d'activité cytotoxique semble être impliquée dans l'induction de la réponse inflammatoire et du stress oxydant observés avec le venin de *Cerastes cerastes* mais avec des cinétiques plus rapides, indiquant une biodistribution rapide des molécules de faible masse moléculaire. L'inflammation et le stress oxydant sont deux phénomènes étroitement liés, lors de l'envenimation par le venin de *C. cerastes*. Les récepteurs minéralocorticoïdes semblent également être impliqués dans la cytotoxicité induite par le venin de *Cerastes cerastes*. Cette phase aiguë d'inflammation et du stress oxydatif souligne l'importance de la combinaison de plusieurs thérapies anti inflammatoires, anti-oxydantes ainsi que celle des inhibiteurs des récepteurs minéralocorticoïdes pour une meilleure prise en charge des victimes envenimées.

En perspectives et en continuité de ce travail il est intéressant de :

- Purifier et de caractériser, sur le plan biochimique et pharmacologique, la fraction hautement cytotoxique du venin de *Cerastes cerastes*
- Analyser l'effet cytotoxique du venin (ou de ses composants) sur des lignées cellulaires
- Etudier l'effet thérapeutique du venin et de ses constituants peptidiques sur des modèles pathologiques.
- Etudier la relation entre la sévérité de l'envenimation et le taux endogène des vitamines.
- Approfondir l'étude de l'implication des récepteurs minéralocorticoïdes dans l'envenimation.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdelkafi-Koubaa, Z., Jebali, J., Othman, H., Morjen, M., Aissa, I., Zouari-Kesentini, R., Bazaa, A., Ellefi, A.A., Majdoub, H., Srairi-Abid, N., 2014. A thermoactive L-amino acid oxidase from *Cerastes cerastes* snake venom: purification, biochemical and molecular characterization. *Toxicon* 89, 32-44.
- Abib, H., Laraba-Djebari, F., 2003. Effects of ⁶⁰Co gamma radiation on toxicity and hemorrhagic, myonecrotic, and edema-forming activities of *Cerastes cerastes* venom. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 81(12), 1125-1130.
- Adibhatla, R.M., Hatcher, J., 2008. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies. *BMB reports* 41(8), 560.
- Adibhatla, R.M., Hatcher, J.F., Dempsey, R.J., 2003. Phospholipase A2, hydroxyl radicals, and lipid peroxidation in transient cerebral ischemia. *Antioxidants and Redox Signaling* 5(5), 647-654.
- Aebi, H., 1984. [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 105, 121-126.
- Agarwal, A., Said, T.M., Bedaiwy, M.A., Banerjee, J., Alvarez, J.G., 2006. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertility and sterility* 86(3), 503-512.
- Ahkong, C., 2015. Venins de serpents: entre toxicité et intérêt en thérapeutique humaine.
- Akarasreenont, P., Mitchell, J., Appleton, I., Thiemermann, C., Vane, J., 1994. Involvement of tyrosine kinase in the induction of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase by endotoxin in cultured cells. *British journal of pharmacology* 113(4), 1522-1528.
- Al-Quraishy, S., Dkhil, M.A., Moneim, A.E.A., 2014. Hepatotoxicity and oxidative stress induced by *Naja haje* crude venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 20(1), 42.
- Al Asmari, A.K., Khan, H.A., Banah, F.A., Al Buraidi, A.A., Manthiri, R.A., 2015. Serum biomarkers for acute hepatotoxicity of *Echis pyramidum* snake venom in rats. *International journal of clinical and experimental medicine* 8(1), 1376.

- Alam, M., Gomes, A., 1998. Viper venom-induced inflammation and inhibition of free radical formation by pure compound (2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid) isolated and purified from anantamul (*Hemidesmus indicus* R. BR) root extract. *Toxicon* 36(1), 207-215.
- Alexander, G., Grothusen, J., Zepeda, H., Schwartzman, R.J., 1988. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon* 26(10), 953-960.
- Allane, D., Oussedik-Oumehdi, H., Harrat, Z., Seve, M., Laraba-Djebari, F., 2018. Isolation and characterization of an anti-leishmanial disintegrin from *Cerastes cerastes* venom. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 32(2).
- Ami, A., Oussedik-Oumehdi, H., Laraba-Djebari, F., 2017. Biochemical and biological characterization of a dermonecrotic metalloproteinase isolated from *Cerastes cerastes* snake venom. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 31(2).
- Angulo, Y., Núñez, C.E., Lizano, S., Soares, A.M., Lomonte, B., 2001. Immunochemical properties of the N-terminal helix of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 39(6), 879-887.
- Ariasnegrete, S., Keller, K., Chadee, K., 1995. Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* 208(2), 582-589.
- Audebert, F., 1993. Analyse clinique et pharmacocinétique des envenimations par les vipères européennes. Thèse de doctorat présentée à l'université de Paris VII. 167 p.
- Audebert, F., Urtizbera, M., Sabouraud, A., Scherrmann, J.-M., Bon, C., 1994. Pharmacokinetics of *Vipera aspis* venom after experimental envenomation in rabbits. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 268(3), 1512-1517.
- Bader, M., 2010. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology* 50, 439-465.
- Balligand, J.-L., Ungureanu-Longrois, D., Simmons, W.W., Pimental, D., Malinski, T.A., Kapturczak, M., Taha, Z., Lowenstein, C.J., Davidoff, A.J., Kelly, R.A., 1994.

- Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 269(44), 27580-27588.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., 1995. Families and clans of serine peptidases. *Archives of biochemistry and biophysics* 318(2), 247-250.
- Barros, S., Friedlanskaia, I., Petricevich, V., Kipnis, T., 1998. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Mediators Inflamm* 7(5), 339-346.
- Bauersachs, J., Jaisser, F., Toto, R., 2015. Mineralocorticoid receptor activation and mineralocorticoid receptor antagonist treatment in cardiac and renal diseases. *Hypertension* 65(2), 257-263.
- Bazaa, A., Luis, J., Srairi-Abid, N., Kallech-Ziri, O., Kessentini-Zouari, R., Defilles, C., Lissitzky, J.-C., El Ayeb, M., Marrakchi, N., 2009. MVL-PLA2, a phospholipase A2 from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. *Matrix Biology* 28(4), 188-193.
- Bekheet, S.H., Awadalla, E.A., Salman, M.M., Hassan, M.K., 2013. Prevention of hepatic and renal toxicity with bradykinin potentiating factor (BPF) isolated from Egyptian scorpion venom (*Buthus occitanus*) in gentamicin treated rats. *Tissue and Cell* 45(2), 89-94.
- Bene, N.C., Alcaide, P., Wortis, H.H., Jaffe, I.Z., 2014. Mineralocorticoid receptors in immune cells: emerging role in cardiovascular disease. *Steroids* 91, 38-45.
- Bertolini, A., Ottani, A., Sandrini, M., 2001. Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacological Research* 44(6), 437-450.
- Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacology & therapeutics* 62(3), 325-372.

