

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie « Houari Boumediene »

Faculté des Sciences Biologiques



THESE

Présentée pour l'obtention du grade de DOCTORAT
En Sciences de la Nature

Spécialité : Biochimie-Immunologie

Par

Hinda BOUKHALFA née ABIB

Thème

Caractérisation biochimique des activités hémorragique et myotoxique du venin de *Cerastes cerastes* : Apport de l'irradiation gamma dans la préparation d'immun-sérums

Soutenue publiquement le 14 / 10 /2010, devant le jury composé de :

M^r R. BAKOUR , Prof, à l'USTHB	Président
M^{me} F. LARABA-DJEBARI , Prof, à l'USTHB	Directeur de thèse
M^{me} C. TOUIL-BOUKOFFA , Prof, à l'USTHB	Examineur
M^{me} D. SATTA , Prof, à l'Université Mentouri, Constantine	Examineur
M^r J.P. CHIPPAUX , Prof, à la Fac. des Sc. Pharmaceutiques, Paris	Examineur
M^{me} H. OUSSEDIK-OUMEHDI , M.C./A, à l'USTHB	Examineur

-Publications Internationales-

- **Abib Hinda** and Laraba-Djebari Fatima (2003) "Effects of ^{60}Co gamma radiation on toxicity and hemorrhagic, myonecrotic, and edema-forming activities of *Cerastes cerastes* venom" dans la revue "Canadian Journal of Physiology and Pharmacology **81**: 1125-1130".
- Hamza Loubna., **Abib Hinda** et Laraba-Djebari Fatima (2005) "Purification et caractérisation des molécules hémorragiques du venin de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina*" dans la revue "Journal de l'Association Algérienne de Chimie" (J. Soc. Alger. Chim : Vol **15** N°2) : 215-224.
- **Boukhalfa-Abib Hinda.**, Bennacef-Heffar Nouara et Laraba-Djebari Fatima (2006). "Hémorragie et immunogénicité des venins de *Viperidae* traités par irradiation gamma". Toxines et Cancer. Rencontres en toxicologie. Lavoisier 2006.
- H. Chelghoum, F. Chérifi, F. Sebia-Amrane, **H. Boukhalfa-Abib**, A. Saci, H. Oussedik-Oumehdi et F. Laraba-Djebari (2009) "Action des anti-inflammatoires sur les activités dermonécrotique et oedématisante induites lors d'envenimation vipérine". Proceeding Book. Third SMBBM International Congress of Biochemistry : 370-373.
- **Hinda Boukhalfa-Abib**, Ahmed Meksem and Fatima Laraba-Djebari (2009) "Purification and biochemical characterization of a novel hemorrhagic metalloproteinase from horned viper (*Cerastes cerastes*) venom dans la revue "Comparative Biochemistry and Physiology, Part C **150**: 285-290".

-Publications Nationales-

- L. Hamza., **H. Abib.**, N. Heffar., F. Amrane et F. Laraba-Djebari (2004) "Effets hémorragique et myonécrotique des venins de *Vipera lebetina* et de *Cerastes cerastes*" dans la revue "Journal Algérien de Médecine" Jam. **XIII** (2) : 56-60.
- **Abib Hinda** et Laraba-Djebari Fatima (2005) "Caractérisation biochimique du venin de *Cerastes cerastes* modifié par les rayonnements ionisants gamma" dans la revue "Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie" (T.65-2004/2005) : 123-142.
- Oussedik-Oumehdi Habiba., **Boukhalfa-Abib Hinda.**, Abib Lila., Bennacef-Heffar Nouara et Laraba-Djebari Fatima (2007) "Détoxification et préservation de l'immunogénicité des venins de scorpion et de serpents après irradiation gamma" soumise à la revue "Journal Algérien de Médecine".
- Abib lila., **Boukhalfa-Abib Hinda.**, Bennacef-Heffar Nouara et Laraba-Djebari Fatima (2008) "Evaluation de la toxicité des venins de *Viperidae* et de *Buthidae* irradiés au ^{60}Co : Approches biochimique et histologique" soumise à la revue "Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie" (T.66-2007/2008) : 7-17.

-Communications Internationales-

- **Abib Hinda** et Laraba-Djebari Fatima (2003) "Etude biochimique et histopathologique des effets oedématisés, hémorragiques et myonécrotiques causés lors d'une envenimation expérimentale avec un venin natif et détoxifié de *Cerastes cerastes* par irradiation gamma", 6^{ème} Colloque International de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée qui s'est déroulé à Batz sur Mer (France) du 30 Juin au 4 Juillet 2003.
- **Abib Hinda** et Laraba-Djebari Fatima (2004) "Caractérisation biochimique des molécules hémorragiques spécifiques au venin de la vipère à cornes *Cerastes cerastes*". 1^{er} Colloque Franco-Algérien sur la chromatographie, qui s'est déroulée du 01 au 03 Décembre 2004, Sidi Fredj, Alger.
- **Abib Hinda** et Laraba-Djebari Fatima (2004) "Effets biologiques du venin de la vipère à cornes *Cerastes cerastes* après modification par irradiation gamma : Approches biochimiques et histologiques", les Journées Biologie et Santé de Casablanca (JBS) qui s'est déroulée au Complexe Culturel Sidi Belyout (Casablanca) du 15 au 16 Décembre 2004.
- Bennacef-Heffar Nouara., **Abib Hinda.**, Abib Lila et Laraba-Djebari Fatima (2005) "Application des rayonnements ionisants gamma au Cobalt-60 sur les propriétés des venins de *Buthidae* et de *Viperidae* : Aspects biochimique et immunologique". 7^{ème} Colloque International de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée (CIRFA VII), qui s'est déroulée du 19 au 23 Septembre 2005, Orford, Québec, Canada.
- **Abib Hinda.**, Hamza Loubna et Laraba-Djebari Fatima (2005) "Hémorragie et myotoxicité des venins de *Viperidae* (*Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina*)". Colloque Scientifique du 36^{ème} Conseil des Directeurs des Instituts Pasteur et Instituts associés, qui s'est déroulée du 16 au 17 Novembre 2005, Alger.
- **Boukhalfa-Abib Hinda.**, Bennacef-Heffar. Nouara et Laraba-Djebari. Fatima (2006) "Effet de l'irradiation gamma sur l'activité hémorragique et l'immunogénicité des venins de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina*". 14^{èmes} Rencontres en Toxinologie sous le thème "Toxines et Cancer", qui s'est déroulée du 30 Novembre au 01 Décembre 2006, Paris.
- Bennacef-Heffar Nouara., Abib Lila., **Boukhalfa-Abib Hinda.**, Oussedik-Oumehdi Habiba et Laraba-Djebari Fatima (2006) "Biochemical and immunological characterization of scorpion and snakes ⁶⁰Co gamma irradiated venoms". 2nd International Conference on Natural Toxins, qui s'est déroulée du 18 au 20 Décembre 2006 à Air Defense House- Nasr City-, Cairo, Egypt.
- A. Mendil, N. Chaou, F. chérifi, A. Saci, L. Abib, N. Bennacef-Heffar, **H. Boukhalfa-Abib**, S. Adi-Bessalem, H. Oussedik-Oumehdi, L. Hamza, S. Sami-Merah, D. Hammoudi-Triki, F. Laraba-Djebari (2007) "Effets des venins et de leurs biomolécules sur les modifications physiopathologiques induites lors d'envenimations expérimentales". Envenimations Scorpioniques et Ophidiennes- 1^{ère} Réunion Maghreb-Iran, qui s'est déroulée du 25 au 26 Janvier 2007 à l'Institut Pasteur du Maroc, Maroc.

- A. Mendil, N. Chaou, F. chérifi, A. Saci, L. Abib, N. Bennacef-Heffar, **H. Boukhalfa-Abib**, S. Adi-Bessalem, H. Oussedik-Oumehdi, L. Hamza, S. Sami-Merah, D. Hammoudi-Triki, F. Laraba-Djebari (2007) "Apport de l'immunothérapie dans le traitement des envenimations expérimentales scorpionique et ophidienne". Envenimations Scorpioniques et Ophidiennes-1^{ère} Réunion Maghreb-Iran, qui s'est déroulée du 25 au 26 Janvier 2007 à l'Institut Pasteur du Maroc, Maroc.
- Chérifi. F, Bennacef-Chaou. N, Sebia-Amrane. F, Hamza. L, **Boukhalfa-Abib. H**, Bennacef-Heffar. N, Oussedik-Oumehdi. H et Laraba-Djebari. F (2008) "Envenimation Ophidienne: Effets pathophysiologiques et immunothérapie". Colloque Scientifique du Réseau International des Instituts Pasteur, qui s'est déroulée du 26 au 27 Juin 2008, France.
- Oussedik-Oumehdi. H., **Boukhalfa-Abib. H.**, Chérifi. F and Laraba-Djebari. F (2008) "Dermonecrosis and inflammatory response induced after *Cerastes cerastes* experimental envenomation". 16th European Section Meeting of the International Society on Toxinology, qui s'est déroulée du 07 au 10 Septembre 2008, Belgique.
- Saci Amel, Hamza Loubna, **Boukhalfa-Abib Hinda**, Chelghoum Hayet, Sebia-Amrane Fatima, Oussedik-Oumehdi Habiba, Chérifi Fatah et Laraba-Djebari Fatima (2009) "Caractérisation des Venins de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina*: Purification de Biomolécules Pharmacologiquement Bioactives". Third SMBBM International Congress of Biochemistry in parallel with the IUBMB Special Meeting on Plant stresses and The Sixth FASBMB Congress, Marrakech (Morocco), qui s'est déroulée du 20 au 25 Avril 2009.
- Chelghoum Hayet, Cherifi Fatah, Sebia-Amrane Fatima, Bennacef-Chaou Nadia, **Boukhalfa-Abib Hinda**, Saci Amel, Oussedik-Oumehdi Habiba, Laraba-Djebari Fatima (2009) "Envenimation vipérine et réponse inflammatoire: Effet de traitements anti-inflammatoires sur l'activité dermonécrotique et oedématisante des venins de *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*". Third SMBBM International Congress of Biochemistry in parallel with the IUBMB Special Meeting on Plant stresses and The Sixth FASBMB Congress, Marrakech (Morocco), qui s'est déroulée du 20 au 25 Avril 2009.
- Oussedik-Oumehdi, H., Bennacef-Heffar, N., **Boukhalfa-Abib, H.** et Laraba-Djebari, F. (2009) "Irradiation gamma au ⁶⁰Co : Apport dans l'immunothérapie antivenimeuse". 8^{èmes} Journées Biotechnologiques de l'Association Tunisienne de Biotechnologie, qui s'est déroulée du 20 au 23 Décembre 2009, Sousse.
- Chelghoum H., Bennacef-Heffar N., **Boukhalfa-Abib H.**, Sebia-Amrane F., Oussedik- Oumehdi H and Laraba-Djebari F. (2010) Differential release of cellular mediators and pathogenesis of inflammation induced after experimental *Viperidae* envenomation. 1^{er} Congrès Maghrébin d'Immunologie - Les 5^{èmes} Journées Nationales d'Immunologie, qui s'est déroulée à Alger (Hôtel Safir, Zéralda), le 05 et 06 Juin 2010.

-Communications Nationales-

- Hamza. L., Belkhodja. R., Oussedik. H., **Abib. H.**, Heffar. N., Amrane. F et Laraba-Djebari. F (2003) "Constituants moléculaires et physiopathologie des venins de *Viperidae*". 2^{èmes} Journées Scientifiques de l'ANDRS, qui s'est déroulée du 17 au 18 Décembre 2003, Oran.
- **Abib Hinda** et Laraba-Djebari Fatima (2004) "Effets des rayonnements ionisants gamma sur la toxicité et l'immunogénéicité du venin de la vipère à cornes *Cerastes cerastes*". La première conférence nationale sur les rayonnements et leurs applications qui s'est déroulée à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (Bab Ezzouar, Alger) du 17 au 19 Mai 2004.
- Bennacef-Heffar Nouara., **Abib Hinda.**, et Laraba-Djebari Fatima (2005) "Envenimation ophidienne et détoxification". 31^{ème} anniversaire de la création de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene sous le thème "Insertion de l'USTHB dans l'économie du savoir et de l'innovation" qui s'est déroulée à la Faculté des Sciences Biologiques du 23 au 28 Avril 2005.
- Oussedik-Oumehdi Habiba., Abib Lila., **Abib Hinda.**, Bennacef-Heffar Nouara et Laraba-Djebari Fatima (2005) "Détoxification et préservation de l'immunogénéicité des venins de scorpion et de serpents après irradiation gamma". IV^{èmes} Journées Scientifiques de l'ANDRS, qui s'est déroulée du 06 au 08 Septembre 2005, Tlemcen.
- Abib Lila., **Boukhalfa-Abib Hinda.**, Adi-Bessalem Sonia., Bennacef-Heffar Nouara et Laraba-Djebari Fatima (2005) "Importance de la détoxification dans les envenimations ophidiennes et scorpioniques". Deuxièmes Journées Nationales de Biologie sur les Biotechnologies et l'Environnement qui s'est déroulée à la Faculté des Sciences. Université M'hamed Bougara du 15 au 16 Novembre 2005.
- Abib Lila., Bennacef-Heffar Nouara., **Boukhalfa-Abib Hinda** et Laraba-Djebari Fatima (2005) "Propriétés immunologiques des venins de serpents et de scorpion détoxifiés par les rayonnements ionisants gamma". Premières Journées Nationales d'Immunologie qui s'est déroulée à Alger (Palais de Culture Moufdi Zakaria) du 26 au 27 Novembre 2005.
- **Boukhalfa-Abib Hinda.**, Bennacef-Heffar Nouara., Abib Lila et Laraba-Djebari Fatima (2006) "Biochimie des venins et irradiation gamma". 32^{ème} anniversaire de la création de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene qui s'est déroulée à la Faculté des Sciences Biologiques du 15 au 27 Avril 2006.
- **Boukhalfa-Abib Hinda.**, Abib Lila., Bennacef-Heffar Nouara et Laraba-Djebari Fatima (2006) "Implications de l'irradiation gamma sur les propriétés biologiques et immunologiques des venins de scorpion et de serpents". 2^{ème} Conférence Nationale sur les Rayonnements et leurs Applications (CNRA2006), qui s'est déroulée du 14 au 16 Novembre 2006, Alger.
- **Boukhalfa-Abib Hinda** et Laraba-Djebari Fatima (2007) "Activités biologiques du venin de *Cerastes cerastes* modifié par irradiation gamma". Journées de

Radiobiologie Appliquée, qui s'est déroulée du 27 au 28 Février 2007, CRNA, Alger.

- **Boukhalfa-Abib Hinda**, Oussedik-Oumehdi Habiba, Bennacef-Heffar Nouara, Abib Lila et Laraba-Djebari Fatima (2007) "Modification de la toxicité et de l'immunogénicité des venins de scorpion et de serpents après traitement par deux doses de rayonnements gamma". Journées de Radiobiologie Appliquée, qui s'est déroulée du 27 au 28 Février 2007, CRNA, Alger.
- Oussedik-Oumehdi Habiba, **Boukhalfa-Abib Hinda** et Laraba-Djebari Fatima (2007) "Irradiation gamma au $^{60}\text{Cobalt}$ du venin de *Cerastes cerastes* : Implications sur les effets physiopathologiques et immunologiques". Journées de Radiobiologie Appliquée, qui s'est déroulée du 27 au 28 Février 2007, CRNA, Alger.
- A. Mendil, N. Chaou, F. chérifi, A. Saci, L. Abib, N. Bennacef-Heffar, **H. Boukhalfa-Abib**, S. Adi-Bessalem, H. Oussedik-Oumehdi, L. Hamza, S. Sami-Merah, D. Hammoudi-Triki, F. Laraba-Djebari (2007) "Envenimation scorpionique et ophidienne : Irradiation gamma autre approche d'optimisation de l'immunothérapie". Journées de Radiobiologie Appliquée, qui s'est déroulée du 27 au 28 Février 2007, CRNA, Alger.
- Abib lila., **Boukhalfa-Abib Hinda.**, Oussedik-Oumehdi Habiba Bennacef-Heffar Nouara et Laraba-Djebari Fatima (2007) "Evaluation biologique et immunologique des effets de l'irradiation gamma sur les venins de serpents et de scorpion". 5^{èmes} Journées Scientifiques de l'ANDRS, qui s'est déroulée du 09 au 11 Avril 2007, Annaba.
- Bennacef-Heffar Nouara, **Boukhalfa-Abib Hinda** et Laraba-Djebari Fatima (2007) "Utilisation de l'irradiation gamma dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'envenimation ophidienne". 3^{èmes} Journées de Biologie, environnement et Biodiversité, qui s'est déroulée du 19 au 20 Novembre 2007. Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara, Boumerdès.
- **Boukhalfa-Abib Hinda.**, Bennacef-Heffar Nouara., Oussedik-Oumehdi Habiba et Laraba-Djebari Fatima (2008) "Utilisation de la Radiobiologie dans la détoxification des venins de *Viperidae* : Apport dans la thérapie antivenimeuse". 34^{ème} anniversaire de la création de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene sous le thème « La Recherche Doctorale et la formation au service du Développement », qui s'est déroulée à la Faculté des Sciences Biologiques du 19 au 24 Avril 2008.
- Bennacef-Heffar Nouara., **Boukhalfa-Abib Hinda.**, Oussedik-Oumehdi Habiba et Laraba-Djebari Fatima (2008) "Effet de l'Irradiation Gamma sur les Venins de *Viperidae* et leur Activités Biologiques". 34^{ème} anniversaire de la création de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene sous le thème « La Recherche Doctorale et la formation au service du Développement », qui s'est déroulée à la Faculté des Sciences Biologiques du 19 au 24 Avril 2008.
- Oussedik-Oumehdi H., Hamza L., Chérifi F., Amrane F., **Boukhalfa-Abib H.**, Bennacef-Chaou N., Saci A., Bennacef-Heffar N. et Laraba-Djebari F. (2008)

"Biodiversité des Venins de *Viperidae* : Source de Biomolécules Pharmacologiquement Actives". 34^{ème} anniversaire de la création de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene sous le thème «La Recherche Doctorale et la formation au service du Développement», qui s'est déroulée à la Faculté des Sciences Biologiques du 19 au 24 Avril 2008.