- Blanc, L., Barres, C., Bette-Bobillo, P., Vidal, M., 2007. Reticulocyte-secreted exosomes bind natural IgM antibodies: involvement of a ROS-activatable endosomal phospholipase iPLA2. *Blood* 110(9), 3407-3416.
- Boldrini-França, J., Cologna, C.T., Pucca, M.B., Bordon, K.d.C.F., Amorim, F.G., Anjolette, F.A.P., Cordeiro, F.A., Wiesel, G.A., Cerni, F.A., Pinheiro-Junior, E.L., 2017. Minor snake venom proteins: Structure, function and potential applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1861(4), 824-838.
- Boukhalfa-Abib, H., Laraba-Djebari, F., 2015. Ccmp-ii, a new hemorrhagic metalloproteinase from *Cerastes cerastes* snake venom: Purification, biochemical characterization and amino acid sequence analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 167, 65-73.
- Boukhalfa-Abib, H., Meksem, A., Laraba-Djebari, F., 2009. Purification and biochemical characterization of a novel hemorrhagic metalloproteinase from horned viper (*Cerastes cerastes*) venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 150(2), 285-290.
- Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology* 78(3), 206-209.
- Brown, N.J., 2013. Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. *Nature Reviews Nephrology* 9(8), 459-469.
- Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *Journal of lipid research* 50(Supplement), S237-S242.
- Burniston, J.G., Saini, A., Tan, L.-B., Goldspink, D.F., 2005. Aldosterone induces myocyte apoptosis in the heart and skeletal muscles of rats in vivo. *Journal of molecular and cellular cardiology* 39(2), 395-399.
- Burns, J., 1957. Missing step in man, monkey and guinea pig required for the biosynthesis of L-ascorbic acid. *Nature* 180(4585), 553.

- Caimi, G., Carollo, C., Montana, M., Vaccaro, F., Lo, P.R., 2008. Elastase, myeloperoxidase, nitric oxide metabolites and oxidative status in subjects with clinical stable chronic renal failure on conservative treatment. *Clin Hemorheol Microcirc* 43(3), 253-258.
- Câmara, P.R., Esquisatto, L.C., Camargo, E.A., Ribela, M.T.C., Toyama, M.H., Marangoni, S., De Nucci, G., Antunes, E., 2003. Inflammatory oedema induced by phospholipases A 2 isolated from *Crotalus durissus* sp. in the rat dorsal skin: a role for mast cells and sensory C-fibers. *Toxicon* 41(7), 823-829.
- Cameron, E., Pauling, L., 1976. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73(10), 3685-3689.
- Carr, A.C., Frei, B., 1999. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans—. *The American journal of clinical nutrition* 69(6), 1086-1107.
- Casewell, N.R., Wüster, W., Vonk, F.J., Harrison, R.A., Fry, B.G., 2013. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in ecology & evolution* 28(4), 219-229.
- Chadwick, J.A., Bhattacharya, S., Lowe, J., Weisleder, N., Rafael-Fortney, J.A., 2016a. Renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors improve membrane stability and change gene expression profiles in dystrophic skeletal muscles. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, ajpcell. 00269.02016.
- Chadwick, J.A., Hauck, J.S., Lowe, J., Shaw, J.J., Guttridge, D.C., Gomez-Sanchez, C.E., Gomez-Sanchez, E.P., Rafael-Fortney, J.A., 2015. Mineralocorticoid receptors are present in skeletal muscle and represent a potential therapeutic target. *The FASEB Journal* 29(11), 4544-4554.
- Chadwick, J.A., Swager, S.A., Lowe, J., Welc, S.S., Tidball, J.G., Gomez-Sanchez, C.E., Gomez-Sanchez, E.P., Rafael-Fortney, J.A., 2016b. Myeloid cells are capable of synthesizing aldosterone to exacerbate damage in muscular dystrophy. *Human molecular genetics* 25(23), 5167-5177.
- Chaves, F., Barboza, M., Gutiérrez, J., 1995. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 33(1), 31-39.

- Chelghoum, H., 2009. Etude de l'activité oedématisante et myotoxique induite par le venin de cerastes cerastes. USTHB, ALGER, ALGERIE, p. 82.
- Chen, Q., Espey, M.G., Sun, A.Y., Pooput, C., Kirk, K.L., Krishna, M.C., Khosh, D.B., Drisko, J., Levine, M., 2008. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(32), 11105-11109.
- Cherifi, F., 2011. Apport de l'analyse protéomique dans la purification et la caractérisation de nouvelles biomolécules pharmacologiquement actives à partir de venin de Cerastes cerastes.
- Chérifi, F., Namane, A., Laraba-Djebari, F., 2014. Isolation, functional characterization and proteomic identification of CC2-PLA2 from Cerastes cerastes venom: a basic platelet-aggregation-inhibiting factor. *The protein journal* 33(1), 61-74.
- Chérifi, F., Rousselle, J.-C., Namane, A., Laraba-Djebari, F., 2010. CCSV-MPase, a novel procoagulant metalloproteinase from Cerastes cerastes venom: purification, biochemical characterization and protein identification. *The protein journal* 29(7), 466-474.
- Chethankumar, M., Srinivas, L., 2008. Gangliosides as potential inhibitors of Naja naja venom PLA2 (NV-PLA2) induced human erythrocyte membrane damage. *African Journal of Biochemistry Research* 2(1), 008-014.
- Chippaux, J.-P., 2002. Venins de serpent et envenimations. IRD éditions.
- Chippaux, J.-P., 2017. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 23(1), 38.
- Chippaux, J.P., 1998. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Health organization* 76(5), 515.
- Coelho, F.M., Pessini, A.C., Coelho, A.M., Pinho, V.S., Souza, D.G., Arantes, E.C., Teixeira, M.M., Teixeira, A.L., 2007. Platelet activating factor receptors drive CXC chemokine production, neutrophil influx and edema formation in the lungs of mice injected with Tityus serrulatus venom. *Toxicon* 50(3), 420-427.

- Coquille, S., Roux, C., Fitzpatrick, T.B., Thore, S., 2012. The last piece in the vitamin b1 biosynthesis puzzle structural and functional insight into yeast 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine phosphate (hmp-p) synthase. *Journal of Biological Chemistry* 287(50), 42333-42343.
- Costa, T.R., Burin, S.M., Menaldo, D.L., de Castro, F.A., Sampaio, S.V., 2014. Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 20(1), 23.
- Costa, T.R., Menaldo, D.L., da Silva, C.P., Sorrechia, R., de Albuquerque, S., Pietro, R.C., Ghisla, S., Antunes, L.M.G., Sampaio, S.V., 2015. Evaluating the microbicidal, antiparasitic and antitumor effects of CR-LAAO from *Calloselasma rhodostoma* venom. *International journal of biological macromolecules* 80, 489-497.
- Crofford, L.J., Oates, J.C., McCune, W.J., Gupta, S., Kaplan, M.J., Catella-Lawson, F., Morrow, J.D., McDonagh, K.T., Schmaier, A.H., 2000. Thrombosis in patients with connective tissue diseases treated with specific cyclooxygenase 2 inhibitors: a report of four cases.
- Curti, B., 1992. D-and L-amino acid oxidases. *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes* 3, 69-94.
- D'suze, G., Moncada, S., González, C., Sevcik, C., Aguilar, V., Alagón, A., 2003. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. *Toxicon* 41(3), 367-375.
- da Silva Setubal, S., Pontes, A.S., Nery, N.M., Bastos, J.S.F., Castro, O.B., Pires, W.L., Zaqueo, K.D., de Azevedo Calderon, L., Stábeli, R.G., Soares, A.M., 2013. Effect of *Bothrops bilineata* snake venom on neutrophil function. *Toxicon* 76, 143-149.
- de Araújo, A.L., de Souza, A.O.v., da Cruz-Höfling, M.A., Flores, C.A., Bon, C., 2000. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. *Toxicon* 38(2), 209-221.

- De Belder, A.J., Why, H.J., Richardson, P., Bucknall, C., Martin, J., Radomski, M., Salas, E., Moncada, S., 1993. Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *The Lancet* 341(8837), 84-85.
- de Carvalho, S.C., Apolinário, L.M., Matheus, S.M.M., Santo Neto, H., Marques, M.J., 2013. EPA protects against muscle damage in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy by promoting a shift from the M1 to M2 macrophage phenotype. *Journal of neuroimmunology* 264(1), 41-47.
- De Oliveira, E.C., Fernandes, C.P., Sanchez, E.F., Rocha, L., Fuly, A.L., 2014. Inhibitory effect of plant *Manilkara subsericea* against biological activities of *Lachesis muta* snake venom. *BioMed research international* 2014.
- Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V., Kokotos, G., 2011. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical reviews* 111(10), 6130-6185.
- Diaz, B.L., Arm, J.P., 2003. Phospholipase A 2. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 69(2), 87-97.
- Dixon, R.W., Harris, J.B., 1996. Myotoxic activity of the toxic phospholipase, notexin, from the venom of the Australian tiger snake. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 55(12), 1230-1237.
- Dixon, R.W., Harris, J.B., 1999. Nerve terminal damage by β -bungarotoxin: its clinical significance. *The American journal of pathology* 154(2), 447-455.
- Djebari, F.L., Martin-Eauclaire, M.F., 1990. Purification and characterization of a phospholipase A2 from *Cerastes cerastes* (horn viper) snake venom. *Toxicon* 28(6), 637-646.
- Dojki, F.K., Bakris, G., 2017. Nonsteroidal mineralocorticoid antagonists in diabetic kidney disease. *Current opinion in nephrology and hypertension* 26(5), 368-374.
- Du, Q., Wang, H., Xie, J., 2011. Thiamin (vitamin B1) biosynthesis and regulation: a rich source of antimicrobial drug targets? *International journal of biological sciences* 7(1), 41.

- Du, X.-Y., Clemetson, K.J., 2002. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon* 40(6), 659-665.
- Ducancel, F., Goyffon, M., 2008. Les venins des Atractaspis. *Médecine tropicale* 68(4), 340-347.
- El-Safory, N.S., Fazary, A.E., Lee, C.-K., 2010. Hyaluronidases, a group of glycosidases: current and future perspectives. *Carbohydrate Polymers* 81(2), 165-181.
- El Hakim, A., Salama, W., Hamed, M., Ali, A., Ibrahim, N., 2015. Heterodimeric l-amino acid oxidase enzymes from Egyptian *Cerastes cerastes* venom: Purification, biochemical characterization and partial amino acid sequencing. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 13(2), 165-176.
- Ellis, G.R., Anderson, R.A., Lang, D., Blackman, D.J., Morris, R.K., Morris-Thurgood, J., McDowell, I.F., Jackson, S.K., Lewis, M.J., Frenneaux, M.P., 2000. Neutrophil superoxide anion-generating capacity, endothelial function and oxidative stress in chronic heart failure: effects of short-and long-term vitamin C therapy. *Journal of the American College of Cardiology* 36(5), 1474-1482.
- Escalante, T., Franceschi, A., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M.a., 2000. Effectiveness of batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Biochemical pharmacology* 60(2), 269-274.
- Escocard, R.d.C.M., Kanashiro, M.M., Petretski, J.H., Azevedo-Silva, J., de Carvalho, E.C.Q., da Silva, W.D., Kipnis, T.L., 2006. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Immunobiology* 211(1), 37-46.
- Evans, R.M., 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240(4854), 889-895.
- Farsky, S.H., Walber, J., Costa-Cruz, M., Curry, Y., Teixeira, C.F., 1997. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. *Toxicon* 35(2), 185-193.

- Faure, G., Goyffon, M., 2010. Inhibiteurs naturels de phospholipases A2(PLI) du sang de serpent. Homologie structurale avec des protéines de la réponse immunitaire. Aspects cliniques des envenimations graves, 22-33.
- Fernandes, C.A., Borges, R.J., Lomonte, B., Fontes, M.R., 2014. A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A2-like proteins from viperid snake venoms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1844(12), 2265-2276.
- Fitzpatrick, A.M., Teague, W.G., Burwell, L., Brown, M.S., Brown, L.A.S., 2011. Glutathione oxidation is associated with airway macrophage functional impairment in children with severe asthma. *Pediatric research* 69(2), 154-159.
- Fox, J.W., Serrano, S.M., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45(8), 969-985.
- Fox, J.W., Serrano, S.M., 2008. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *The FEBS journal* 275(12), 3016-3030.
- Franceschi, A., Rucavado, A., Mora, N., Gutiérrez, J.M.a., 2000. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 38(1), 63-77.
- Freedman, J.E., Snyder, S., 1981. Vipoxin. A protein from Russell's viper venom with high affinity for biogenic amine receptors. *Journal of Biological Chemistry* 256(24), 13172-13179.
- Fuentes, E., Pereira, J., Mezzano, D., Alarcón, M., Caballero, J., Palomo, I., 2014. Inhibition of platelet activation and thrombus formation by adenosine and inosine: studies on their relative contribution and molecular modeling. *PloS one* 9(11), e112741.
- Fung, S., Tan, N., 2009. Snake venom L-amino acid oxidases. *Handbook of venoms and toxins of reptiles*, 221-235.

- Gebrim, L.C., Marcussi, S., Menaldo, D.L., de Menezes, C.S., Nomizo, A., Hamaguchi, A., Silveira-Lacerda, E.P., Homsí-Brandeburgo, M.I., Sampaio, S.V., Soares, A.M., 2009. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A 2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. *Biologicals* 37(4), 222-229.
- Geyer, A., Fitzpatrick, T.B., Pawelek, P.D., Kitzing, K., Vrieling, A., Ghisla, S., Macheroux, P., 2001. Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. *The FEBS journal* 268(14), 4044-4053.
- Gilroy, D.W., Tomlinson, A., Willoughby, D.A., 1998. Differential effects of inhibitors of cyclooxygenase (cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2) in acute inflammation. *European journal of pharmacology* 355(2-3), 211-217.
- Girish, K., Jagadeesha, D., Rajeev, K., Kemparaju, K., 2002. Snake venom hyaluronidase: an evidence for isoforms and extracellular matrix degradation. *Molecular and cellular biochemistry* 240(1-2), 105-110.
- Gomez-Sanchez, C.E., Warden, M., Gomez-Sanchez, M.T., Hou, X., Gomez-Sanchez, E.P., 2011. Diverse immunostaining patterns of mineralocorticoid receptor monoclonal antibodies. *Steroids* 76(14), 1541-1545.
- Gomez-Sanchez, E.P., 2004. Brain mineralocorticoid receptors: orchestrators of hypertension and end-organ disease. *Current opinion in nephrology and hypertension* 13(2), 191-196.
- Gomez-Sanchez, E.P., Gomez-Sanchez, M.T., de Rodriguez, A.F., Romero, D.G., Warden, M.P., Plonczynski, M.W., Gomez-Sanchez, C.E., 2009. Immunohistochemical Demonstration of the Mineralocorticoid Receptor, 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-1 and- 2, and Hexose-6-phosphate Dehydrogenase in Rat Ovary. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 57(7), 633-641.
- Gutiérrez, J., Lomonte, B., 1995. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. *Toxicon* 33(11), 1405-1424.

- Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Habib, A.G., Harrison, R.A., Williams, D.J., Warrell, D.A., 2017. Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers* 3, 17063.
- Gutiérrez, J.M., Escalante, T., Rucavado, A., 2009a. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 54(7), 976-987.
- Gutiérrez, J.M., Escalante, T., Rucavado, A., Herrera, C., Fox, J.W., 2016. A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. *Toxins* 8(10), 304.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., 2000. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82(9), 841-850.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Chaves, F., Díaz, C., Escalante, T., 2009b. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 54(7), 958-975.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Charlier, C., Chapelle, J.-P., 2007. Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège* 62(10), 628-638.
- Hare, J.M., 2004. Nitroso–redox balance in the cardiovascular system. *Mass Medical Soc.*
- Harris, J.B., 1997. 17 Toxic phospholipases in snake venom: An introductory review, *Symposia of the Zoological Society of London*. London: The Society, 1960-1999., pp. 235-250.
- Harvey, A.L., 2001. Twenty years of dendrotoxins. *Toxicon* 39(1), 15-26.
- Hawkins, U.A., Gomez-Sanchez, E.P., Gomez-Sanchez, C.M., Gomez-Sanchez, C.E., 2012. The ubiquitous mineralocorticoid receptor: clinical implications. *Current hypertension reports* 14(6), 573-580.
- Hayashi, M.A., Camargo, A.C., 2005. The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicon* 45(8), 1163-1170.

- Heymes, C., Vanderheyden, M., Bronzwaer, J.G., Shah, A.M., Paulus, W.J., 1999. Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 99(23), 3009-3016.
- Huang, T.-F., 1998. What have snakes taught us about integrins? *Cellular and Molecular Life Sciences* 54(6), 527-540.
- Imai, K., Aimoto, T., Shima, T., NAKASHIMA, T., SATO, M., KIMURA, R., 2000. Alteration in membrane fluidity of rat liver microsomes and of liposomes by protoporphyrin and its anti-lipidperoxidative effect. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 23(4), 415-419.
- Itoh, N., Tanaka, N., Mihashi, S., Yamashina, I., 1987. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 262(7), 3132-3135.
- Jaisser, F., Farman, N., 2016. Emerging roles of the mineralocorticoid receptor in pathology: toward new paradigms in clinical pharmacology. *Pharmacological reviews* 68(1), 49-75.
- Jameel, N.M., Frey, B.M., Frey, F.J., Gowda, T.V., Vishwanath, B.S., 2005. Inhibition of secretory phospholipase A 2 enzyme by bilirubin: a new role as endogenous anti-inflammatory molecule. *Molecular and cellular biochemistry* 276(1), 219-225.
- James, M., Penglis, P., Caughey, G., Demasi, M., Cleland, L., 2001. Eicosanoid production by human monocytes: does COX-2 contribute to a self-limiting inflammatory response? *Inflammation Research* 50(5), 249-253.
- Jia, L.-G., Shimokawa, K.-I., Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1996. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon* 34(11), 1269-1276.
- Jiménez, N., Escalante, T., Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., 2008. Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: acute damage, revascularization, and re-epithelization in a mouse ear model. *Journal of Investigative Dermatology* 128(10), 2421-2428.

- Jo, M., Kim, T.-H., Dai-Wu, S., Esplen, J.E., Dorko, K., Billiar, T.R., Strom, S.C., 2000. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nature medicine* 6(5), 564.
- Kang, T.S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M.T., Sinha, M., Kumar, R.P., Kaur, P., Kumar, S., Dey, S., Sharma, S., 2011. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *The FEBS journal* 278(23), 4544-4576.
- Karlsson, E., Mbugua, P., Rodriguez-Ithurralde, D., 1984. Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps*. *Journal de physiologie* 79(4), 232-240.
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., de Silva, N., Gunawardena, N.K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D.G., de Silva, H.J., 2008. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS medicine* 5(11), e218.
- Keller, J.N., Mattson, M.P., 1998. Roles of lipid peroxidation in modulation of cellular signaling pathways, cell dysfunction, and death in the nervous system. *Reviews in the Neurosciences* 9(2), 105-116.
- Kim, C., Kim, J.-Y., Kim, J.-H., 2008. Cytosolic phospholipase A (2), lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species. *BMB Rep* 41(8), 555-559.
- Kim, H., Bae, S., Yu, Y., Kim, Y., Kim, H.-R., Hwang, Y.-i., Kang, J.S., Lee, W.J., 2012. The analysis of vitamin C concentration in organs of *gulo*-/-mice upon vitamin C withdrawal. *Immune network* 12(1), 18-26.
- Kini, R.M., Doley, R., 2010. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon* 56(6), 855-867.
- Kini, R.M., Iwanaga, S., 1986. Structure-function relationships of phospholipases I: prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon* 24(6), 527-541.
- Koh, D., Armugam, A., Jeyaseelan, K., 2006. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 63(24), 3030-3041.

- Kolkhof, P., Borden, S.A., 2012. Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: prospects for novel therapeutics. *Molecular and cellular endocrinology* 350(2), 310-317.
- Kolkhof, P., Nowack, C., Eitner, F., 2015. Nonsteroidal antagonists of the mineralocorticoid receptor. *Current opinion in nephrology and hypertension* 24(5), 417-424.
- Kopincová, J., Púžserová, A., Bernátová, I., 2012. L-NAME in the cardiovascular system—nitric oxide synthase activator? *Pharmacological Reports* 64(3), 511-520.
- Krawisz, J., Sharon, P., Stenson, W., 1984. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. *Gastroenterology* 87(6), 1344-1350.
- Labib, R.S., Awad, E.R., Farag, N.W., 1981. Proteases of *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) and *Cerastes vipera* (Sahara sand viper) snake venoms. *Toxicon* 19(1), 73-83.
- Labib, R.S., Halim, H.Y., Farag, N.W., 1979. Fractionation of *Cerastes cerastes* and *Cerastes vipera* snake venoms by gel filtration and identification of some enzymatic and biological activities. *Toxicon* 17(4), 337-345.
- Lambeau, G., Ancian, P., Barhanin, J., Lazdunski, M., 1994. Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A2. *Journal of Biological Chemistry* 269(3), 1575-1578.
- Laraba-Djebari, F., Chérifi, F., 2014. Pathophysiological and Pharmacological Effects of Snake Venom Components: Molecular Targets. *J Clin Toxicol* 4(190), 2161-0495.2190.
- 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., Martin-Eauclaire, M.F., Mauco, G., Marchot, P., 1995. Afaâcytin, an $\alpha\beta$ -fibrinogenase from *Cerastes cerastes* (Horned Viper) Venom, Activates Purified Factor X and Induces Serotonin Release from Human Blood Platelets. *The FEBS journal* 233(3), 756-765.