- **Boukhalfa-Abib Hinda** et Laraba-Djebari Fatima (2009) "Radiosensibilité des protéines du venin de la vipère à cornes *Cerastes cerastes* : Aspects biochimique et immunologique". Troisième Conférence Nationale sur les Rayonnements et leurs Applications (CNRA2009), qui se déroule à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (Bab Ezzouar, Alger) du 26 au 28 Mai 2009.
- Bennacef-Heffar Nouara, **Boukhalfa-Abib Hinda** Oussedik-Oumehdi Habiba et Laraba-Djebari Fatima (2009) "Apport de la radiobiologie dans la thérapie antivenimeuse ophidienne". Deuxième Workshop Biotechnologie en Santé Humaine, qui s'est déroulée à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (Bab Ezzouar, Alger) du 08 au 10 Novembre 2009.
- Oussedik-Oumehdi H., Bennacef-Heffar N., **Boukhalfa-Abib H.** et Laraba-Djebari F. (2010) "Irradiation gamma au ⁶⁰Co : Effets sur la toxicité et les propriétés biochimiques des venins de *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*". 36^{ème} anniversaire de la création de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene sous le thème «LMD : L'étudiant face à la connaissance et son utilisation efficace», qui s'est déroulée à la Faculté des Sciences Biologiques du 18 au 22 Avril 2010.

DEDICACES

Mon cœur ne cesse de remercier Dieu,

Pour m'avoir guidé vers la voie de la science.

Pour m'avoir donné des parents aussi formidables.

Un mari gentil et compréhensif

*Pour m'avoir bien entouré de mes chers enfants,
sœurs, frères, belles- sœurs et beaux-frères.*

*D'avoir mis sur mon chemin des ami(es)
sincères.*

*Pour m'avoir prodigué la force d'aimer et
d'être aimée.*

Je dédie ce travail à toute ma famille et tous ceux que j'aime.

Hinda

Remerciement

La mémoire est fidèle au moment de se souvenir de tous ceux qui ont rendu possible la réalisation et l'achèvement de ce travail, qui a été réalisé au Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB et au Laboratoire de Recherche et Développement sur les Venins de L'Institut Pasteur d'Algérie, sous la direction du Professeur F. Laraba-Djebari.

J'exprime tout particulièrement ma gratitude à M^{me} F. Laraba-Djebari pour avoir dirigé et encadré ce travail, pour ses intarissables et précieux conseils, pour sa rigueur scientifique, pour son dévouement, pour son abnégation, pour sa disponibilité et surtout pour ses encouragements et son soutien. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde et incommensurable reconnaissance et mon profond respect.

Mes vifs remerciements s'adressent à :

M^r R. Bakour, qui me fait le grand honneur de présider ce jury.

M^r J. P. Chippaux, pour l'honneur qu'il me fait de bien vouloir accepter de juger ce travail.

M^{me} D. Satta, qui m'honore de sa présence afin de juger ce travail.

M^{me} C. Touil-Boukoffa, pour ses encouragements et pour avoir aimablement accepté d'examiner ce travail. Je lui suis grés de l'honneur qu'elle me fait.

M^{me} H. Oussedik-Oumehdi, pour son soutien, ses précieux conseils, son amabilité et pour avoir bien voulu accepter d'examiner cette thèse.

Je remercie Mme D. Hammoudi-Triki pour ses conseils judicieux, ses encouragements et sa précieuse aide.

Je remercie également mon cher mari Fouad pour ses encouragements, sa précieuse aide et son soutien.

Mes vifs remerciements s'adressent également à Lila, Sonia, Nouara, pour leur précieuse aide et leur amitié, ainsi qu'à Sassia, Hayet, Hajer, Assia, Souad, Fatima, Amina, Fatah et Amel.

Je remercie tout particulièrement mon amie samah et son mari Reda pour leur encouragement et leur soutien.

Sommaire

I. Introduction.....	1
II. Généralités.....	3
II.1. Envenimation ophidienne.....	3
II.2. Les serpents.....	3
II.3. Les venins de serpents et leurs constituants.....	5
II.3.1. Les enzymes des venins de serpents.....	5
II.3.1.1. Les protéinases.....	5
II.3.1.2. Les métalloprotéinases hémorragiques.....	8
II.3.1.2.1. Classification des métalloprotéinases hémorragiques.....	8
II.3.1.2.2. Structure des métalloprotéinases hémorragiques.....	13
II.3.1.2.3. Mécanisme d'action des métalloprotéinases hémorragiques.....	17
II.3.1.3. Les phospholipases A ₂	21
II.3.1.4. Les hyaluronidases.....	25
II.3.1.5. Les L-amino-acide oxydases.....	25
II.3.1.6. Les acétylcholinestérases.....	25
II.3.2. Les toxines des venins de serpents.....	25
II.3.2.1. Les neurotoxines.....	25
II.3.2.2. Les cardiotoxines.....	26
II.3.2.3. Les myotoxines.....	26
II.3.2.3.1. Classification des myotoxines.....	26
II.3.2.3.2. Mode d'action des myotoxines.....	31
II.4. Traitement des envenimations vipérines.....	34
II.4.1. Immunothérapie.....	34
II.4.2. Détoxification des venins de serpents.....	34
II.5. Les rayonnements ionisants gamma.....	35
II.5.1. La dose absorbée.....	35
II.5.2. Le débit de dose absorbé.....	35
II.5.3. Effet des rayonnements ionisants gamma sur les protéines.....	35
II.5.3.1. Action directe.....	36
II.5.3.2. Action indirecte.....	36
II.5.4. Impacts de l'irradiation gamma sur les molécules biologiques.....	36
II.5.4.1. Radiolyse de l'eau.....	36
II.5.4.2. Radiolyse des glucides.....	38
II.5.4.3. Radiolyse des protéines.....	38
II.5.5. Effets des rayonnements gamma sur les protéines des venins de serpents.....	38
III. Matériel et méthodes.....	41
III.1. Matériel.....	41
III.1.1. Matériel biologique.....	41
III.1.1.1. Venin.....	41
III.1.1.2. Les Animaux.....	41
III.1.2. Matériel analytique.....	41
III.1.2.1. Produits chimiques.....	41
III.2. Méthodes.....	42
III.2.1. Détoxification du venin natif de <i>Cerastes cerastes</i> par les rayonnements ionisants gamma au Cobalt-60.....	42
III.2.2. Test de toxicité.....	42
III.2.3. Etude des propriétés biochimiques du venin natif et irradié (V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) de <i>Cerastes cerastes</i>	42

III.2.3.1. Caractérisation protéique du venin de <i>Cerastes cerastes</i> après irradiation gamma par RP-HPLC.....	42
III.2.3.2. Analyse du profil électrophorétique du venin de <i>Cerastes cerastes</i> après irradiation gamma par SDS-PAGE.....	43
III.2.3.3. Détermination des activités enzymatiques du venin de <i>Cerastes cerastes</i> avant et après irradiation gamma.....	43
III.2.3.3.1. Détermination de l'activité caséinolytique.....	43
III.2.3.3.2. Détermination de l'activité Arginine-ester-hydrolase.....	44
III.2.3.3.3. Détermination de l'activité amidolytique de type thrombine.....	44
III.2.3.3.4. Détermination de l'activité phospholipasique.....	45
III.2.3.4. Détermination des activités biologiques du venin de <i>Cerastes cerastes</i> avant et après irradiation gamma.....	45
III.2.3.4.1. Détermination de l'activité hémorragique.....	45
III.2.3.4.1.1. Etude macroscopique de l'activité hémorragique du venin natif et irradié de <i>Cerastes cerastes</i>	45
III.2.3.4.1.2. Etude microscopique de l'activité hémorragique du venin natif et irradié de <i>Cerastes cerastes</i>	46
III.2.3.4.2. Détermination de l'activité myotoxique.....	46
III.2.3.4.2.1. Détermination de l'activité enzymatique de la créatine kinase dans le sérum et le muscle squelettique de souris.....	47
III.2.3.4.2.2. Etude histologique du muscle squelettique de souris envenimées avec le venin natif ou irradié de <i>Cerastes cerastes</i>	47
III.2.4. Etude des propriétés immunologiques du venin natif et irradié (V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) de <i>Cerastes cerastes</i>	47
III.2.4.1. Préparation des immun-sérums.....	47
III.2.4.2. Détermination du titre en anticorps des différents immun-sérums anti-venins de <i>Cerastes cerastes</i> par ELISA simple.....	48
III.2.4.3. Détermination de la capacité neutralisante des immun-sérums anti-vipérins natif et irradiés par séroneutralisation.....	48
III.2.5. Purification et caractérisation des protéinases hémorragiques à partir du venin natif de <i>Cerastes cerastes</i>	49
III.2.5.1. Fractionnement du venin de <i>Cerastes cerastes</i> par filtration moléculaire sur Sephadex G-75.....	49
III.2.5.2. Séparation de la fraction hémorragique GF1 par chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE Sephadex A-50.....	49
III.2.5.3. Séparation de la fraction hémorragique D1 par chromatographie d'affinité sur gel d'Arginine Sepharose 4B.....	49
III.2.5.4. Purification de la fraction hémorragique A1 par RP-HPLC.....	50
III.2.6. Caractérisation biochimique de la molécule hémorragique CcH1 purifiée à partir du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	50
III.2.6.1. Effets de quelques inhibiteurs sur l'activité hémorragique et protéolytique de la molécule hémorragique CcH1.....	50
III.2.6.2. Effet de la température sur l'activité hémorragique et protéolytique de la molécule hémorragique CcH1.....	51
IV. Résultats et discussion.....	52
IV.1. Détermination de la toxicité des venins irradiés de <i>Cerastes cerastes</i>	52
IV.2. Effet de la variation du débit de dose de l'irradiation gamma sur les propriétés biochimiques du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	53
IV.2.1. Analyse chromatographique des préparations du venin de <i>Cerastes cerastes</i> (natif et irradiés) par RP-HPLC.....	53
IV.2.2. Etude de l'homogénéité du venin natif et irradiés (V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) de <i>Cerastes cerastes</i> par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	55
IV.2.3. Effet du débit de dose d'irradiation gamma sur les activités enzymatiques du venin de	

<i>Cerastes cerastes</i>	55
IV.2.3.1. Détermination de l'activité caséinolytique.....	55
IV.2.3.2. Détermination de l'activité Arginine-ester-hydrolase.....	57
IV.2.3.3. Détermination de l'activité amidolytique de type thrombine.....	57
IV.2.3.4. Détermination de l'activité phospholipasique.....	58
IV.2.4. Effet du débit de dose d'irradiation gamma sur les activités biologiques du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	58
IV.2.4.1. Détermination de l'activité hémorragique.....	58
IV.2.4.1.1. Etude macroscopique de l'activité hémorragique du venin natif et irradié de <i>Cerastes cerastes</i>	58
IV.2.4.1.2. Analyse histopathologique de la peau dorsale des animaux soumis à des injections de venins de <i>Cerastes cerastes</i> (natif ou irradiés).....	62
IV.2.4.2. Détermination de l'activité myotoxique.....	65
IV.2.4.2.1. Dosage de l'activité enzymatique de la créatine kinase dans le sérum et le muscle squelettique de souris.....	65
IV.2.4.2.2. Etude des altérations tissulaires au niveau du muscle squelettique des souris envenimées avec le venin natif ou irradié de <i>Cerastes cerastes</i>	67
IV.3. Variation du débit de dose d'irradiation gamma et son effet sur les propriétés immunologiques du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	69
IV.3.1. Détermination des propriétés antigéniques des venins irradiés par la détermination du titre en anticorps des immun-sérums par ELISA simple.....	69
IV.3.2. Evaluation de la capacité neutralisante par séro-neutralisation des immun-sérums expérimentaux de lapin.....	71
IV.4. Purification et caractérisation des protéinases hémorragiques à partir du venin natif de <i>Cerastes cerastes</i>	73
I.4.1. Purification des protéinases hémorragiques du venin de <i>Cerastes cerastes</i> par différentes méthodes chromatographiques.....	73
IV.4.2. Caractérisation biochimique de la molécule hémorragique CcH1 purifiée à partir du venin de <i>Cerastes cerastes</i>	79
IV.4.2.1. Détermination de l'activité hémorragique de la molécule hémorragique CcH1 purifiée à partir du venin de <i>Cerastes cerastes</i> en utilisant des tests macroscopique et microscopique.....	79
IV.4.2.2. Effet des inhibiteurs protéasiques sur l'activité hémorragique et protéolytique de la molécule hémorragique CcH1.....	83
IV.4.2.3. Effet de la température sur l'activité hémorragique et protéolytique de la molécule hémorragique CcH1.....	83
V. Discussion générale.....	86
VI. Conclusion et perspectives.....	94
VII. Références bibliographiques.....	96
VIII. Annexe.....	116

Introduction

Introduction

Les envenimations ophidiennes sont accidentelles et constituent une urgence médicale. Dans le monde, plus de 5 millions de morsures surviennent chaque année. Il en résulte jusqu'à 2,5 millions de cas d'envenimement, provoquant ainsi plus de 100 000 décès et environ trois fois plus d'amputations par an dus aux morsures de serpents (Kohli et Sakuja, 2003 ; Chippaux, 2008 ; Kasturiratne et *al.*, 2008 ; OMS, 2010). En Afrique tropicale, les morsures de *Viperidae* sont responsables de 90 % des envenimations (Chippaux et *al.*, 1999).

En Algérie, les envenimations par morsures de serpents sont principalement dues à deux espèces de *Viperidae* (*Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*). La vipère à cornes *Cerastes cerastes* est très largement répandue au Sud Algérien et plus précisément dans les zones désertiques. Elle est considérée comme étant l'un des serpents les plus redoutables. Sa morsure est grave et souvent mortelle.

Les venins des serpents constituent une source potentielle de protéines bioactives (Warrell, 1995 ; Franceschi et *al.*, 2000 ; Ramos et Selistre-de-Araujo, 2006 ; Zouari-Kessentini et *al.*, 2009). Chacune de ces protéines peut provoquer de graves perturbations des systèmes biologiques de l'organisme. Ces perturbations sont à l'origine de l'œdème, de l'hémorragie et de la nécrose tissulaire, caractéristique d'une envenimation vipérine (Evans et Ownby, 1999 ; Anai et *al.*, 2002 ; Ramos et Selistre-de-Araujo, 2006 ; Gutiérrez et *al.*, 2009a). Ces symptômes représentent un sérieux problème clinique. Ils ne sont pas toujours neutralisés par les différentes préparations d'immun-sérums.

Lors d'une envenimation ophidienne, il se développe un syndrome hémorragique de grande importance clinique. Il se manifeste localement au niveau de la morsure et s'étend de manière systémique contribuant au choc cardiovasculaire caractéristique des envenimations sévères (Franceschi et *al.*, 2000 ; De Roodt et *al.*, 2003 ; Rafael et *al.*, 2008 ; Gutiérrez et *al.*, 2009a). Ces hémorragies sont provoquées par des protéinases hémorragiques, appelées « hémorragines » qui sont abondantes dans les venins de *Viperidae* et de *Crotalidae*. Ces molécules hémorragiques sont des métalloprotéinases à zinc appartenant à quatre classes qui diffèrent selon leurs structures et leurs masse moléculaire, variant entre 20 et 100 kDa (Jia et *al.*, 1996 ; Kamiguti et *al.*, 1998 ; Fox et Serrano, 2008).

Malgré la complexité des venins qui rend difficile l'étude de leurs compositions et de leurs propriétés, de nombreuses recherches ont déjà conduit à la découverte de nouvelles substances.

La purification et la compréhension des mécanismes d'action des composants du venin permettraient d'améliorer la sérothérapie antivenimeuse, qui reste à l'heure actuelle, le seul traitement spécifique des envenimations ophidiennes (Sellahawa et *al.*, 1995 ; Ferreira et *al.*, 2000). Ces substances pourraient également servir de modèles pour la synthèse de nouvelles molécules plus spécifiques à usage thérapeutique.