- Larréché, S., Mion, G., Clapson, P., Debien, B., Wybrecht, D., Goyffon, M., 2008a. Neurotoxines ophidiennes, *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*. Elsevier, pp. 310-316.
- Larréché, S., Mion, G., Goyffon, M., 2008b. Troubles de l'hémostase induits par les venins de serpents, *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation*. Elsevier, pp. 302-309.
- Lee, K.W., Lee, H.J., 2006. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors* 26(2), 105-121.
- Lévesque, H., 2002. *Immunologie*, 4e édition, coordonnée par Noëlle Genetet. Éditions Médicales Internationales 2002. Elsevier Masson.
- Lykkesfeldt, J., Svendsen, O., 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal* 173(3), 502-511.
- Macheroux, P., Seth, O., Bollschweiler, C., Schwarz, M., Kurfürst, M., Au, L.C., Ghisla, S., 2001. L-Amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. *The FEBS journal* 268(6), 1679-1686.
- Maeda, N., Hagihara, H., Nakata, Y., Hiller, S., Wilder, J., Reddick, R., 2000. Aortic wall damage in mice unable to synthesize ascorbic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(2), 841-846.
- Malany, S., Osaka, H., Sine, S.M., Taylor, P., 2000. Orientation of α -neurotoxin at the subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 39(50), 15388-15398.
- Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424(1), 83-95.
- Marrakchi, N., Barbouche, R., Bon, C., El Ayeb, M., 1997a. Cerastatin, a new potent inhibitor of platelet aggregation from the venom of the Tunisian viper, *Cerastes cerastes*. *Toxicon* 35(1), 125-135.
- Marrakchi, N., Barbouche, R., Guermazi, S., Bon, C., El Ayeb, M., 1997b. Procoagulant and platelet-aggregating properties of cerastocytin from *Cerastes cerastes* venom. *Toxicon* 35(2), 261-272.

- Marrakchi, N., Barbouche, R., Guermazi, S., Karoui, H., Bon, C., El Ayeb, M., 1997c. Cerastotin, a Serine Protease from Cerastes Cerastes Venom, with Platelet-Aggregating and Agglutinating Properties. *The FEBS journal* 247(1), 121-128.
- Massey, V., Curti, B., 1967. On the reaction mechanism of *Crotalus adamanteus* L-amino acid oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 242(6), 1259-1264.
- Mathisen, G.H., Thorkildsen, I.H., Paulsen, R.E., 2007. Secretory PLA 2-IIA and ROS generation in peripheral mitochondria are critical for neuronal death. *Brain research* 1153, 43-51.
- Matsumoto, H., Naraba, H., Murakami, M., Kudo, I., Yamaki, K., Ueno, A., Oh-ishi, S., 1997. Concordant induction of prostaglandin E 2 synthase with cyclooxygenase-2 leads to preferred production of prostaglandin E 2 over thromboxane and prostaglandin D 2 in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* 230(1), 110-114.
- McCleary, R.J., Kini, R.M., 2013. Non-enzymatic proteins from snake venoms: a gold mine of pharmacological tools and drug leads. *Toxicon* 62, 56-74.
- Ménard, J., 2004. The 45-year story of the development of an anti-aldosterone more specific than spironolactone. *Molecular and cellular endocrinology* 217(1-2), 45-52.
- Menez, A., 1993. Les structures des toxines des animaux venimeux. *Pour la science* 190, 34-40.
- Ménez, A., 1995. Les venins et toxines de serpents. *La Fonction Venimeuse* 200.
- Messaoudi, S., Azibani, F., Delcayre, C., Jaisser, F., 2012. Aldosterone, mineralocorticoid receptor, and heart failure. *Molecular and cellular endocrinology* 350(2), 266-272.
- Migdal, C., Serres, M., 2011. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences* 27(4), 405-412.
- Miguel, F., Augusto, A.C., Gurgueira, S.A., 2009. Effect of acute vs chronic H₂O₂-induced oxidative stress on antioxidant enzyme activities. *Free radical research* 43(4), 340-347.

- Miyoshi, S.-i., Tu, A.T., 1999. Muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) inhibitor from snake venom: interaction with subtypes of human mAChR. *Archives of biochemistry and biophysics* 369(1), 114-118.
- Mohamed, R., Dharmappa, K., Tarannum, S., Jameel, N., Kannum, S., Ashrafulla, H., Rai, L., JMD'Souza, C., Shekhar, M., Vishwanath, B.S., 2010. Chemical modification of ascorbic acid and evaluation of its lipophilic derivatives as inhibitors of secretory phospholipase A2 with anti-inflammatory activity. *Molecular and cellular biochemistry* 345(1-2), 69-76.
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A., 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochemical pharmacology* 38(11), 1709-1715.
- Moneim, A.E.A., Ortiz, F., Leonardo-Mendonca, R.C., Vergano-Villodres, R., Guerrero-Martínez, J.A., López, L.C., Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., 2015. Protective effects of melatonin against oxidative damage induced by Egyptian cobra (*Naja haje*) crude venom in rats. *Acta tropica* 143, 58-65.
- Montecucco, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(18), 2897-2912.
- Moreira, V., Dos-Santos, M.C., Nascimento, N.G., da Silva, H.B., Fernandes, C.M., Lima, M.R.D.I., Teixeira, C., 2012. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. *Toxicon* 60(1), 12-20.
- Moreira, V., Gutiérrez, J.M., Amaral, R.B., Zamunér, S.R., Teixeira, C.d.F.P., 2009a. Effects of *Bothrops asper* snake venom on the expression of cyclooxygenases and production of prostaglandins by peritoneal leukocytes in vivo, and by isolated neutrophils and macrophages in vitro. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 80(2), 107-114.
- Moreira, V., Gutiérrez, J.M., Amaral, R.B., Zamunér, S.R., Teixeira, C.d.F.P., 2009b. Effects of *Bothrops asper* snake venom on the expression of cyclooxygenases and production of prostaglandins by peritoneal leukocytes in vivo, and by isolated neutrophils and

- macrophages in vitro. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 80(2-3), 107-114.
- Moreira, V., Zamuner, S.R., Wallace, J.L., Teixeira, C.d.F.P., 2007. Bothrops jararaca and Crotalus durissus terrificus venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E₂ and D₂, and expression of cyclooxygenases. *Toxicon* 49(5), 615-624.
- Mukherjee, A., Maity, C., 1997. Effect of dietary supplementation of vitamin E in partial inhibition of Russell's viper venom phospholipase A₂ induced hepatocellular and microsomal membrane damage in rats. *Acta Physiologica Hungarica* 85(4), 367-374.
- Mukherjee, A., Maity, C., 1998. The composition of Naja naja venom samples from three districts of West Bengal, India. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 119(2), 621-627.
- Mukherjee, D., Nissen, S.E., Topol, E.J., 2001. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *Jama* 286(8), 954-959.
- Murphy, R.C., 1996. Free radical-induced oxidation of glycerophosphocholine lipids and formation of biologically active products, Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators 2. Springer, pp. 51-58.
- Nadeem, A., Siddiqui, N., Alharbi, N.O., Alharbi, M., Imam, F., 2014a. Acute glutathione depletion leads to enhancement of airway reactivity and inflammation via p38MAPK-iNOS pathway in allergic mice. *International immunopharmacology* 22(1), 222-229.
- Nadeem, A., Siddiqui, N., Alharbi, N.O., Alharbi, M.M., 2014b. Airway and systemic oxidant-antioxidant dysregulation in asthma: a possible scenario of oxidants spill over from lung into blood. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 29(1), 31-40.
- Nadeem, A., Siddiqui, N., Alharbi, N.O., Alharbi, M.M., Imam, F., Sayed-Ahmed, M.M., 2014. Glutathione modulation during sensitization as well as challenge phase regulates airway reactivity and inflammation in mouse model of allergic asthma. *Biochimie* 103, 61-70.