La toxicité élevée des venins de serpents constitue une difficulté majeure pour la préparation des immun-sérums anti-vipérins. L'emploi d'un venin partiellement ou totalement détoxifié par irradiation gamma devrait permettre d'une part, de diminuer les

risques d'accidents chez les animaux immunisés et d'autre part, d'améliorer le titre des immun-sérums.

Les rayonnements ionisants gamma sont des ondes électromagnétiques de même nature que la lumière, ayant une fréquence plus grande et une énergie plus élevée. Ils sont issus de la décomposition d'atomes radioactifs tels que le Cobalt 60 (^{60}Co) et le Césium 137 (^{137}Cs). Lorsqu'ils interagissent avec les solutions aqueuses, ces rayons gamma produisent des espèces réactives telles qu' $e^{-}\text{aq}$, O_2^{-} , H^{\cdot} et OH^{\cdot} , qui peuvent modifier l'activité biologique des protéines et des peptides en réagissant avec certains sites ou groupes de ces macromolécules. Ces propriétés ont largement été employées pour atténuer la toxicité des venins et obtenir des substances plus immunogènes pour la production d'immun-sérums thérapeutiques (Murata et al., 1990 ; Nascimento et al., 1996 ; Clissa et al., 1999 ; Oliveira et al., 2009 ; Baptista et al., 2010).

L'objectif de cette étude est d'étudier l'effet du débit de dose d'irradiation gamma sur la toxicité et les propriétés biochimiques du venin de *Cerastes cerastes*, en vue de déterminer les modifications subies par ce venin sous l'effet des rayonnements gamma. A cet effet, le venin de *Cerastes cerastes* a été irradié à une dose de 2 kGy émise par le Cobalt-60, en utilisant différents débits de doses estimés à 194, 765 et 1737 Gy/h.

Dans une première étape, nous avons effectué la mise en évidence des différentes activités enzymatiques (activités protéolytique et phospholipasique) et biologiques (hémorragie et myotoxicité) au niveau des solutions de venins de *Cerastes cerastes* (natif et irradiés). Une étude microscopique a été également réalisée, dans le but d'une meilleure caractérisation des effets physiopathologiques provoqués par ces venins.

Dans une deuxième étape, il nous a semblé nécessaire d'étudier l'effet du débit de dose d'irradiation gamma sur les propriétés immunologiques du venin de *Cerastes cerastes* pour une mise en place éventuelle d'une sérothérapie spécifique et efficace.

Ce présent travail a pour but également de purifier et de caractériser les molécules hémorragiques à partir du venin de *Cerastes cerastes*. Pour cela, le venin a été soumis à différentes techniques chromatographiques (chromatographie d'exclusion moléculaire, d'échangeuse d'anions, d'affinité et RP-HPLC).

Généralités

I.1. Envenimation ophidienne

L'envenimation ophidienne se caractérise par une série complexe de perturbations physiopathologiques locales et systémique, incluant les inflammations extensives évoluant vers la nécrose ou la gangrène, nécessitant souvent l'amputation du membre atteint.

La gravité des symptômes de l'envenimation ophidienne varie selon la quantité de venin injectée, la localisation de la morsure, l'âge, le poids et les antécédents cliniques de la victime. Le venin est injecté, sous pression, dans l'hypoderme et les symptômes observés vont de la simple lésion cutanée à l'envenimation majeure (Pulce *et al.*, 2003).

Après une envenimation par morsure de serpents, l'œdème est l'un des premiers syndromes observé, il résulte d'une augmentation de la perméabilité capillaire. Cette altération a pour conséquence une fuite du contenu intra-vasculaire vers les espaces interstitiels (Cabanne et Bonenfant, 1980). Des hémorragies apparaissent 1 heure après la morsure suivies par des désordres hématologiques. La nécrose apparaît 2 à 4 jours plus tard. Le décès de la victime, survient suite à un coma. Le délai entre l'injection du venin et le décès est compris entre 12 heures et 6 jours.

Les signes locaux (œdème et ecchymose) sont les premiers à apparaître. L'œdème est parfois extensif, parsemé de taches purpuriques. Une nécrose superficielle est localisée dans la zone de la morsure.

Les signes généraux sont atypiques, ils associent angoisse, nausées, vomissements, hypotension artérielle, hémorragie, coagulation du sang et tachycardie. Ces signes peuvent évoluer vers un état de choc avec collapsus cardio-vasculaire (Serve, 1992 ; Gutiérrez et *al.*, 1996 ; 2009a).

La toxicité des venins de serpent est due à l'action synergique de l'ensemble des interactions de ses différents composants. Le pouvoir létal des venins est estimé par la dose létale 50 (DL50). La DL50 du venin de *Cerastes cerastes* est estimée à 2,4 mg/kg d'animaux (Laraba-Djebari, 1996).

I.2. Les serpents

Les serpents sont des animaux amniotiques, carnivores et poïkilothermes, appartenant à la classe des reptiles et sous-ordre des Ophidiens. Ils forment, avec les Sauriens, l'ordre des Squamates, qui sont dépourvus de pattes. Il existe environ 2700 espèces de serpents répertoriées dans le monde dont 700 sont venimeuses (Ringwold, 2001 ; Calvet et *al.*, 2007).

L'efficacité de la fonction venimeuse repose sur le pouvoir offensif des crochets et sur leur perfection comme instrument d'injection. L'anatomie de leur appareil inoculateur permet de les diviser en 4 groupes : les Aglyphes, les Opistoglyphes, les Protéroglyphes et les Solénoglyphes. Les espèces venimeuses appartiennent aux familles du groupe des protéroglyphes (*Elapidae*, *Hydrophidae*) et des Solénoglyphes (*Crotalidae*, *Viperidae*).

Cerastes cerastes est une vipère qui appartient à la famille des *Viperidae*, dérivant de la super-famille des *Colubroidae*. Son habitat s'étend depuis la côte atlantique de l'Afrique du nord jusqu'à l'Asie occidentale (Tableau I).

Tableau I : Répartition géographique de quelques sous-espèces de *Cerastes cerastes*
(Slavtchev et Ben Osman, 1969 ; Gruber, 1992).

Sous-espèce	Répartition géographique
<i>Cerastes cerastes cerastes</i>	Afrique du Nord, de la Mauritanie à l’Egypte.
<i>Cerastes cerastes gasperitti</i>	Syrie, Palestine, Jordanie, Irak, Arabie Saoudite.
<i>Cerastes cerastes karlhorthi</i>	Mauritanie, Algérie, Tunisie, Mali, Niger.
<i>Cerastes cerastes mutila</i>	Libye, Soudan, Egypte, Palestine.

En Algérie, cette espèce est retrouvée dans le désert et les hauts plateaux bien qu'elle soit réputée vivre uniquement dans les régions sablonneuses (Gruber, 1992). La taille moyenne de cette vipère est de 60 cm et peut atteindre 80 cm pour certaines espèces (Largeoux et *al.*, 1995). Sa couleur jaune ambrée, s'harmonisant avec la couleur du sable lui permet d'être invisible durant la journée. Nocturne, elle représente un réel danger, sa morsure est toujours grave et souvent mortelle.

I.3. Les venins de serpents et leurs constituants

Le venin sécrété par le serpent a pour fonction première l'immobilisation et la digestion de la proie. La quantité de venin dans chaque glande varie entre 15 et 800 mg de produit sec.

La composition des venins de serpents est très complexe. Ces mélanges biologiques renferment des peptides, des protéines enzymatiques et non enzymatiques, des amines biogènes, des flavines et de faibles quantités de zinc, de cuivre et de fer (Visudhiphan et *al.*, 1989 ; Warrell, 1995 ; Franceschi et *al.*, 2000).

Les toxines (neurotoxines, cardiotoxines) de venins de serpents dans quelques cas d'espèces remplissent leurs fonctions d'immobilisation des proies avec efficacité, en bloquant le fonctionnement du système nerveux ou du système cardio-vasculaire (Menez, 1993).

I.3.1. Les enzymes des venins de serpents

Certaines enzymes caractérisent une famille de serpents, c'est le cas de l'acétylcholinestérase qui est spécifique aux venins d'*Elapidae* et d'*Hydrophidae*, tandis que l'arginine ester hydrolase est caractéristique des venins de *Viperidae* (Laraba-Djebari, 1984). Cependant, la présence de la phospholipase A₂ (PLA₂) a été démontrée dans la plupart des venins de serpents étudiés.

I.3.1.1. Les protéinases

Les protéinases des venins de serpents représentent un groupe hétérogène de protéines enzymatiques de masse moléculaire variable entre 15 et 380 kDa (Wisner et Bon, 2002).

Certaines protéinases exercent une action protéolytique provoquant la destruction tissulaire voir même aboutissant à la nécrose (Markland, 1998 ; Gutierrez et Rucavado, 2000). Alors que d'autres exercent des effets d'activateurs ou d'inhibiteurs sur le mécanisme hémostatique (Alexander *et al.*, 1998 ; Petretski et *al.*, 2000 ; Koh et *al.*, 2001 ; Joseph *et al.*, 2002).

Les protéinases qui agissent sur les facteurs de la cascade de la coagulation sanguine sont douées d'activité pro-coagulante ou anti-coagulante. Les protéinases anti-coagulantes provoquent de graves troubles chez l'homme qui se caractérisent essentiellement par des saignements continus et un syndrome hémorragique. Elles sont présentes dans le venin des *Viperidae*, leur action aboutit à une dégradation du fibrinogène. Cette action du venin est accentuée par la présence d'hémorragines qui attaquent directement la paroi vasculaire et les plaquettes sanguines (Kini et Evans, 1992).

Les protéinases sont classées selon leur structure en sérine protéinases et en métalloprotéinases (Wang et Huang, 2002).

- Les sérine protéinases

Les sérines protéinases sont abondantes dans les venins de *Viperidae* et de *Crotalidae* (elles représentent 20 % des protéines totales du venin). Elles ne sont pas létales par elles mêmes, mais associées à d'autres protéines du venin, elles sont capables de rompre l'équilibre hémostatique de la proie. Certaines possèdent à la fois une activité fibrino(géno)lytique et fibrinolytique, alors que d'autres ne possèdent que l'activité fibrinogénolytique (enzymes thrombine-like), (Laraba-Djebari et al., 1995 ; Braud et al., 2000 ; Samel et al., 2002 ; Angulo et Lomonte, 2009).

Plusieurs sérine-protéinases ont été purifiées et caractérisées à partir du venin de *Cerastes cerastes* (Tableau II). Des études réalisées sur ce venin ont permis d'isoler deux sérine protéinases de type thrombine, «RP34 » et «Afâacytine» (Laraba-Djebari et al., 1992 ; Laraba-Djebari et al., 1995).

La RP34 est une α fibrinogénase qui dégrade les chaînes α du fibrinogène alors que l'Afâacytine est une sérine protéinase, qui active le facteur X et induit la libération de sérotonine à partir des plaquettes sanguines (Laraba-Djebari et al., 1992 ; Laraba-Djebari et al., 1995).

Deux autres sérine-protéinases ont été également purifiées et caractérisées à partir du même venin, c'est le cas de « la Cerastocytine » et de « la Cerastatine ». Il s'agit des enzymes de type thrombine à effet pro-coagulant. Ces deux molécules Cerastocytine et la Cerastatine de poids moléculaire respectivement de 38 et 42 kDa présentent sous forme monocaténaire. Leur séquence N-terminale déterminée jusqu'à 60 résidus d'acides aminés présente une forte homologie (Marrakchi et al., 1995). Contrairement à la Cerastocytine qui présente une action activatrice directe sur l'agrégation plaquettaire, la Cerastatine agit indirectement en présence du fibrinogène (Marrakchi et al., 1997).

Le venin de *Cerastes cerastes* est également riche en molécules anti-agrégantes des plaquettes. Deux polypeptides ont été isolés à partir de ce venin. La Cerastene et la Cerastatine. La Cerastene de faible masse moléculaire (< 2 kDa) inhibe sélectivement l'agrégation des plaquettes induite par la thrombine (El-Ayeb et Karoui, 1997). La Cerastatine présente quand à elle une masse moléculaire de 30 à 35 kDa, elle empêche l'agrégation des plaquettes induites par la thrombine et le collagène (El-Ayeb et Karoui, 1997).

Tableau II : Caractérisation de certaines sérines protéinases purifiées à partir du venin de *Cerastes cerastes*.

Sérine protéinase	Caractéristiques	Principaux effets	Références Bibliographiques
Fraction coagulante de <i>Cerastes cerastes</i>	Protéinase de 140 kDa et un pI de 3,2	Activité caséinolytique et un effet toxique à partir de 6 mg/kg en i.p.	El asmar <i>et al.</i> , (1986)
RP34	Protéinase à sérine, dimère de 48,5 kDa et un pI de 3,75	Activité arginine estérase, amidase et α fibrinogénase	Laraba-Djebari <i>et al.</i> , (1992) Laraba-Djebari, (1996)
Fraction IVa	Protéinase de type thrombine, dimère avec un pI > 9,6	Activité arginine estérase et fibrinogénase de type thrombine	Basheer <i>et al.</i> , (1995)
Afâacytine	protéinase glycosylée, dimère de 40 kDa et pI de 6,25	Activité α et β fibrinogénase	Laraba-Djebari <i>et al.</i> , (1995) Laraba-Djebari, (1996)
Cerastatine	Polypeptide de 32 kDa	Effet inhibiteur de l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine et le collagène	El-Ayeb et Karoui, (1997)
Cerastocytine	Enzyme de type thrombine de 38 kDa	Activité pro-coagulante et une action activatrice directe sur l'agrégation plaquettaire	Marrakchi <i>et al.</i> , (1997)

- Les métalloprotéinases des venins de serpents ou SVMP (Snake Venom Metalloproteinases)

Les métalloprotéinases sont essentiellement des enzymes Zn^{2+} dépendantes (Huang et al., 1984 ; Howes et al., 2005) pouvant être aussi Ca^{2+} ou Zn^{2+}/Ca^{2+} dépendantes (Sugihara et al., 1983 ; Muniz et al., 2008 ; Gomes et al., 2009 ; Hamza et al., 2010a). Elles induisent des hémorragies sévères grâce à leur capacité à inhiber l'agrégation des plaquettes et/ou à dégrader les composants de la matrice extracellulaire (collagène, laminine, fibronectine et protéoglycannes), (Kamiguti et al., 1998 ; Gutiérrez et Rucavado, 2000 ; Escalante et al., 2009).

Les métalloprotéinases hémorragiques sont également impliquées dans la pathogénèse de la myonécrose, des dommages cutanés et de l'œdème (Chaves et al., 1995 ; Salvini et al., 2001 ; Bazaa et al., 2005 ; Oussedik-Oumehdi et Laraba-Djebari, 2008 ; Hamza et al., 2010a).

I.3.1.2. Les métalloprotéinases hémorragiques

Les métalloprotéinases hémorragiques, dites aussi hémorragines sont classées selon leurs structure et leurs masses moléculaires en 4 classes (Zhang et al., 1994 ; De-Roodt et al., 2003 ; Fox et Serrano, 2008).

Les hémorragines sont caractérisées par la présence d'une séquence de base. Cette séquence est constituée d'un peptide signal, d'une pro-séquence et d'un domaine protéinase conservé (Zhang et al., 1994 ; Markland, 1998 ; De-Roodt et al., 2003 ; Fox et Serrano, 2008), (Figure 1).

I.3.1.2.1. Classification des métalloprotéinases hémorragiques

- **Classe I :** Cette classe regroupe les protéinases de faible masse moléculaire (20 -30 kDa). Elles sont abondantes dans les venins de serpents et possèdent généralement des propriétés fibrinogénolytiques en plus de leurs propriétés hémorragiques. Du point de vue structural, cette classe possède uniquement un domaine protéinase. Ce domaine de 200 résidus d'acides aminés contient une séquence consensus $H_{142}EXXH_{146}XXGXXH_{152}$, les résidus histidines de cette séquence sont indispensables pour l'activité protéolytique de l'enzyme. Ainsi que la molécule d'eau et l'ion Zinc. L'ensemble consititue le site actif des métalloprotéinases hémorragiques (Bjarnason et Fox, 1994 ; Omori-Satoh et al., 2000 ; Wang et al., 2005 ; Muniz et al., 2008), (Figure 2).

SVMP de Classe I



SVMP de Classe II



SVMP de Classe III



SVMP de Classe IV



Figure 1 : Organisation structurale des différentes classes de métalloprotéinases hémorragiques isolées à partir des venins de serpents (Fox et Seranno, 2008).

P : Peptide signal; **Pro :** pro-séquence; **Protéinase :** Domaine protéinase; **S :** Spacer; **Dis :** Domaine de type désintégrine; **Cys-Rich :** Domaine riche en Cystéine; **Lec :** Domaine de type lectine.

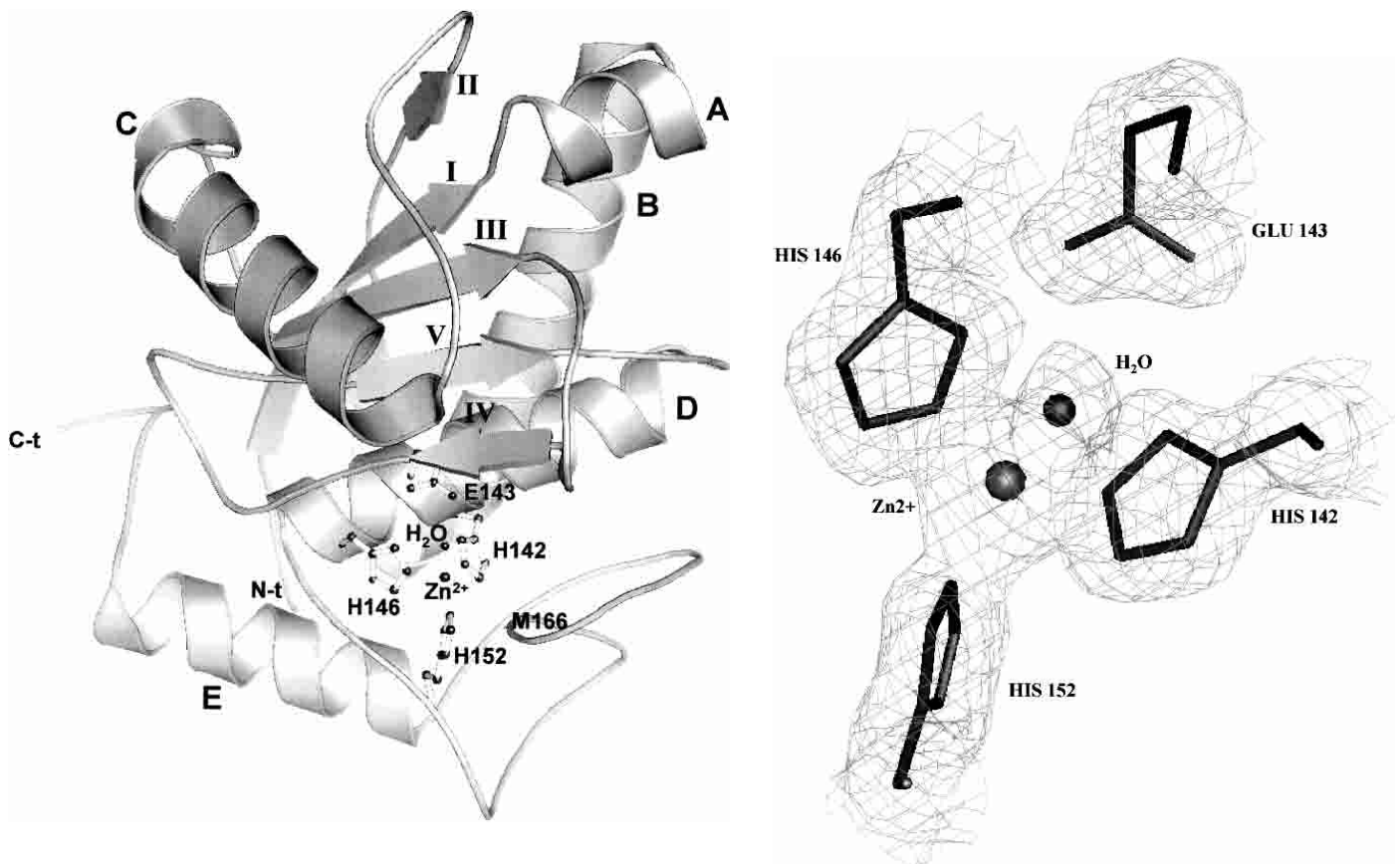


Figure 2 : Structure tridimensionnelle de la métalloprotéinase hémorragique de classe I (BaP1) purifiée à partir du venin de *Bothrops asper* (Watanabe et al., 2003).

Les résidus histidines 142, 146 et 152, le résidu glutamate 143 et l'ion zinc ainsi que la molécule d'eau (H₂O) forment l'environnement du site actif de la métalloprotéinase hémorragique (BaP1).

- **Classe II :** Cette classe renferme les protéinases de masse moléculaire entre (30 et 60 kDa). La séquence révèle une structure avec deux domaines, un domaine protéinase et un domaine de type désintégrine. Ce domaine possède une séquence XXCD (avec XX = SE, DE, HD ou DD), (Markland, 1998 ; Gutiérrez et Rucavado, 2000 ; Ito et *al.*, 2001). Une séquence de 21 acides aminés sépare le domaine protéinase du domaine de type désintégrine, dite "spacer" (Bjarnason et Fox, 1994 ; Nikai et *al.*, 2000 ; Fox et Serrano, 2008).
- **Classe III :** Cette classe représente les protéinases de masse moléculaire élevée (60 - 90 kDa). Leur séquence révèle la présence de trois domaines structuraux, un domaine protéinase, un domaine de type désintégrine et un troisième domaine riche en cystéine (Jia et *al.*, 1996 ; Franceschi et *al.*, 2000). Ce domaine module la spécificité catalytique des protéinases hémorragiques et il pourrait jouer le rôle de "chaperon", évitant aux protéinases hémorragiques de s'engager dans des interactions non spécifiques (Franceschi et *al.*, 2000 ; Chen et *al.*, 2004 ; Bello et *al.*, 2006). La région "spacer" des SVMP de classe III possède un résidu cystéine invariable en position 11, qui est absent de la région "spacer" des métalloprotéinases hémorragiques de classe II. Ce résidu formerait un pont dissulfure avec un résidu cystéine du domaine riche en cystéine. Les SVMP de classe III sont les plus hémorragiques, leur activité hémorragique est 25 fois plus importante que celle des métalloprotéinases hémorragiques de classe I (Bjarnason et Fox, 1994 ; Nikai et *al.*, 2000 ; Bello et *al.*, 2006).
- **Classe IV :** Cette classe regroupe les protéinases ayant une masse moléculaire supérieure à 90 kDa. La séquence présente quatre domaines avec trois domaines décrits dans la classe III des métalloprotéinases hémorragiques, suivi d'un domaine de type lectine (Zhang et *al.*, 1994 ; Gutiérrez et Rucavado, 2000).

Il a été montré que 65 métalloprotéinases hémorragiques ont été purifiées à partir de 24 espèces de serpents (Kini et Evans, 1992 ; Markland, 1998) (Tableau III).

La plupart des métalloprotéinases hémorragiques isolées à partir des venins de *Viperidae* et de *Crotalidae* sont des glycoprotéines thermolabiles (Borkow et *al.*, 1993). Leur activité maximale est obtenue à pH variant de 5,5 à 9,5.

Tableau III : Différentes métalloprotéinases hémorragiques purifiées à partir des venins de serpents.

Classes des SVMP	Genre & Espèce	Métalloprotéinase	Poids moléculaire	Références bibliographiques
SVMP de classe I	<i>Bothrops asper</i>	BaH2	26,000	Borkow et al., (1993)
	<i>Bothrops lanceolatus</i>	BlaH1	28,000	Stroka et al., (2005)
	<i>Bothrops moojeni</i>	BthMP	23,500	Gomes et al., (2009)
	<i>Cerastes cerastes</i>	Cerastase F-4	22,500	Kini et Evans, (1992)
	<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>	CcH1	25,000	Boukhalfa-Abib et al., (2009)
		P ₁₃	27,000	Martinez et al., (1990)
SVMP de classe II	<i>Agkistrodon acutus</i>	Ac ₃ -protéinase Ac ₄ -protéinase	57,000 33,000	Mori et al., (1984)
	<i>Agkistrodon bilineatus bilineatus</i>	Bilitoxine	48,000	Ownby et al., (1990)
	<i>Bothrops neuwiedi</i>	NHFa NHFb	46,000 58,000	Mandelbaum et al., (1984)
	<i>Echis ocellatus</i>	EoVMP2	56,000	Howes et al., (2003)
	<i>Vipera lebetina</i>	VLH2	55,000	Hamza et al., (2010a)
SVMP de classe III	<i>Bothrops asper</i>	BaH1	64,000	Lomonte et al., (1994)
		BaH4	69,000	Franceschi et al., (2000)
	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	VaH ₁ VaH ₂	70,000 70,000	Leonardi et al., (2001)
SVMP de classe IV	<i>Lachesis muta muta</i>	LHFI	100,000	Sanchez et al., (1987)
	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	Mucrotoxine A	94,000	Kishida et al., (1985)

I.3.1.2.2. Structure des métalloprotéinases hémorragiques

- Le peptide signal (pré-séquence)

Les métalloprotéinases hémorragiques possèdent une séquence signal ou une pré-séquence de 18 résidus d'acides aminés hautement conservés. Ce peptide est libéré de la pro-séquence après clivage entre la glycine 18 et la sérine 19 (Hite et *al.*, 1992 ; Bjarnason et Fox, 1994 ; Hati et *al.*, 1999).

- La pro-séquence

La pro-séquence est constituée de 169 à 210 résidus d'acides aminés. Elle est caractérisée par la présence d'une séquence consensus PKMCGVT située à l'extrémité N-terminale du domaine protéinase (Hite et *al.*, 1992 ; Bjarnason et Fox, 1994), (Figure 3).

L'activité protéolytique des métalloprotéinases hémorragiques est inhibée par l'interaction du résidu cystéine de cette séquence consensus avec l'ion zinc du site actif, empêchant ainsi l'accès du substrat. L'hémorragine n'est active qu'après élimination protéolytique du résidu cystéine de la pro-séquence (Markland, 1998 ; Matsui et *al.*, 2000).

- Le domaine protéinase

C'est un domaine de 200 résidus d'acides aminés stabilisés par trois ou quatre ponts dissulfures. Le domaine protéinase contient une séquence consensus $H_{142}E_{143}X_{144}X_{145}H_{146}X_{147}G_{148}X_{149}X_{150}H_{151}H_{152}$ conservée dans la séquence de toutes les métalloprotéinases de venins (Hite et *al.*, 1992 ; Hati et *al.*, 1999 ; Matsui et *al.*, 2000), (Figure 3).

- Le domaine de type désintégrine

Les désintégrines appartiennent à une famille de peptides riches en cystéines (8 à 14 résidus) et de faible masse moléculaire (4 à 8 kDa). Elles possèdent toutes la séquence consensus RGD qui leur permet de se fixer au complexe GPIIb/IIIa et d'inhiber ainsi l'agrégation des plaquettes (Huang, 1998), (Figure 3).

Les métalloprotéinases hémorragiques appartenant aux classes III et IV, possèdent un domaine qui a une homologie structurale avec les désintégrines des venins de serpents. Ce domaine diffère, cependant, des désintégrines par deux aspects. Ce domaine ne possède pas, d'une part, la séquence RGD, qui est remplacée surtout par une séquence SECD et d'autre part, ce domaine possède deux résidus cystéines supplémentaires, d'où l'appellation de domaine de type désintégrine (Jia et *al.*, 1996 ; Matsui et *al.*, 2000). Un de ces résidus cystéines formerait un pont dissulfure avec l'extrémité N-terminale de la région "spacer". Cette région lie le domaine de type désintégrine avec le domaine protéinase. L'autre résidu de cystéine formerait un pont dissulfure avec le domaine riche en cystéine (Figure 3).

N_T

Pré- et pro-séquence

BaP1 Acutolysin A Fibrolase Adamalysin II HT 2 Atroxase Atrolysin C LHF II ACLPREF Trimerelysin II Bilitoxin I Insularinase Jerdonitin Agkistin Ussurin Atrolysin E Lebetase Contortrostatin Acostatin B Flavovidin TUM 1 HR2a Trigramin Jararhagin Bothropasin Acurhagin Catro/VAP2B HR1A HF3 BjussuMP I HR1B Atrolysin A Ecarin VAP1 HV1 Berythracrivase Kaouthiagin Ohagin RVV X VLFXA

Domaine protéinase

310

BaP1 Acutolysin A Fibrolase Adamalysin II HT 2 Atroxase Atrolysin C LHF II ACLPREF Trimerelysin II Bilitoxin I Insularinase Jerdonitin Agkistin Ussurin Atrolysin E Lebetase Contortrostatin Acostatin B Flavovidin TUM 1 HR2a Trigramin Jararhagin Bothropasin Acurhagin Catro/VAP2B HR1A HF3 BjussuMP I HR1B Atrolysin A Ecarin VAP1 HV1 Berythracrivase Kaouthiagin Ohagin RVV X VLFXA