- Nanda, B., Nataraju, A., Rajesh, R., Rangappa, K., Shekar, M., Vishwanath, B., 2007. PLA2 mediated arachidonate free radicals: PLA2 inhibition and neutralization of free radicals by anti-oxidants-a new role as anti-inflammatory molecule. *Current topics in medicinal chemistry* 7(8), 765-777.
- Naraba, H., Murakami, M., Matsumoto, H., Shimbara, S., Ueno, A., Kudo, I., Oh-ishi, S., 1998. Segregated coupling of phospholipases A2, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. *The Journal of Immunology* 160(6), 2974-2982.
- Nicotera, P., Leist, M., Ferrando-May, E., 1998. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicology letters* 102, 139-142.
- Nishi, I., Kawano, S., Misaki, M., Hoshi, T., Masumi, T., Iida, K., Watanabe, S., Yamaguchi, I., 2006. Addition of spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor decreases lung congestion and edema in Dahl hypertensive rats. *Heart and vessels* 21(4), 251-255.
- Nishida, S., Terashima, M., Shimazu, T., Takasaki, C., Tamiya, N., 1985. Isolation and properties of two phospholipases A2 from the venom of an Australian elapid snake (*Pseudechis australis*). *Toxicon* 23(1), 73-85.
- Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., Yagi, K., 1994. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *Journal of Biological Chemistry* 269(18), 13685-13688.
- Nishikimi, M., Kawai, T., Yagi, K., 1992. Guinea pigs possess a highly mutated gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the key enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in this species. *Journal of Biological Chemistry* 267(30), 21967-21972.
- Nunes, D.C., Rodrigues, R.S., Lucena, M.N., Cologna, C.T., Oliveira, A.C.S., Hamaguchi, A., Homsí-Brandeburgo, M.I., Arantes, E.C., Teixeira, D.N., Ueira-Vieira, C., 2011. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A2 from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 154(3), 226-233.

- O'Mahony, D.J., Kinsella, B.T., Fitzgerald, G.A., 1997. Cellular responses to eicosanoids: molecular biology of eicosanoid receptors. *Principles of medical biology* 8, 385-405.
- Odermatt, A., Kratschmar, D.V., 2012. Tissue-specific modulation of mineralocorticoid receptor function by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: an overview. *Molecular and cellular endocrinology* 350(2), 168-186.
- Ogawa, S., Takeuchi, K., Mori, T., Nako, K., Ito, S., 2006. Spironolactone further reduces urinary albumin excretion and plasma b-type natriuretic peptide levels in hypertensive type ii diabetes treated with angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 33(5-6), 477-479.
- Oliveira, C.H.d.M., Assaid Simão, A., Marcussi, S., 2016. Inhibitory effects of ascorbic acid, vitamin E, and vitamin B-complex on the biological activities induced by Bothrops venom. *Pharmaceutical biology* 54(5), 845-852.
- Olivo, R.d.A., Teixeira, C.F., Wallace, J.L., Gutierrez, J.M., Zamuner, S.R., 2007. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. *Toxicon* 49(5), 670-677.
- Oussedik-Oumehdi, H., 2007. Effet de l'irradiation Gamma sur les propriétés biochimiques et immunologiques du venin de *Cerastes cerastes* : Apport dans l'immunothérapie ophodienne. USTHB, ALGER, ALGERIE, p. 129.
- Ouyang, C., Teng, C.-M., Huang, T.-F., 1992. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon* 30(9), 945-966.
- Ownby, C.L., Colberg, T.R., 1988. Classification of myonecrosis induced by snake venoms: venoms from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*), western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the Indian cobra (*Naja naja naja*). *Toxicon* 26(5), 459-474.
- Ownby, C.L., de Araujo, H.S.S., White, S.P., Fletcher, J.E., 1999. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. *Toxicon* 37(3), 411-445.
- Ozkanlar, S., Akcay, F., 2012. Antioxidant vitamins in atherosclerosis—animal experiments and clinical studies. *Adv Clin Exp Med* 21(1), 115-123.

- Pacher, P., Schulz, R., Liaudet, L., Szabó, C., 2005. Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends in Pharmacological Sciences* 26(6), 302-310.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American college of Nutrition* 22(1), 18-35.
- Parry, M.A., Jacob, U., Huber, R., Wisner, A., Bon, C., Bode, W., 1998. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure* 6(9), 1195-1206.
- Pasquier, C., 1995. Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires* 1995(276), 87-92.
- Patiño, A.C., Benjumea, D.M., Pereañez, J.A., 2013. Inhibition of venom serine proteinase and metalloproteinase activities by *Renalmia alpinia* (Zingiberaceae) extracts: Comparison of wild and in vitro propagated plants. *Journal of ethnopharmacology* 149(2), 590-596.
- Paulus, W.J., 1994. Endothelial control of vascular and myocardial function in heart failure. *Cardiovascular drugs and therapy* 8(3), 437-446.
- Pereañez, J.A., Patiño, A.C., Rey-Suarez, P., Núñez, V., Castañeda, I.C.H., Rucavado, A., 2013. Glycolic acid inhibits enzymatic, hemorrhagic and edema-inducing activities of BaP1, a P-I metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom: insights from docking and molecular modeling. *Toxicon* 71, 41-48.
- Petricevich, V.L., 2010. Scorpion venom and the inflammatory response. *Mediators Inflamm* 2010.
- Pinho, F.M., Zanetta, D.M., Burdmann, E.A., 2005. Acute renal failure after *Crotalus durissus* snakebite: a prospective survey on 100 patients. *Kidney international* 67(2), 659-667.
- Pontes, A.S., Setúbal, S.d.S., Xavier, C.V., Lacouth-Silva, F., Kayano, A.M., Pires, W.L., Nery, N.M., de Castro, O.B., da Silva, S.D., Calderon, L.A., 2014. Effect of L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* snake venom on human neutrophils. *Toxicon* 80, 27-37.

- Reid, A. H., Theakston, R. D. G., 1984. Les morsures de serpents. Bull. WHO, 62, 27-38.
- Riener, C.K., Kada, G., Gruber, H.J., 2002. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4, 4'-dithiodipyridine. Analytical and bioanalytical chemistry 373(4-5), 266-276.
- Rivière, G., Bon, C., 1999. Immunothérapie antivenimeuse des envenimations ophidiennes: vers une approche rationnelle d'un traitement empirique, Annales de l'Institut Pasteur/Actualites. Elsevier, pp. 173-182.
- Robbins, R.A., Grisham, M.B., 1997. Nitric oxide. The international journal of biochemistry & cell biology 29(6), 857-860.
- Rodrigues, R.S., Izidoro, L.F.M., De Oliveira, J., Robson, J., Sampaio, S.V., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., 2009. Snake venom phospholipases A2: a new class of antitumor agents. Protein and peptide letters 16(8), 894-898.
- Rossier, B.C., Baker, M.E., Studer, R.A., 2015. Epithelial sodium transport and its control by aldosterone: the story of our internal environment revisited. Physiological reviews 95(1), 297-340.
- Rucavado, A., Escalante, T., Franceschi, A., Chaves, F., León, G., Cury, Y., Ovadia, M., Gutiérrez, J.M., 2000. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by Bothrops asper snake venom: effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa₂EDTA. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 63, 313-319.
- Salama, W.H., Abdel-Aty, A.M., Fahmy, A.S., 2018. Rosemary leaves extract: Anti-snake action against Egyptian Cerastes cerastes venom. Journal of Traditional and Complementary Medicine.
- Samel, M., Subbi, J., Siigur, J., Siigur, E., 2002. Biochemical characterization of fibrinolytic serine proteinases from Vipera lebetina snake venom. Toxicon 40(1), 51-54.
- Samel, M., Vija, H., Rönholm, G., Siigur, J., Kalkkinen, N., Siigur, E., 2006. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid

- oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1764(4), 707-714.
- Santhosh, M.S., Sundaram, M.S., Sunitha, K., Kemparaju, K., Girish, K., 2013. Viper venom-induced oxidative stress and activation of inflammatory cytokines: a therapeutic approach for overlooked issues of snakebite management. *Inflammation Research* 62(7), 721-731.
- Saoud, S., 2017. Etude du mécanisme d'action de deux biomolécules bioactives impliquées dans l'agrégation plaquettaire purifiées à partir du venin de *Cerastes cerastes*.
- Saoud, S., Chérifi, F., Benhassine, T., Laraba-Djebari, F., 2017. Purification and characterization of a platelet aggregation inhibitor and anticoagulant Cc 5_{NTase}, CD 73-like, from *Cerastes cerastes* venom. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 31(5).
- Sarray, S., Luis, J., El Ayeb, M., Marrakchi, N., 2007. Snake venoms C-type lectins and their receptors on platelets and cancerous cells. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis* 85(1-4), 69-80.
- Schwenk, M.H., Hirsch, J.S., Bomback, A.S., 2015. Aldosterone blockade in CKD: emphasis on pharmacology. *Advances in chronic kidney disease* 22(2), 123-132.
- Sellak, H., Franzini, E., Hakim, J., Pasquier, C., 1994. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood* 83(9), 2669-2677.
- Seo, T., Sakon, T., Nakazawa, S., Nishioka, A., Watanabe, K., Matsumoto, K., Akasaka, M., Shioi, N., Sawada, H., Araki, S., 2017. Haemorrhagic snake venom metalloproteases and human ADAMs cleave LRP5/6, which disrupts cell-cell adhesions in vitro and induces haemorrhage in vivo. *The FEBS journal* 284(11), 1657-1671.
- Serrano, S.M., 2013. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon* 62, 19-26.

- Sertejn, D., Grulke, S., Franck, T., Mouithys-Mickalad, A., Deby-Dupont, G., 2003. La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann. Méd. Vét* 147, 79-93.
- Sevanian, A., Wratten, M.L., McLeod, L.L., Kim, E., 1988. Lipid peroxidation and phospholipase A2 activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: a structural basis for enzyme activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 961(3), 316-327.
- Silva, J.G.d., Soley, B.d.S., Gris, V., Pires, A.d.R.A., Caderia, S.M.S.C., Eler, G.J., Hermoso, A.P.M., Bracht, A., Dalsenter, P.R., Acco, A., 2011. Effects of the *Crotalus durissus terrificus* snake venom on hepatic metabolism and oxidative stress. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 25(3), 195-203.
- Simon, L.S., 1996. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and their effects. *Journal of clinical rheumatology: practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases* 2(3), 135-140.
- Sitprija, V., Sitprija, S., 2012. Renal effects and injury induced by animal toxins. *Toxicon* 60(5), 943-953.
- Smith, W., 1989. Eicosanoid nomenclature. *Prostaglandins* 38(1), 125-133.
- Soares, A.F., 2005. Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes: adiponectine et prostaglandines. Villeurbanne, INSA.
- Song, Q.-X., Wei, D.-Z., Zhou, W.-Y., Xu, W.-Q., Yang, S.-L., 2004. Enzymatic synthesis and antioxidant properties of L-ascorbyl oleate and L-ascorbyl linoleate. *Biotechnology letters* 26(23), 1777-1780.
- Souza, D.H., Eugenio, L.M., Fletcher, J.E., Jiang, M.-S., Garratt, R.C., Oliva, G., Selistre-de-Araujo, H.S., 1999. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. *Archives of biochemistry and biophysics* 368(2), 285-290.
- Struthers, A.D., Unger, T., 2011. Physiology of aldosterone and pharmacology of aldosterone blockers. *European Heart Journal Supplements* 13(suppl_B), B27-B30.

- Sun, J., Zhang, X., Broderick, M., Fein, H., 2003. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors* 3(8), 276-284.
- Suzuki, K., Nakamura, M., Hatanaka, Y., Kayanoki, Y., Tatsumi, H., Taniguchi, N., 1997. Induction of apoptotic cell death in human endothelial cells treated with snake venom: implication of intracellular reactive oxygen species and protective effects of glutathione and superoxide dismutases. *J Biochem* 122(6), 1260-1264.
- Tachoua, W., 2017. Purification et caractérisation d'une métalloprotéinase hémorragique isolée à partir du venin de *Cerastes cerastes* : Etude de son mécanisme d'actions. USTHB, ALGER, ALGERIE, p. 126.
- Tachoua, W., Boukhalfa-Abib, H., Laraba-Djebari, F., 2017. Hemorrhagic metalloproteinase, Cc HSM-III, isolated from *Cerastes cerastes* venom: Purification and biochemical characterization. *Journal of biochemical and molecular toxicology*.
- Takimoto, E., Kass, D.A., 2007. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension* 49(2), 241-248.
- Tamargo, J., Solini, A., Ruilope, L.M., 2014. Comparison of agents that affect aldosterone action, *Seminars in nephrology*. Elsevier, pp. 285-306.
- Tanabe, N., Takami, T., Fujisawa, K., Matsumoto, T., Yamamoto, N., Sakaida, I., 2017. Effectiveness of tolvaptan monotherapy and low-dose furosemide/tolvaptan combination therapy for hepatoprotection and diuresis in a rat cirrhotic model. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 16-122.
- Tanjoni, I., Weinlich, R., Della-Casa, M., Clissa, P., Saldanha-Gama, R., De Freitas, M., Barja-Fidalgo, C., Amarante-Mendes, G., Moura-da-Silva, A., 2005. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. *Apoptosis* 10(4), 851-861.
- Taves, M.D., Gomez-Sanchez, C.E., Soma, K.K., 2011. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 301(1), E11-E24.