	350	352	357	365	374	390	406	417	419																																																																						
BaP1	DTGS	--	C	S	C	G	A	K	S	C	I	M	A	S	V	L	S	K	V	L	S	--	Y	E	F	S	D	C	S	Q	N	O	Y	E	T	L	T	N	H	--	N	P	Q	C	I	L	N	K	P	-----																													
Acutolysin A	DEGS	--	C	S	C	G	G	K	S	C	I	M	S	P	S	I	S	E	T	I	--	K	Y	F	S	D	C	S	Y	I	Q	C	R	D	Y	I	A	K	E	--	N	P	Q	C	I	L	N	-----																															
Fibrolase	DGSQ	--	C	N	C	G	G	N	C	V	M	S	A	V	L	M	Q	Q	H	S	--	Y	Q	F	S	D	-----																																																				
Adamalysin II	DGKD	--	C	L	R	G	A	S	L	C	I	M	R	P	G	L	T	P	G	R	S	--	Y	E	F	S	D	D	S	M	G	Y	Y	Q	K	F	L	N	Q	Y	--	K	P	Q	C	I	L	N	K	P	-----																												
HT 2	DGKD	--	C	L	R	G	A	S	L	C	I	M	R	P	G	L	T	P	G	R	S	--	Y	E	F	S	D	A	S	M	R	Y	Y	Q	K	F	L	D	Q	Y	--	K	P	Q	C	I	L	N	K	P	-----																												
Atroxase	DGEK	--	C	L	R	G	A	S	L	C	I	M	R	P	G	L	T	P	G	R	S	--	Y	E	F	S	D	D	S	M	G	Y	Y	Q	K	F	L	Q	Y	--	N	P	Q	-----																																			
Atrolysin C	DGKD	--	C	L	R	G	A	S	L	C	I	M	R	P	G	L	T	P	G	R	S	--	Y	E	F	S	D	A	S	M	H	Y	Y	E	R	F	L	K	Q	Y	--	K	P	Q	C	I	L	N	K	P	L	R	I	D	P	V	S	T	P	V	S	G	N	E	L	L	E	A	G	E	-----								
LHF II	DENH	--	C	H	C	S	A	S	F	C	I	M	P	P	S	I	S	E	G	P	S	--	Y	E	F	S	D	C	S	K	D	Y	Q	M	F	L	T	K	R	--	K	P	Q	C	I	L	N	K	P	-----																													
ACLPREF	DGNQ	--	C	H	C	G	A	N	S	C	V	M	P	S	V	L	S	D	Q	P	S	--	K	L	F	S	D	C	S	K	K	D	Y	Q	T	F	L	P	V	N	--	N	P	Q	C	I	L	N	K	P	L	R	T	D	T	A	S	T	P	V	S	G	N	E	L	L	E	A	-----										
Trimerelysin II	DDKD	--	K	--	C	K	C	E	A	C	I	M	S	D	V	I	S	D	K	P	S	--	K	L	F	S	D	C	S	K	N	D	Y	Q	T	F	L	T	K	Y	--	N	P	Q	C	I	L	N	A	P	-----																												
Bilitoxin I	DINS	--	C	T	C	G	G	Y	C	I	M	L	P	A	L	S	D	Q	P	S	--	K	Y	F	S	D	C	S	Y	I	Q	R	D	F	I	M	N	Q	--	D	P	Q	C	I	L	N	E	P	S	G	T	D	I	V	S	P	P	V	C	G	N	D	I	L	E	V	G	E	E	C	D	C	G	-----					
Insularinase	DD-T	--	C	T	C	G	A	K	S	C	I	M	A	S	T	I	S	K	G	L	S	--	F	E	F	S	D	C	S	K	S	Q	N	O	Y	Q	T	L	T	D	H	--	N	P	Q	C	I	L	N	K	P	L	T	-----																									
Jerdonitin	DGDS	--	C	T	C	G	A	N	S	C	I	M	S	A	T	V	S	N	E	P	S	--	S	R	F	S	D	C	S	L	F	Y	S	S	D	I	H	N	P	F	T	S	R	C	L	Y	N	E	P	S	K	T	D	I	V	S	P	V	C	G	N	E	L	L	E	A	G	E	E	C	D	C	G	-----					
Agkistin	DRDS	--	C	T	C	D	A	S	S	C	I	M	S	A	T	V	S	N	E	P	S	--	S	R	F	S	D	C	S	L	N	Q	Y	L	S	D	I	I	H	N	P	L	A	S	Y	C	L	Y	N	E	P	S	K	T	D	I	V	S	P	P	V	C	G	N	Y	L	E	V	G	E	D	C	D	C	G	-----			
Ussurin	DENY	--	C	S	C	G	F	A	C	I	M	S	P	V	I	S	P	Q	P	S	--	K	L	F	S	D	C	S	Y	S	I	H	Y	W	T	Y	I	N	Y	--	N	P	Q	C	I	L	N	K	P	L	R	T	D	I	V	S	T	P	V	S	G	N	E	L	L	E	A	G	E	E	C	D	C	D	-----				
Atrolysin E	PTDS	--	C	S	C	G	G	Y	C	I	M	S	P	V	I	S	D	E	P	S	--	K	Y	F	S	D	C	S	Y	I	Q	C	W	E	F	I	M	N	Q	--	K	P	Q	C	I	L	K	P	L	R	T	D	I	V	S	T	P	V	S	G	N	E	L	L	E	A	G	E	E	C	D	C	G	-----					
Lebetase	DGDQ	--	C	N	C	G	A	N	C	V	M	S	V	V	L	I	E	Q	R	S	--	Y	Q	F	S	D	C	S	K	N	K	Y	Q	T	L	T	N	R	--	N	P	Q	C	I	L	N	Q	P	L	R	T	D	I	V	S	T	P	V	S	G	N	E	L	L	Q	S	G	N	P	C	C	D	-----						
Contortrostatin	DGNQ	--	C	H	C	D	A	N	S	C	I	M	S	E	E	L	R	E	Q	L	S	--	F	E	F	S	D	C	S	Q	N	O	Y	Q	T	L	T	D	H	--	N	P	Q	C	M	L	N	E	P	L	R	T	D	I	V	S	T	P	V	S	G	N	E	L	L	E	T	G	E	S	D	F	D	-----					
Acostatin B	DGNQ	--	C	H	C	D	A	N	S	C	I	M	S	E	E	L	R	E	Q	L	S	--	F	E	F	S	D	C	S	Q	N	O	Y	Q	T	L	T	D	H	--	N	P	Q	C	M	L	N	E	P	L	R	T	D	I	V	S	T	P	V	S	G	N	E	L	L	E	T	G	E	S	D	F	D	-----					
Flavoridin	DEEK	--	K	G	K	G	K	C	N	C	K	T	C	I	M	S	P	A	I	S	D	P	P	A	--	Q	L	F	S	D	C	S	K	N	D	Y	H	T	F	L	T	N	R	--	N	P	Q	C	I	L	N	A	P	L	R	T	D	I	V	S	T	P	V	S	G	N	E	F	L	E	A	G	E	E	C	D	C	G	-----
TJM 1	DDKD	--	K	--	C	K	C	E	A	C	I	M	A	P	V	I	S	D	K	Q	S	--	K	L	F	S	D	C	S	K	D	Y	Q	T	F	L	T	N	K	--	K	P	Q	C	I	L	N	A	P	L	R	T	D	I	V	S	T	P	I	S	G	N	E	F	L	E	A	G	E	E	C	D	C	G	-----				
HR2a	DDKD	--	K	--	C	K	C	E	A	C	I	M	S	A	V	I	S	D	K	P	S	--	K	L	F	S	D	C	S	K	D	Y	Q	T	F	L	T	N	S	--	K	P	Q	C	I	L	N	A	P	L	R	T	D	I	V	S	T	P	V	S	G	N	E	F	L	E	A	G	E	E	C	D	C	G	-----				
Trigramin	DEDK	--	C	N	C	N	T	C	I	M	S	K	V	L	S	R	Q	P	S	--	K	Y	F	S	D	C	S	K	D	Y	Q	T	F	L	T	N	H	--	N	P	Q	C	I	L	N	A	P	L	R	T	D	I	V	S	T	P	V	S	G	N	E	L	L	E	A	G	E	D	C	D	C	G	-----						
Jararhagin	DTGS	--	C	S	C	G	D	Y	P	C	I	M	G	P	T	I	S	N	E	P	S	--	K	F	S	D	C	S	Y	I	Q	C	W	D	F	I	M	N	H	--	N	P	E	C	I	N	E	P	L	G	T	D	I	S	P	P	V	C	G	N	E	L	L	E	V	G	E	E	C	D	C	G	-----						
Bothropasin	DTDF	--	C	S	C	G	D	Y	P	C	I	M	G	P	T	I	S	N	E	P	S	--	K	F	S	D	C	S	Y	I	Q	C	W	D	F	I	M	K	E	--	N	P	Q	C	I	L	N	E	P	L	G	T	D	I	V	S	P	P	V	C	G	N	E	L	L	E	V	G	E	E	C	D	C	G	-----				
Acurhagin	DDGY	--	C	Y	C	G	G	Y	P	C	I	M	G	P	S	I	S	P	E	P	S	--	K	F	S	D	C	S	Y	I	Q	C	W	D	F	I	M	N	H	--	N	P	E	C	I	D	N	E	P	L	G	T	D	I	S	P	P	L	C	G	N	E	L	L	E	V	G	E	E	C	D	C	G	-----					
Catro/VAP2B	DSGY	--	C	S	C	G	D	Y	A	C	I	M	R	P	E	I	S	P	E	P	S	--	T	F	S	D	C	S	Y	F	E	C	W	D	F	I	M	N	H	--	N	P	E	C	I	L	N	E	P	L	G	T	D	I	S	P	P	V	C	G	N	E	L	L	E	V	G	E	E	C	D	C	G	-----					
HR1A	DRE	--	C	T	C	H	A	N	S	C	I	M	S	A	V	I	S	D	Q	P	S	--	K	Y	F	S	D	C	S	H	V	Y	W	N	I	N	D	--	E	P	Q	C	I	L	N	E	P	L	R	T	D	I	V	S	P	P	V	C	G	N	E	L	L	E	V	G	E	E	C	D	C	G	-----						
HF3	DTGS	--	C	S	C	G	G	Y	C	I	M	A	P	E	I	S	D	Q	P	S	--	K	L	F	S	D	C	S	K	Q	A	Y	Q	R	Y	I	N	Y	--	K	P	Q	C	I	L	N	E	P	L	R	T	D	I	V	S	T	P	P	V	C	G	N	E	L	L	E	M	G	E	E	C	D	C	G	-----				
BjussuMP I	DENQ	--	C	H	C	D	A	P	S	C	V	M	A	S	V	L	S	V	V	L	S	--	Y	E	F	S	D	C	S	Q	N	O	Y	Q	T	L	T	K	H	--	N	P	Q	C	I	L	N	E	P	L	L	T	-----																										
HR1B	DGNS	--	C	T	C	G	F	P	C	I	M	S	P	M	I	S	D	P	P	S	--	K	Y	F	S	D	C	S	K	A	Y	Y	Q	T	F	L	T	D	H	--	K	P	Q	C	I	L	N	A	P	S	K	T	D	I	V	S	P	P	V	C	G	N	E	L	L	E	A	G	E	E	C	D	C	G	-----				
Atrolysin A	DENR	--	C	H	C	S	T	P	A	C	V	M	C	A	V	L	R	Q	R	P	S	--	Y	E	F	S	D	C	S	L	N	H	Y	R	T	F	I	N	Y	--	N	P	Q	C	I	L	N	E	P	L	Q	T	D	I	S	P	P	V	C	G	N	E	L	L	E	V	G	E	E	C	D	C	G	-----					
Ecarin	DTKF	--	C	T	C	G	A	K	P	C	I	M	F	G	K	E	S	I	P	P	P	--	K	E	F	S	D	C	S	Y	D	Q	N	K	Y	L	L	K	Y	--	N	P	K	C	I	L	D	P	L	R	K	D	I	A	S	P	A	V	C	G	N	E	I	W	E	E	G	E	E	C	D	C	G	-----					
VAP1	DKDT	--	C	T	C	G	T	R	P	C	V	M	A	G	A	L	S	C	E	A	S	--	K	E	F	S	D	C	S	K	D	H	R	E	F	L	I	K	N	--	M	P	Q	C	I	L	K	K	P	L	T	D	I	V	S	P	P	V	C	G	N	E	F	V	E	V	G	E	D	C	D	C	G	-----					
HV1	DKDT	--	C	T	C	R	A	K	A	C	V	M	A	G	T	L	S	C	D	A	S	--	Y	L	F	S	D	C	S	R	Q	E	H	R	A	F	L	I	K	N	--	M	P	Q	C																																		

De point de vue de la fonction, le domaine de type désintégrine pourrait avoir plusieurs rôles :

- Il amplifierait l'action des hémorragines en affectant l'agrégation des plaquettes (Takeya et *al.*, 1990).
- Il permet également l'attachement des protéinases hémorragiques sur des sites d'action particuliers (cellules endothéliales ou plaquettes), (Kamiguti et *al.*, 1998 ; Franceschi et *al.*, 2000).
- **Le domaine riche en cystéine**

Le domaine riche en cystéine peut aider à un alignement correct du domaine de type désintégrine. Ce domaine serait également impliqué dans les interactions protéine-protéine (Bjarnason et Fox, 1994 ; Jia et *al.*, 1996 ; Hati et *al.*, 1999), (Figure 3).

- **Le domaine de type lectine**

Les lectines sont des protéines ayant une masse moléculaire de 30 kDa. Ces protéines se lient sélectivement aux protéines membranaires des plaquettes ou aux facteurs de coagulation du sang.

Il semble que le domaine de type lectine interviendrait en dirigeant les métalloprotéinases hémorragiques vers les protéines impliquées dans les mécanismes de l'hémostase (Braud et *al.*, 2000).

I.3.1.2.3. Mécanisme d'action des métalloprotéinases hémorragiques

L'hémorragie est un des phénomènes physiopathologiques caractéristiques de l'envenimation vipérine. De nombreux travaux ont montré qu'il existe plusieurs voies d'action des métalloprotéinases hémorragiques induisant une hémorragie (Ownby et *al.*, 1990 ; Kamiguti et *al.*, 1998 ; Gutiérrez et *al.*, 2009a).

Les métalloprotéinases hémorragiques des venins de serpents ont comme première cible les composants protéiques de la lame basale des capillaires sanguins, tels que la laminine, la fibronectine et le collagène de type IV. Le mécanisme par lequel ces enzymes affectent les capillaires serait lié à leur pouvoir protéolytique. La dégradation de ces protéines provoque une perte de la stabilité et de l'intégrité des capillaires sanguins ayant pour conséquence une fuite de sang dans les tissus environnants (Gutiérrez et Rucavado, 2000 ; Komori et *al.*, 2001 ; Anai et *al.*, 2002 ; Moraes et Selistre-de-Araujo, 2006 ; Escalante et *al.*, 2009 ; Gomes et *al.*, 2009), (Figure 4).

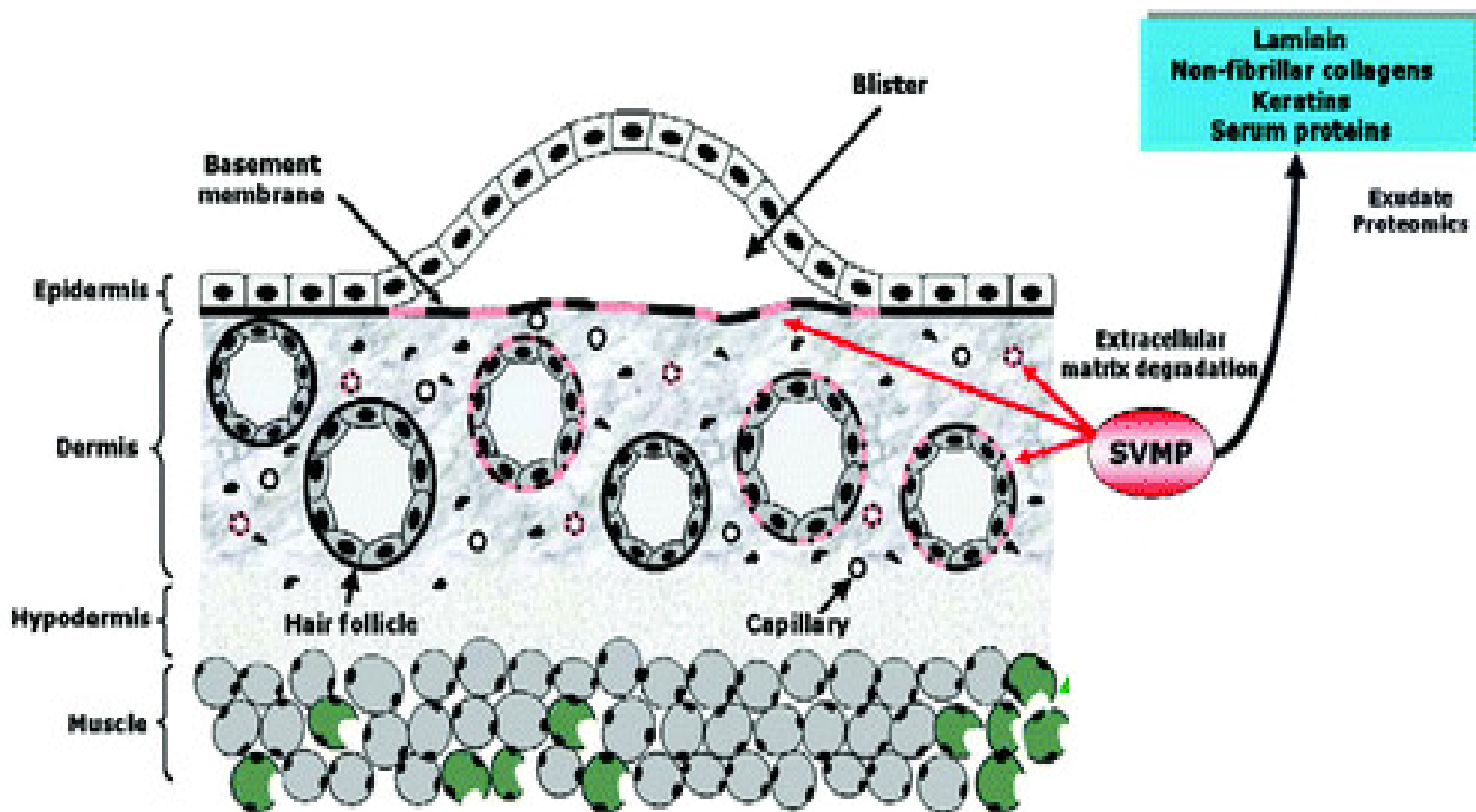


Figure 4 : Effets pathophysiologiques observées après injection de métalloprotéinases des venins de serpents (SVMP) au niveau la peau d'un modèle animal (Escalante et *al.*, 2009).

Certains auteurs suggèrent que l'hémorragie est une conséquence de l'altération morphologique et dégénérative des cellules endothéliales des capillaires sanguins. Cette destruction locale de l'endothélium capillaire conduit à l'apparition de zones de ruptures au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales à travers lesquelles le sang s'échappe (Moreira et *al.*, 1994 ; Lomonte et *al.*, 1994 ; Gutiérrez et Rucavado, 2000).

En affectant les cellules endothéliales, les molécules hémorragiques provoquent une perturbation de la perméabilité des capillaires avec apparition d'une hémorragie. Dans ce cas l'hémorragie peut se produire selon deux mécanismes :

- Un mécanisme par diapédèse dans lequel les jonctions entre les cellules endothéliales s'élargissent avec formation de vide entre les cellules. Les cellules endothéliales deviennent ainsi perméables au sang qui s'échappe vers l'espace du tissu conjonctif (érythrodiapédèse). Dans ce cas, ces cellules restent intactes (Hati et *al.*, 1999).
- Un mécanisme où l'hémorragie se produit à travers les cellules endothéliales après perturbation de leur membrane plasmique et de leur intégrité cellulaire. Des études de microscopie électronique ont révélé que dans ce mécanisme les mitochondries des cellules endothéliales sont gonflées, mais que les jonctions intercellulaires restent intactes. Dans ce mécanisme, l'hémorragie se produit à la suite d'une rupture de la membrane plasmique des cellules endothéliales, qui laisse passer ainsi le sang à travers les cellules endommagées vers le tissu environnant (Hati et *al.*, 1999 ; Gutiérrez et *al.*, 2005 ; 2009b), (Figure 5).

Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces deux types de phénomènes sont encore inconnus. Selon Moraes et Selistre-de-Araujo (2006) ; Gomes et collaborateurs (2009) et Gutiérrez et collaborateurs (2009b) c'est l'activité protéolytique des hémorragines qui en est la principale cause. Cette activité perturbe l'assemblage et l'organisation des protéines membranaires ayant pour résultat une perturbation ou une lyse des cellules endothéliales (Figure 5).

Les hémorragines isolées à partir des venins semblent avoir un mécanisme d'action différent sur les cellules endothéliales. C'est ainsi que les métalloprotéinases hémorragiques HR-1, HR-2a, HR-2b isolées à partir du venin de *Trimeresurus flavoviridis* provoquent une hémorragie par érythrodiapédèse (Hati et *al.*, 1999). Alors que les hémorragines ACL-1 isolée à partir du venin d'*Agkistrodon contortrix laticinctus*, l'atrollysine-a isolée à partir du venin de *Crotalus atrox* et la protéinase H isolée à partir du venin de *Crotalus adamanteus* provoquent une hémorragie à la suite d'une lyse des cellules endothéliales (Johnson et Ownby, 1993).

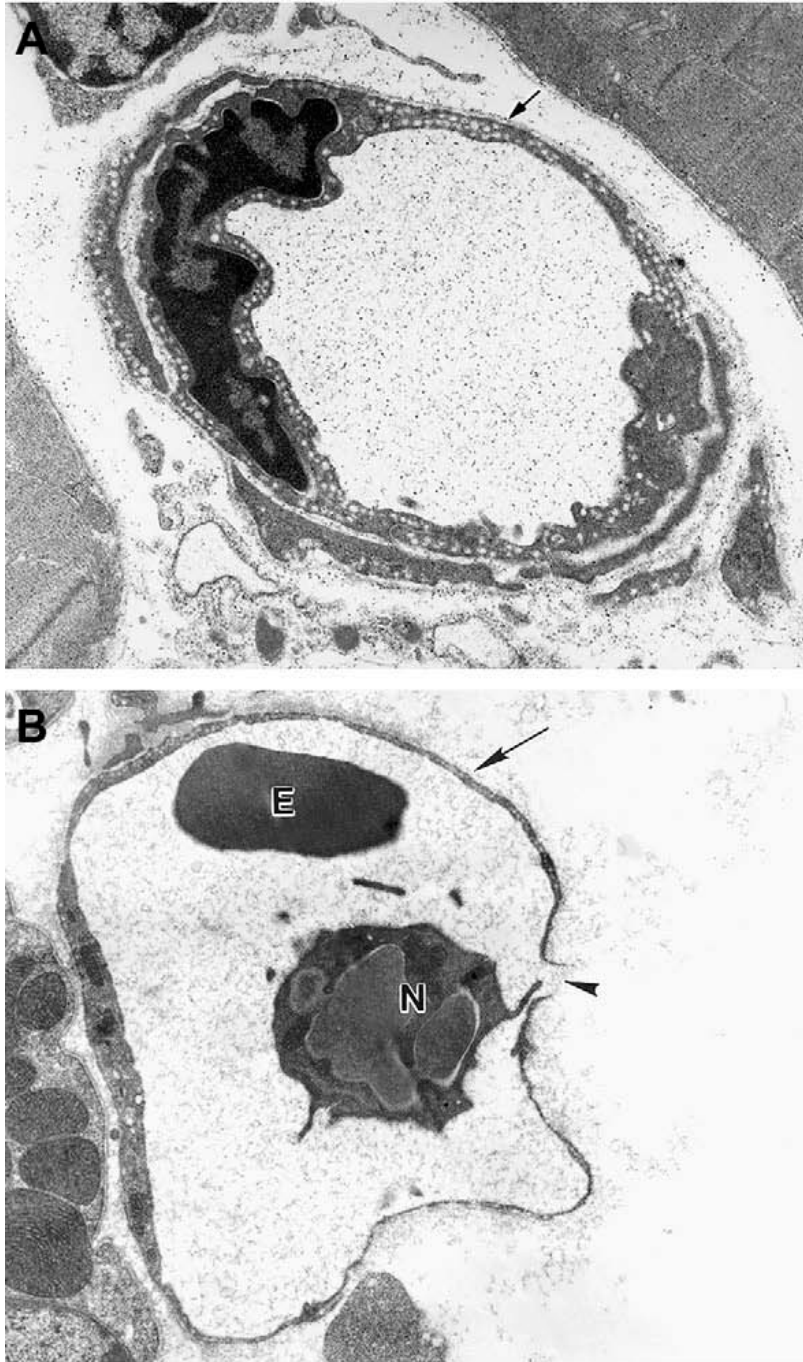


Figure 5 : Altérations ultra-structurales des capillaires sanguins dans le muscle squelettique murin, provoquées par la métalloprotéinase hémorragique BaP1 du venin de *Bothrops asper* (Gutiérrez et al., 2009b).

A : Micrographie d'un capillaire sanguin de structure normale (Témoin NaCl), (G X 17 000).

B : Micrographie d'un capillaire 5 min après injection de la toxine BaP1 (G X 10 000).

E : Erythrocyte ; **N** : polynucléotide neutrophile.

L'hémorragie induite par les effets directs des hémorragines sur la lame basale ou sur les cellules endothéliales peut être amplifiée par d'autres facteurs, notamment par :

- L'action des hémorragines sur le caillot de fibrine (activité fibrinolytique) (Bjarnason et Fox, 1994 ; Hati et *al.*, 1999), (Figure 6).
- L'inhibition de l'agrégation des plaquettes grâce au domaine de type désintégrine des hémorragines, En effet, les travaux de Maruyama et collaborateurs (1992 ; 1993) et ceux de Kamiguti et collaborateurs (1998), ont montré que l'hémorragie induite par le venin de *Bothrops jararaca* est due à l'action d'une métalloprotéinase hémorragique nommée «la jararagine». Cette protéinase hémorragique dégrade la sous unité β_1 de l'intégrine $\alpha_2 \beta_1$, qui est le récepteur du collagène situé au niveau de la membrane plasmique des plaquettes. Cependant, la reconnaissance de l'intégrine $\alpha_2 \beta_1$ par la jararagine se fait à l'aide de son domaine de type désintégrine et du domaine riche en cystéine, par contre la protéolyse se fait par le domaine métalloprotéinase (Figure 6).
- L'action des composants non hémorragiques des venins de serpents, tels que les molécules fibrinolytiques qui rendent le sang incoagulable, les molécules qui activent le plasminogène, ainsi que les composants qui inhibent l'agrégation des plaquettes et qui provoquent ainsi une perturbation de la coagulation du sang (Bjarnason et Fox, 1994 ; Markland, 1998 ; White, 2005), (Figure 6).

I.3.1.3. Les phospholipases A₂ (E.C.3.1.1.4)

A l'origine, les phospholipases A₂ (PLA₂) ont été identifiées comme des enzymes particulièrement abondantes dans les venins de serpents et le suc pancréatique où elles jouent un rôle digestif, doublé d'un rôle toxique dans le premier cas (Andereimar et *al.*, 2003). Cependant, l'intérêt biologique de ces enzymes repose sur leur implication directe dans la régulation de la biosynthèse de médiateurs lipidiques.

Les PLA₂ de venins de serpents représentent plus de 10 % de leur poids sec. Une étude comparative des venins de serpents a révélé une activité phospholipasique très importante dans les venins de *Viperidae* (Mebs, 1970; Komori et *al.*, 1990).

Les PLA₂ de venins de serpents sont des enzymes de 120 à 130 acides aminés dont la masse est d'environ 14 kDa, elles comptent parmi les constituants les plus pharmacologiquement actifs et toxiques du venin (John et *al.*, 1996 ; Fry, 1999).

En présence du calcium, la phospholipase A₂ (PLA₂) hydrolyse spécifiquement la liaison acyl-ester située en position sn-2 des 1,2 diacyl-sn-3-phosphoglycérides et libère des lysophospholipides ainsi que des acides gras en particulier l'acide arachidonique. Ce dernier est impliqué dans le processus inflammatoire (Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1990 ; Vandenberg et *al.*, 1995 ; Markland, 1998 ; Andriao-Escarso et *al.*, 2000).

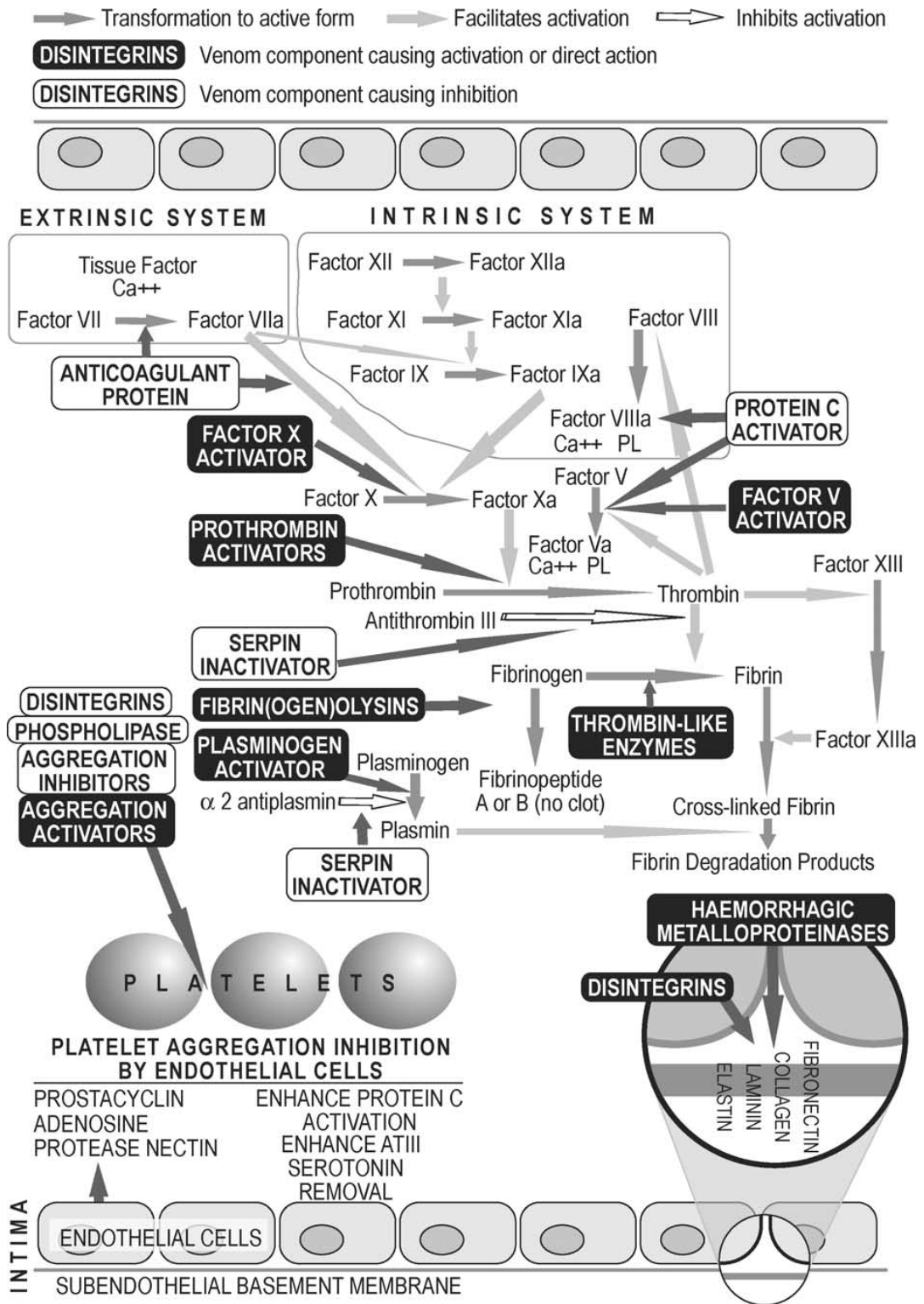


Figure 6 : Effets des biomolécules des venins de serpents sur la cascade de la coagulation sanguins (White, 2005).

Les PLA₂ des venins de serpents exercent un effet cytolitique sur les globules rouges en affectant l'intégrité de la membrane plasmique de ces cellules après l'hydrolyse des phospholipides. Les lysophospholipides ainsi libérés déstabilisent la bicouche lipidique de la membrane plasmique et provoquent ainsi la lyse des globules rouges (Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1990 ; Chen et *al.*, 1994).

Une phospholipase de type A₂ a été isolée à partir du venin de *Cerastes cerastes*, elle présente un PM de 14,5 kDa et un pHi de 5,4, agit sur la lécithine et libère la lysolécithine hémolytique qui provoque la lyse des globules rouges après hydrolyse des phospholipides membranaires (Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1990).

Les PLA₂ sont classées en quatre groupes : le premier groupe comprend les PLA₂ des venins des *Elapidae* et des *hydrophidae*, le deuxième groupe comprend les PLA₂ des *Crotalidae* et des *Viperidae* (Six et Dennis, 2000 ; Valentin et Lambeau, 2000). Les PLA₂ du troisième groupe sont retrouvées dans les venins d'abeilles, de poissons, de scorpions et de lézards. Le quatrième groupe, par contre, n'est constitué que d'une unique PLA₂ : la Conidine, retrouvée dans le venin des cônes (*conus magus*) (Valentin et Lambeau, 2000), (Tableau IV).

Récemment, une nouvelle classification des PLA₂ a été proposée, en fonction des homologies de séquence en acides aminés, du nombre de ponts disulfures et de la localisation des PLA₂. Elles sont subdivisées en onze groupes distincts. Les PLA₂ de venins de serpents appartiennent au groupe IA pour les *Elapidae* et les *Hydrophidae* et au groupe IIA pour les *Viperidae* et les *Crotalidae* (Dufton et Hider, 1983 ; Gambero et *al.*, 2004).

Les PLA₂ des venins de *Viperidae* comptent parmi les constituants les plus pharmacologiquement actifs et toxiques du venin. Elles induisent divers effets biologiques, telles que l'hémolyse, la myotoxicité, la cytotoxicité, la neurotoxicité, la cardiotoxicité, l'anticoagulation, la formation d'œdème (Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1990 ; Laing et *al.*, 1995 ; Markland, 1998 ; Krizaj et Gubensek, 2000 ; Araya et Lomonte, 2007 ; Costa et *al.*, 2008 ; Zouari-Kessentini et *al.*, 2009).

Tous ces effets pharmacologiques pourraient être retrouvés dans les isoenzymes d'une même espèce. Cinq isoenzymes de PLA₂ ont été isolées du venin de *Trimeresurus flavoviridis* et elles reproduisent la plupart de ces effets (Ishimaru et *al.*, 1980 ; Liu et *al.*, 1990 et Yamaguchi et *al.*, 2001). Chijiwa et ses collaborateurs (2003), ont purifié à partir de ce même venin le sixième isoenzyme PLA₂ neuro et myotoxique. C'est une PLA₂ basique avec un pHi de 10,3, appelée PLA-N, qui induit une activité apoptotique à l'égard des cellules cancéreuses.

Dans la plupart des cas, les PLA₂ des venins de serpents exercent leur activités pharmacologiques indépendamment des autres constituants du venin, c'est le cas de la notexine du venin de *Notechis scutatus scutatus* et l'ammodytoxine du venin de *Vipera ammodytes*. Certains de ces effets pharmacologiques des PLA₂ sont potentialisés lorsque celle-ci sont complexées à d'autres facteurs protéiques. C'est le cas de la β -bungarotoxine isolée à partir du venin de *Bungarus multicinctus*, dont la séquence de base de 120 résidus d'acides aminés est reliée par un pont disulfure à une protéine de 59 résidus d'acides aminés (Kini et Evans, 1989).

Tableau IV : Classification des PLA₂ (Faure, 2000 ; Valentin et Lambeau, 2000).

Groupe des PLA₂	PM	Résidus d'AA	Ponts S-S	Origine venin
I	14-15 kDa	120	07	<i>Elapidae</i> et <i>Hydrophiidae</i>
II	14-15 kDa	125 + 5 à 7 en C-terminale	07	<i>Viperidae</i> et <i>Crotalidae</i>
III	16-18 kDa	130 à 136	05 à 06	abeilles, lézards et scorpions
IV	13,6 kDa	Deux chaînes polypeptidiques de 77 et 42	06	<i>Conus magus</i>

Le rôle de ces protéines associées n'est pas bien établi. Elles sont considérées comme un chaperon, qui faciliterait la liaison de la PLA₂ à son site de fixation au niveau des cellules cibles (Valentin et Lambeau, 2000 ; Kini, 2003).

I.3.1.4. Les hyaluronidases (E.C.4.2.9.3.5)

Les venins de serpents contiennent des hyaluronidases qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques de certains mucopolysaccharides du tissu conjonctif d'animaux, tels que l'acide hyaluronique et le sulfate de chondroïtine. Elles facilitent ainsi la diffusion des toxines dans les tissus, induisant la destruction locale des capillaires et provoquant une nécrose tissulaire (Audebert, 1993 ; Ernest et Zug, 1999).

I.3.1.5. Les L-amino-acide oxydases (E.C.1.4.3.2)

Ces enzymes catalysent la transformation d'un L-acide aminé en acide α -cétonique. Elles possèdent un groupement flavine qui confère aux venins la coloration jaune caractéristique de certaines espèces (Audebert, 1993).

La fonction biologique des L-amino-acide oxydases n'est pas encore élucidée. Certains auteurs l'associent à la fonction digestive alors que d'autres l'associent à une propriété anti-bactérienne (Laraba-Djebari, 1996). Tõnismägi et ses collaborateurs (2006) ont isolé une L-amino-acide oxydase à partir du venin de *Vipera lebetina* de masse moléculaire 140 kDa, induisant l'agrégation des plaquettes et présentant une activité bactéricide sur *Escherichia coli* et sur *Bacillus subtilis*.

I.3.1.6. Les acétylcholinestérases (E.C.3.1.1.7)

L'activité acétylcholinestérase a été mise en évidence dans les venins d'*Elapidae* et d'*Hydrophidae*, elle est cependant inexistante dans ceux de *Viperidae*. Ces enzymes se présentent sous forme de monomères solubles, formés d'un très court peptide, qui catalysent l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et en céto-acide (Cousin et Bon, 1999).

I.3.2. Les toxines des venins de serpents

I.3.2.1. Les neurotoxines

Les neurotoxines des venins de serpents agissent principalement sur les jonctions neuro-musculaires a pour conséquence une paralysie des muscles et de l'appareil respiratoire (Harris, 1989).

Les neurotoxines sont divisées en deux types : les neurotoxines pré-synaptiques et post-synaptiques. Ces toxines sont présentes surtout dans les venins des *Eapidae* et des *Hydrophidae* (Menez, 1993 ; Laraba-Djebari, 1996 ; Ariaratnam et al., 1999).