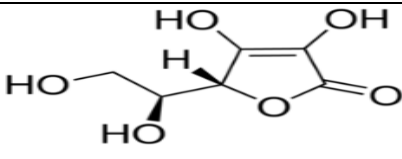
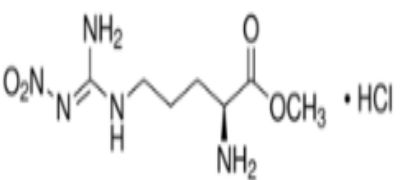
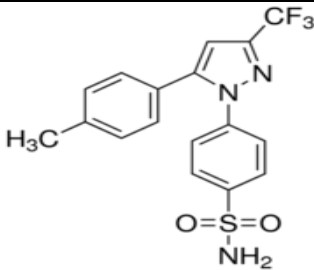
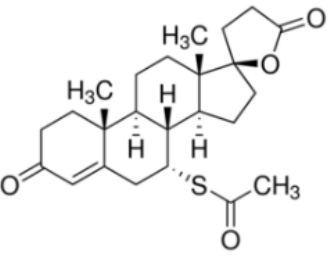
- Teixeira, C., Cury, Y., Moreira, V., Picolo, G., Chaves, F., 2009. Inflammation induced by Bothrops asper venom. *Toxicon* 54(7), 988-997.
- Teixeira, C., Landucci, E., Antunes, E., Chacur, M., Cury, Y., 2003. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A 2. *Toxicon* 42(8), 947-962.
- Tempone, A., Andrade, H., Spencer, P., Lourenço, C., Rogero, J., Nascimento, N., 2001. Bothrops moojeni venom kills Leishmania spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochemical and biophysical research communications* 280(3), 620-624.
- Thivierge, M., Rola-Pleszczynski, M., 1995. Up-regulation of inducible cyclooxygenase gene expression by platelet-activating factor in activated rat alveolar macrophages. *The Journal of Immunology* 154(12), 6593-6599.
- Tordiman, C., Coge, F., Andre, N., Rique, H., Spedding, M., Bonnet, J., 1995. Characterisation of cyclooxygenase 1 and 2 expression in mouse resident peritoneal macrophages in vitro; interactions of non steroidal anti-inflammatory drugs with COX2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1256(2), 249-256.
- Touchard, A., 2015. Biodiversité, biochimie et pharmacologie des peptides de venins de fourmis. Antilles-Guyane.
- Toyama, M.H., Toyama, D.d.O., Passero, L.F., Laurenti, M.D., Corbett, C.E., Tomokane, T.Y., Fonseca, F.V., Antunes, E., Joazeiro, P.P., Beriam, L.O., 2006. Isolation of a new L-amino acid oxidase from Crotalus durissus cascavella venom. *Toxicon* 47(1), 47-57.
- Traber, M.G., Stevens, J.F., 2011. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine* 51(5), 1000-1013.
- Uchida, K., Shiraishi, M., Naito, Y., Torii, Y., Nakamura, Y., Osawa, T., 1999. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *Journal of Biological Chemistry* 274(4), 2234-2242.

- Uchiyama, M., Mihara, M., 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry* 86(1), 271-278.
- Umar, S., van der Valk, E., Schalijs, M., van der Wall, E., Atsma, D., van der Laarse, A., 2009. Integrin stimulation-induced hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes is NO-dependent. *Molecular and cellular biochemistry* 320(1-2), 75-84.
- Van Oosterhout, A., Van Ark, I., Hofman, G., Van Der Linde, H., Fattah, D., Nijkamp, F., 1996. Role of interleukin-5 and substance P in development of airway hyperreactivity to histamine in guinea-pigs. *European Respiratory Journal* 9(3), 493-499.
- Voronov, E., Apte, R., Sofer, S., 1999. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *Journal of Venomous Animals and Toxins* 5(1), 5-33.
- Wahby, A., Mahdy, E.-S.M., EL-mezayen, H.A., Salama, W.H., Abdel-Aty, A.M., Fahmy, A.S., 2012. Egyptian horned viper *Cerastes cerastes* venom hyaluronidase: Purification, partial characterization and evidence for its action as a spreading factor. *Toxicon* 60(8), 1380-1389.
- Wang, W.-J., Huang, T.-F., 2002. Purification and characterization of a novel metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Thrombosis and haemostasis* 87(4), 641-650.
- Wang, Y., Lin, L., Chen, Z., Xue, E., Lin, X., Yu, L., Lin, Z., 2009. Effects of intratumoral injection of microspheres containing cobra venom cytotoxin on transplanted human hepatoma in nude mice. *Zhong xi yi jie he xue bao= Journal of Chinese integrative medicine* 7(9), 836-841.
- Warner, T.D., Mitchell, J.A., 2004. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *The FASEB Journal* 18(7), 790-804.
- Warrell, D.A., 2010. Snake bite. *The Lancet* 375(9708), 77-88.
- Willoughby, D.A., Moore, A.R., Colville-Nash, P.R., 2000. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *The Lancet* 355(9204), 646-648.

- Wintergerst, E.S., Maggini, S., Hornig, D.H., 2006. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *Annals of Nutrition and Metabolism* 50(2), 85-94.
- Wisner, A., Braud, S., Bon, C., 2001. Snake venom proteinases as tools in hemostasis studies: structure-function relationship of a plasminogen activator purified from *Trimeresurus stejnegeri* venom. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 31(3-6), 133-140.
- Yalçinkaya, E., Çakıroğlu, Y., Doğer, E., Budak, Ö., Çekmen, M., Çalışkan, E., 2013. Effect of follicular fluid NO, MDA and GSH levels on in vitro fertilization outcomes. *Journal of the Turkish German Gynecological Association* 14(3), 136.
- Yang, J., Young, M.J., 2009. The mineralocorticoid receptor and its coregulators. *Journal of molecular endocrinology* 43(2), 53-64.
- You, Q., Yu, H., Wu, D., Zhang, Y., Zheng, J., Peng, C., 2009. Vitamin B6 points PC6 injection during acupuncture can relieve nausea and vomiting in patients with ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer* 19(4), 567-571.
- Young, M.J., Rickard, A.J., 2012. Mechanisms of mineralocorticoid salt-induced hypertension and cardiac fibrosis. *Molecular and cellular endocrinology* 350(2), 248-255.
- Zamuner, S.R., Teixeira, C.F., 2002. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. *Mediators of inflammation* 11(6), 351-357.
- Zengin, S., Al, B., Yarbil, P., Taysi, S., Bilinc, H., Yildirim, C., Aksoy, N., 2013. Oxidant/Antioxidant Status in Cases of Snake Bite. *The Journal of emergency medicine* 45(1), 39-45.
- Zhang, L., Wei, L.-J., 2007. ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells. *Life sciences* 80(13), 1189-1197.

- Zhang, L., Wu, W., 2008. Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon acutus* snake venom. *Natural Product Research* 22(6), 554-563.
- Zhang, Y.-J., Wang, J.-H., Lee, W.-H., Wang, Q., Liu, H., Zheng, Y.-T., Zhang, Y., 2003. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochemical and biophysical research communications* 309(3), 598-604.
- Ziad-Meziane, H.F., Laraba-Djebari, F., 2014. Purification, Characterization and Antibacterial Activity of l-amino Acid Oxidase from *Cerastes cerastes*. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 28(8), 347-354.
- Zouari-Kessentini, R., Luis, J., Karray, A., Kallech-Ziri, O., Srairi-Abid, N., Bazaa, A., Loret, E., Bezzine, S., El Ayeb, M., Marrakchi, N., 2009. Two purified and characterized phospholipases A2 from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration. *Toxicon* 53(4), 444-453.

Annexe : Tableau qui résume les structures des inhibiteurs (<https://www.sigmaaldrich.com>)

Nom de l'inhibiteur	Formule chimique	Formule développée	Masse moléculaire
Vitamine C (acide ascorbique)	$C_6H_8O_6$		176,12
<i>L</i> -NAME = <i>N</i> _ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride	$C_7H_{15}N_5O_4 \cdot HCl$		269.69
Celecoxib	$C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$		381.37
Spirolactone	$C_{24}H_{32}O_4 S$		416,57