- Les neurotoxines pré-synaptiques

Les neurotoxines pré-synaptiques sont douées d'une activité phospholipasique de type A₂ ayant une toxicité élevée (les DL50 sont comprises entre 0,05 μ g et 10 μ g/ 20 g de souris). Elles agissent sur les membranes présynaptiques qui perdent leur capacité à libérer l'acétylcholine au niveau de la fente synaptique, provoquant ainsi un arrêt de la

transmission neuro-musculaire, qui est suivie d'une paralysie des muscles et du diaphragme (Harris, 1989 ; Dixon et Harris, 1999).

- Les neurotoxines post-synaptiques

Les neurotoxines post-synaptiques sont dépourvues d'activité enzymatique. Elles se fixent de manière stable au niveau du récepteur nicotinique de l'acétylcholine situé au niveau de la membrane post-synaptique de la jonction neuromusculaire. Cette fixation entraîne l'inhibition de la dépolarisation induite par l'acétylcholine et donc le passage de l'influx nerveux au niveau de la jonction neuromusculaire. Leur action se traduit par une paralysie flasque, les toxines les mieux connues sont appelées les neurotoxines post-synaptiques curarisantes.

I.3.2.2. Les cardiotoxines

Ce sont des polypeptides de 60 à 62 résidus acides aminés réticulés par quatre ponts disulfures. Ces toxines affectent l'intégrité et la perméabilité d'un grand nombre de cellules en provoquant leur lyse, d'où le nom de cytotoxines. Bien qu'elles soient peu toxiques (DL50 = 1 mg/kg), ces cardiotoxines causent de sévères contractions du muscle cardiaque, pouvant entraîner un arrêt cardiaque et une mort rapide (Abdalla et *al.*, 1992). Elles peuvent également provoquer la lyse des hématies, ainsi que des nécroses musculaires.

I.3.2.3. Les myotoxines

La myonécrose consécutive à une morsure de serpent est un phénomène complexe. Elle peut être la conséquence de l'action directe de facteurs spécifiques appelés "myotoxines" ou être le résultat des conditions ischémiques provoqués par les protéinases hémorragiques des venins de serpents (Gutiérrez et *al.*, 1984; Chakrabarty et *al.*, 2000 ; Salvini et *al.*, 2001 ; Gutiérrez et *al.*, 2009a).

De nombreuses myotoxines ont été isolées à partir de venins de serpents, elles possèdent une action toxique qui endommage le muscle. Ces toxines sont soit de nature enzymatique (phospholipases de type A₂), soit des polypeptides de 42 à 50 résidus d'acides aminés complètement dépourvus d'activité enzymatique (Tableau V), (Kini et Evans, 1989 ; Angulo et *al.*, 2001 ; Calgarotto et *al.*, 2008).

I.3.2.3.1. Classification des myotoxines

Les myotoxines sont divisées en deux groupes. Le premier groupe comprend les peptides myotoxiques et le second est formé par les PLA₂ myotoxiques (Cintra et *al.*, 1993 ; Angulo et *al.*, 2001).

- Les peptides myotoxiques

Les peptides myotoxiques sont constitués de 42 à 52 résidus d'acides aminés, stabilisés par trois ponts disulfures. Ces peptides sont dépourvus d'activité enzymatique.

Tableau V : Différentes myotoxines isolées à partir des venins de serpents.

Genre & espèce	Nom de la toxine	PM	Activité PLA₂	Références
<i>Bothrops asper</i>	Myotoxine-I	10,700	(+)	Gutiérrez et al., (1984)
	Myotoxine-II	13,300	(-)	
	Myotoxine-III	13,900	(+)	Gutiérrez et Lomonte, (1995)
	Myotoxine-IV	15,500	(-)	
<i>Bothrops atrox</i>	Myotoxine-I	13,500	(+)	Lomonte et al., (1990)
	Myotoxine-II	13,500	(+)	
	Myotoxine-III	13,500	(+)	
<i>Bothrops moojeni</i>	Myotoxine-I	13,400	(-)	Lomonte et al., (1990)
	Myotoxine-II	13,400	(-)	
<i>Crotalus viridis viridis</i>	Myotoxine a Viriditoxine	-	(-)	Ownby et al., (1982) Ownby et al., (1990)
		-	(-)	
<i>Lachesis muta</i>	L-M PLA ₂	-	(+)	Fuly et al., (2000)
<i>Vipera aspis aspis</i>	PLA ₂ -I	30,200	(+)	Komori et al., (1990)
	PLA ₂ -II	16,000	(+)	
	PLA ₂ -III	13,500	(+)	
<i>Vipera lebetina</i>	Mlp4.2	22,600	(-)	Hamza et al., (2010b)
<i>Vipera russelli</i>	VRV PL-VIIIa	11,800	(+)	Kasturi et Gowda, (1989)

(+) : Présence ; (-) : Absence.

L'activité des peptides myotoxiques telles que la crotamine du venin de *Crotalus durissus terrificus* et de la myotoxine-a du venin de *Crotalus viridis viridis* semble être liée à la présence à l'extrémité C-terminale de ces molécules de deux séquences peptidiques qui se suivent. La première séquence cationique est riche en acides aminés chargés positivement. La deuxième séquence est riche en acides aminés hydrophobes. Les séquences cationique et hydrophobes sont reliées par trois à quatre ponts disulfures (Kini et Evans, 1989 ; Angulo et al., 2001).

Il semblerait donc que ces deux séquences soient indispensables à l'expression de l'activité myotoxique de ces peptides.

- Les PLA₂ myotoxiques

Les PLA₂ myotoxiques sont les principaux facteurs responsables de la myotoxicité des venins de serpents. Ces myotoxines peuvent être douées d'une activité phospholipasique ou en être dépourvues (Johnson et Ownby, 1993 ; Fuly et al., 2000).

L'activité catalytique des PLA₂ myotoxiques est Ca²⁺ dépendante. La fixation du calcium se fait dans le domaine comprenant les résidus 26-34 et 49 (Figure 7). Les résidus Tyr 28, Gly 31, Gly 32 et Asp 49 sont obligatoirement requis pour la fixation du calcium en cédant un atome d'oxygène. Ces quatre sites sont conservés dans les Asp49 PLA₂ myotoxiques des venins de serpents, les dotant d'une activité catalytique élevée.

Les phospholipases A₂ myotoxiques possèdent au niveau du site catalytique des résidus très conservés His 48, **Asp 49** et Tyr 52 (Six et Dennis, 2000 ; Calgarotto et al., 2008 ; Angulo et Lomonte, 2009), (Figure 8). C'est le cas de la myotoxine LM-PLA₂ purifiée à partir du venin de *Lachesis muta* (Fuly et al., 2000), de la myotoxine BmTX-I isolée à partir du venin de *Bothrops moojeni* (Calgarotto et al., 2008) et de la myotoxine MTX-I purifiée à partir du venin de *Bothrops brazili* (Costa et al., 2008), (Figure 7).

Les PLA₂ myotoxiques dépourvues d'activité phospholipasique, après substitution de leur résidu Asp 49, possèdent les mêmes résidus du site catalytique (His 48 et Tyr 52), (Figures 7 et 8). Le résidu Asp 49 de ces molécules est substitué soit par :

- Une lysine (His 48, **Lys 49** et Tyr 52) dans la plupart des cas. C'est le cas de la myotoxine II (Basp-II) isolée du venin de *Bothrops asper* (Lomonte et al., 1994 ; Angulo et al., 2001 ; Murakami et Arni, 2003), de la myotoxine BthTx-I du venin de *Bothrops jararacussu* (Bonfim et al., 2008), (Figure 8).

- Une serine (His 48, **Ser 49** et Tyr 52), c'est le cas de l'ammodytine L isolée à partir du venin de *Vipera ammodytes* (Incerpi et al., 1995).

- Une asparagine (His 48, **Asn 49** et Tyr 52), c'est la cas de la PLA₂ purifiée à partir du venin de *Trimeresurus stejnegeri* (Tsai et al., 2004).

- Une arginine (His 48, **Arg 49** et Tyr 52), c'est le cas de la zhaermiotoxine isolée à partir du venin de *Zhaeremia mangshanensis* (Murakami et al., 2008).

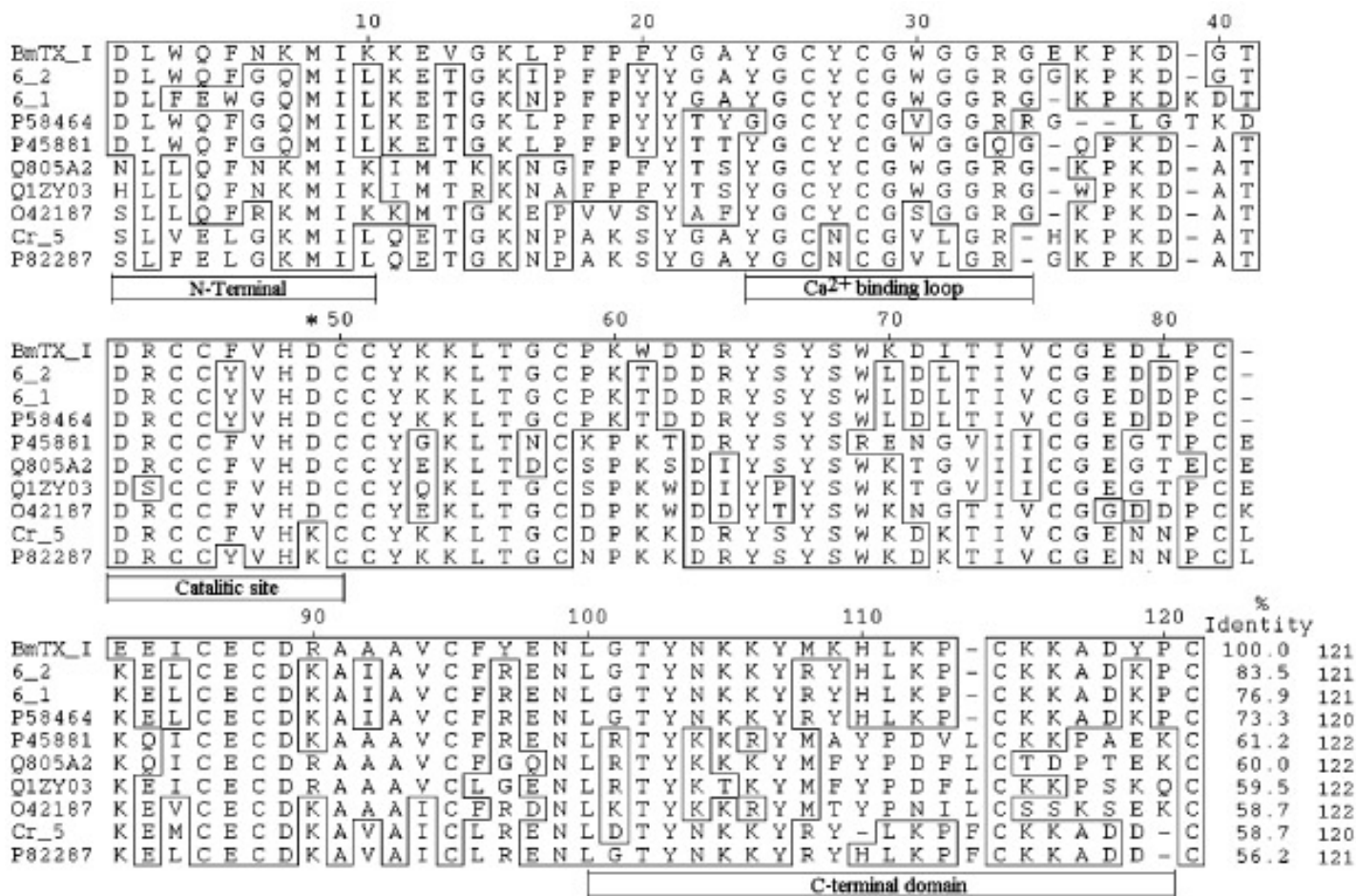


Figure 7 : Alignement de la séquence nucléotidique de la PLA₂ myotoxique isolée à partir du venin de *Bothrops moojeni* (**BmTX-I**) avec d'autres homologues de PLA₂ myotoxiques des venins de serpents purifiées (Calgarotto et al., 2008).

6_2, 6_1 et **P45881** : PLA₂ isolées à partir du venin de *Bothrops jararacussu* ; **P58464** et **P82287** : PLA₂ purifiées à partir du venin de *Bothrops pirajai* ; **Q805A2, Q1ZY03, Q42187** et **Cr_5** : PLA₂ isolées à partir des venins de *Trimeresurus flavoviridis*, *Deinagkistrodon acutus*, *Agkistrodon halys pallas* et *Calloselasma rhodostoma* respectivement.

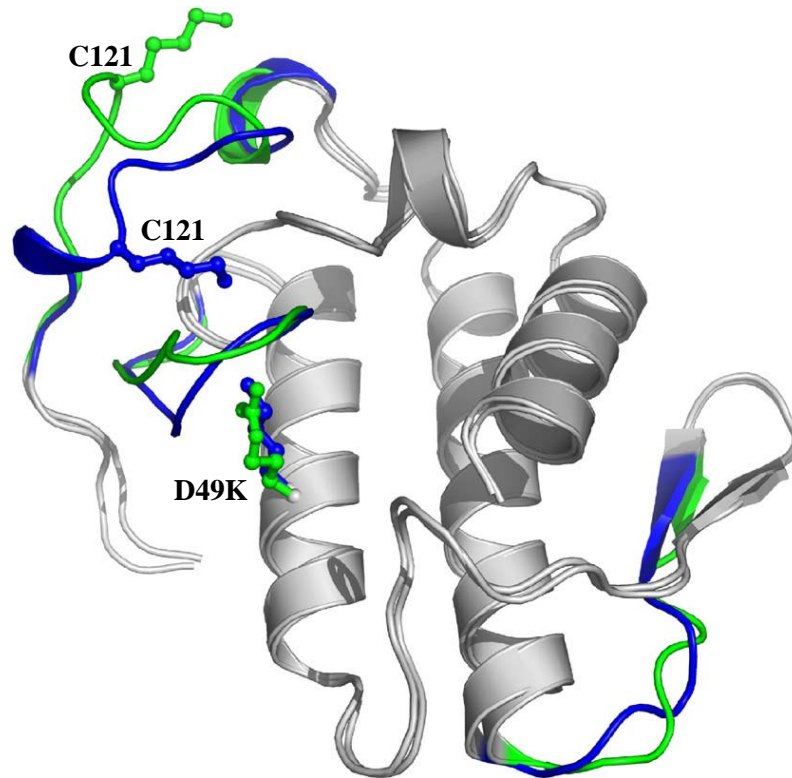


Figure 8 : Superpositionnement de la structure tridimensionnelle de deux PLA₂ myotoxiques (Murakami et Arni, 2003).

Les régions de conformation variable sont en vert (BmTX-I, Asp49 PLA₂ myotoxique purifiée à partir du venin de *Bothrops moojeni*) et en blue (Basp-II, Lys49 PLA₂ myotoxique isolée à partir du venin de *Bothrops asper*).

La substitution du résidu aspartate par un autre résidu réduit de façon considérable l'activité catalytique de l'enzyme, suggérant que la longueur et la charge de cette partie de la structure de l'enzyme sont déterminants pour la fixation du calcium. Ce type de PLA₂ conserve cependant leur activité myotoxique (Six et Dennis, 2000 ; Angulo et *al.*, 2001 ; Angulo et Lomonte, 2009).

L'apparition des dommages musculaires même en l'absence de l'activité phospholipasique montre d'une part, que le domaine catalytique de la PLA₂ est séparé des domaines responsables de ces autres activités biologiques, notamment de son activité myotoxique et d'autre part, que les lysine 49 ou serine 49 phospholipase A₂ myotoxiques perturbent le tissu musculaire par un mécanisme indépendant de l'hydrolyse enzymatique des phospholipides membranaires (Lomonte et *al.*, 1994 ; Fuly et *al.*, 2000).

L'analyse de la séquence peptidique de PLA₂ myotoxiques (caudoxine, taïpoxine) et de PLA₂ non myotoxique (β -bungarotoxine) a montré que :

- La caudoxine douée à la fois des propriétés myotoxiques et présynaptiques possède les deux séquences cationique et hydrophobe (Kini et Evans, 1989).

- La taïpoxine fortement présynaptique mais faiblement myotoxique ne contient que quelques résidus chargés positivement dans la séquence cationique, ce qui expliquerait sa faible myotoxicité (Kini et Evans, 1989).

- La β -bungarotoxine, toxine présynaptique et non myotoxique ne possède pas le site cationique, d'où l'absence de toute activité myotoxique (Kini et Evans, 1989).

Par ailleurs, la comparaison entre la séquence primaire des peptides myotoxiques et des PLA₂ myotoxiques montre que la région formée par la combinaison de résidus d'acides aminés cationiques et hydrophobes se retrouvent dans les deux types de myotoxines (Kini et Evans, 1989). La présence de ces séquences semble donc être une caractéristique structurale commune des molécules douées d'une activité myotoxique (Six et Dennis, 2000 ; Angulo et *al.*, 2001).

I.3.2.3.2. Mode d'action des myotoxines

Les myotoxines purifiées à partir des venins de serpents, en particulier ceux de *Viperidae* et de *Crotalidae* induisent des contractions des muscles squelettiques ainsi que des nécroses locales suivies par une myoglobinurie. Elles interviennent sur la perméabilité des membranes des cellules musculaires (Ownby et *al.*, 1982 ; Fry, 1999 ; Soares et *al.*, 2000), (Figure 9).

Le mécanisme moléculaire par lequel les myotoxines (polypeptides et PLA₂ myotoxiques) provoquent la nécrose et la mort des cellules musculaires n'est pas encore bien élucidé. Il semblerait que ces toxines perturbent principalement la perméabilité membranaire de ces cellules. Dans un premier temps, les myotoxines se lient à la membrane des fibres musculaires grâce à leur séquence cationique. La fixation des myotoxines sur la membrane plasmique des cellules musculaires fait intervenir des interactions entre les charges positives de la séquence cationique et les groupements chargés négativement situés sur la membrane plasmique. Ces groupements semblent être

les ions phosphate des phospholipides membranaires (Gutiérrez et Lomonte, 1995 ; Montecucco et *al.*, 2008).

Après l'étape de fixation, les myotoxines s'insèrent dans la bicouche lipidique par le biais de leur séquence hydrophobe. Cette insertion de la séquence hydrophobe déstabilise la membrane plasmique et provoque une perturbation de la perméabilité membranaire aux ions et aux macromolécules (Gutiérrez et Lomonte, 1995 ; Sauviat et *al.*, 2000). Cette perturbation serait à l'origine d'une série d'événements pouvant mener à la nécrose cellulaire (Figure 9).

La perturbation de la perméabilité membranaire entraîne également un flux important de calcium à travers la membrane. Ce flux serait responsable de l'hypercontraction des myofilaments (adoptant ainsi un aspect condensé) et de la lyse des fibres musculaires par activation des protéases calcium-dépendantes et des phospholipases (Gutiérrez et *al.*, 1984 ; Montecucco et *al.*, 2008), (Figure 9).

Les travaux de Selistre et ses collaborateurs (1990) ont montré que les PLA₂ myotoxiques isolées à partir du venin de *Bothrops asper* affectent l'intégrité du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique du lapin et inhibe la Ca²⁺-ATPase, ce qui contribuerait à la mort cellulaire.

Un autre mécanisme a été proposé afin d'expliquer l'action des PLA₂ myotoxiques sur le tissu musculaire. Dans ce cas, les PLA₂ myotoxiques pénétreraient dans les cellules musculaires par un phénomène d'endocytose probablement grâce à des récepteurs membranaires présents à la surface des cellules musculaires. Ces myotoxines seraient ensuite libérées dans le cytosol et seraient ainsi capables d'altérer la membrane des mitochondries et du réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires (Sauviat et *al.*, 2000 ; Montecucco et *al.*, 2008), (Figure 9).

De nombreux travaux (Gutiérrez et *al.*, 1984; Chakrabarty et *al.*, 2000 ; Salvini et *al.*, 2001), ont montré que la myonécrose peut être le résultat des conditions ischémiques induites par les métalloprotéinases hémorragiques après envenimation expérimentale de la souris par voie intramusculaire. Ceci a été également démontré par Ownby et ses collaborateurs (1990) qui ont mis en évidence la capacité de la protéinase hémorragique « la viriditoxine », purifiée à partir du venin de *Crotalus viridis viridis*, à provoquer la myonécrose 12 heures après son injection. Par contre dans le cas de certaines toxines, telle que « la bilitoxine » du venin d'*Agkistrodon bilineatus bilineatus*, la myonécrose résulte de l'effet direct de cette toxine, puisque les cellules musculaires sont altérées durant les 30 premières minutes qui suivent l'injection et ceci avant que l'hémorragie ne puisse mener à des conditions ischémiques dans le tissu (Ownby et *al.*, 1990).

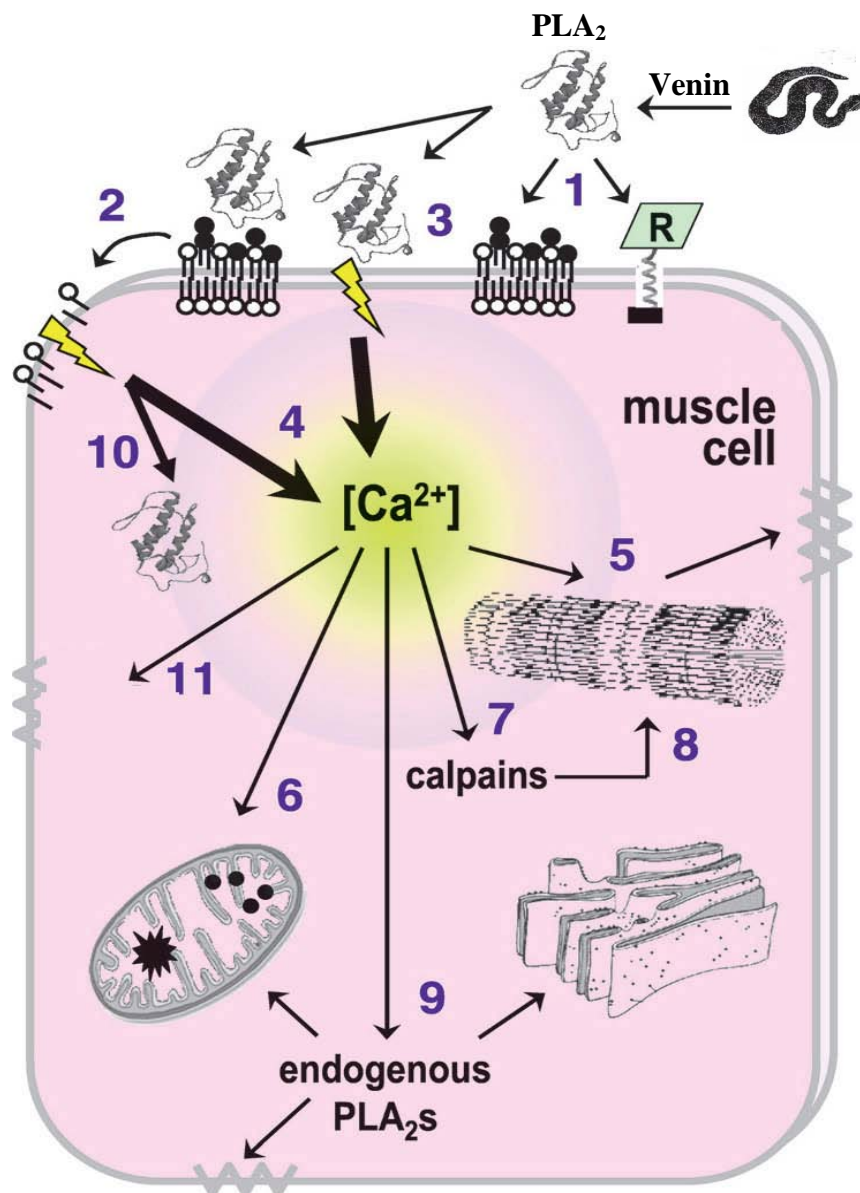


Figure 9 : Mécanisme d'action des PLA₂ myotoxiques lors d'une envenimation ophidienne (Montecucco et *al.*, 2008).

1. Pénétration des PLA₂ myotoxiques dans les cellules musculaires soit grâce à des récepteurs membranaires ou bien grâce à la séquence hydrophobe. 2 et 3. Perte de la perméabilité membranaire aux ions et aux macromolécules. 4. Influx incontrôlé du Ca²⁺ 5. hypercontraction des myofilaments. 6. Dilatation et vacuolisation des mitochondries. 7. Activation des protéases Ca²⁺-dépendantes (calpains). 8. Dégradation des composants du cytosquelette. 9. Libération des PLA₂ endogènes, qui seraient capables d'altérer la membrane des mitochondries, du réticulum sarcoplasmique et la membrane plasmique. 10 et 11. Lyse de la membrane plasmique des cellules musculaires et entrée d'autres PLA₂ myotoxiques.

Les travaux de Ownby et collaborateurs (1985 et 1990), ainsi que ceux de Gutiérrez et Rucavado, (2000) suggèrent que la myonécrose provoquée par une morsure de serpent est un phénomène très complexe. Elle peut résulter d'une action directe des myotoxines (les PLA₂s myotoxiques) sur les membranes plasmiques des cellules musculaires, ou bien serait une conséquence des conditions ischémiques induites par les métalloprotéinases hémorragiques.

I.4. Traitement des envenimations vipérines

Les morsures de serpents sont caractérisées par une série complexe de perturbations physiopathologiques locales et systémiques, incluant les inflammations extensives évoluant vers la nécrose ou la gangrène, des troubles hémorragiques sous la forme d'une hémorragie locale ou diffuse, une défibrinogénation, des troubles rénaux, un choc cardiovasculaire et éventuellement la mort de la victime (Chippaux, 1996 ; Gutierrez et al., 1998 ; Larréché et al., 2008 ; Gutiérrez et al., 2009a).

Le traitement des envenimations repose essentiellement sur la sérothérapie antivenimeuse, capable de neutraliser l'action des toxines présentes dans les venins et d'empêcher l'évolution des complications locales et systémiques de l'envenimation.

I.4.1. Immunothérapie

L'immunothérapie antivenimeuse reste le moyen le plus approprié pour combattre les envenimations vipérines. Les anti-venins sont préparés après hyper-immunisation d'animaux, ils peuvent être monovalents, lorsque l'animal est immunisé contre un seul venin, ou polyvalents contre un mélange de venins provenant des principales espèces venimeuses connues dans une région (Espino-Solis et al., 2001 ; Chippaux et al., 2007). L'utilisation d'une préparation d'immunoglobulines purifiées ou le plus souvent de fragments F(ab')₂ résultant de la digestion d'immunoglobulines par la pepsine est efficace. Ces fragments sont plus diffusibles dans les compartiments tissulaires et plus efficaces que les immunoglobulines entières (Morais et Massaldi, 2005 ; Chippaux et al., 2007).

L'efficacité de l'immunothérapie dépend de sa spécificité par rapport au venin, son pouvoir neutralisant et la voie d'injection. En effet, peu d'études ont été réalisées pour établir de manière précise la conduite à tenir face à une envenimation. La dose et le mode d'injection (Intraveineuse ou intramusculaire) de l'anti-venin sont des points pour lesquels il n'y a pas de règles établies et qui restent trop souvent à l'appréciation du praticien.

En raison de la toxicité élevée des venins de serpents, les animaux producteurs d'anti-venins subissent les effets létaux des composants toxiques du venin et développent à long terme des pathologies chroniques. Ces pathologies réduisent l'efficacité du système immunitaire et les anticorps produits perdent leur efficacité à neutraliser la toxicité du venin.

I.4.2. Détoxification des venins de serpents

Les sérums antivenimeux sont obtenus après immunisation d'animaux qui sont souvent fortement agressés par la toxicité du venin. Plusieurs techniques de détoxification du venin ont été utilisées. Parmi ces techniques, la fixation à la carboxyméthyl-cellulose, l'exposition aux rayons X, le traitement avec le glutaraldéhyde et à l'iode. La plupart de

ces techniques se sont avérées inefficaces, car elles nécessitent souvent l'addition de groupements exogènes aux protéines du venin. Ces groupements chimiques sont notamment responsables d'une synthèse d'anticorps non spécifiques aux composants antigéniques du venin. Cependant, l'irradiation gamma a été appliquée, avec succès, pour atténuer la toxicité et maintenir l'immunogénicité des venins de plusieurs espèces de serpents, tels que, *Bothrops jararacussu*, *Crotalus durissus terrificus*, *Naja naja* et *Cerastes cerastes* (Hati et al., 1990 ; Nascimento et al., 1996 ; Clissa et al., 1999 ; Spencer, 2000 ; Abib et Laraba-Djebari, 2003 ; Oussedik-Oumehdi et Laraba- Djebari, 2008 ; Oliveira et al., 2009 ; Baptista et al., 2010).

I.5. Les rayonnements ionisants gamma

Les rayonnements gamma, de nature électromagnétique, sont indirectement ionisants. Ils sont issus de la décomposition d'atomes radioactifs tels que :

-**Le Cobalt 60 (⁶⁰Co)**, dont les énergies sont de 1,17 MeV et 1,33 MeV avec une demi-vie de 5,26 ans.

-**Le Césium 137 (¹³⁷Cs)**, dont l'énergie est de 0,66 MeV avec une demi-vie de 30 ans.

L'énergie de ces rayonnements se libère au cours des transitions du noyau d'un état excité à un état fondamental ou moins excité, ils ont un excellent pouvoir pénétrant qui peut atteindre plusieurs dizaines de centimètres (Bourgeois et al., 1990).

I.5.1. La dose absorbée

Les radiations émises sont absorbées par la matière qu'elles traversent et elles en ressortent atténuées. Chaque kilogramme (kg) de matière absorbe une quantité d'énergie (Joule). Cette unité J/kg est utilisée pour mesurer la dose d'irradiation absorbée. En radioprotection, cette unité est appelée Gray (Gy). Le contrôle de la dose d'irradiation absorbée est d'une importance capitale dans l'efficacité biologique de l'irradiation ionisante gamma (Slatter, 1990).

$$1 \text{ J/Kg} = 1 \text{ Gy} = 10^2 \text{ Rad.}$$

I.5.2. Le débit de dose absorbé

Le débit de dose absorbé correspond à la dose absorbée reçue par unité de temps. Il est exprimée en Gy/h (Bertin, 1987).

I.5.3. Effet des rayonnements ionisants gamma sur les protéines

Les protéines irradiées à l'état sec ou en solution subissent des modifications chimiques et physicochimiques qui peuvent altérer leur structure primaire, secondaire et tertiaire (Skalka et Antoni, 1970 ; Chapelier et al., 2001 ; Oliveira et al., 2009), ainsi que leurs propriétés fonctionnelles (de la Hoz et Netto, 2007). En général, l'irradiation entraîne des changements irréversibles à l'échelle moléculaire par rupture de liaisons covalentes des chaînes polypeptidiques (Moon et Song, 2001).

Une étude récente réalisée sur la β -lactoglobuline montre que l'irradiation de cette protéine en solution aqueuse provoque des changements de conformation au niveau des structures secondaire et tertiaire, induisant l'agrégation des protéines via des liaisons bityrosyl. A l'état sec, ces changements ne sont pas significatifs et nécessitent une forte dose d'irradiation (Oliveira et *al.*, 2007).

Moon et Song (2001) ont montré que l'irradiation de l'ovalbumine et l'ovomucoïde en solution au Cobalt-60 altère leurs structures secondaires et tertiaires par fragmentation et agrégation des chaînes polypeptidiques due aux radicaux libres et aux produits moléculaires générés. De même, les profils électrophorétiques de l'ovalbumine et l'ovomucoïde sont modifiés.

I.5.3.1. Action directe

L'action directe des rayonnements gamma a lieu lorsque les protéines irradiées sont à l'état sec, la radiolyse des protéines résulte de l'absorption directe de l'énergie des radiations (de la Hoz et Netto, 2007).

I.5.3.2. Action indirecte

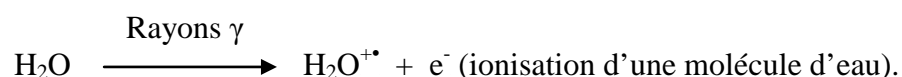
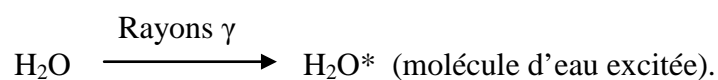
En solution aqueuse, les radiations agissent sur les molécules d'eau (radiolyse de l'eau), produisant des espèces actives: les radicaux hydroxyl (OH) et l'électron aqueux (e^-_{aq}), qui vont réagir avec les protéines du soluté (Yamamoto, 1992). Ces interactions sont plus importantes dans le cas d'une solution diluée où les protéines sont plus accessibles aux radicaux libres (Kempner, 2001).

Les molécules d'eau sont capables de se décomposer suite à l'absorption de radiations ionisantes. Cette décomposition génère par des processus complexes, des espèces moléculaires stables mais aussi des radicaux libres très réactifs

I.5.4. Impacts de l'irradiation gamma sur les molécules biologiques

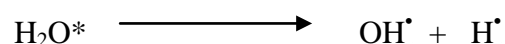
I.5.4.1. Radiolyse de l'eau

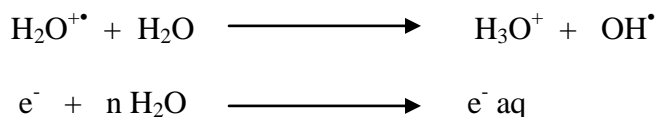
Le passage du rayonnement ionisant gamma dans l'eau se traduit dans un premier temps par un transfert d'énergie aux molécules d'eau provoquant des excitations et des ionisations.



-Production de radicaux libres

Elle se fait par dissociation des molécules et des ions excités. Leur durée de vie est très courte (10^{-12} à 10^{-13} secondes).

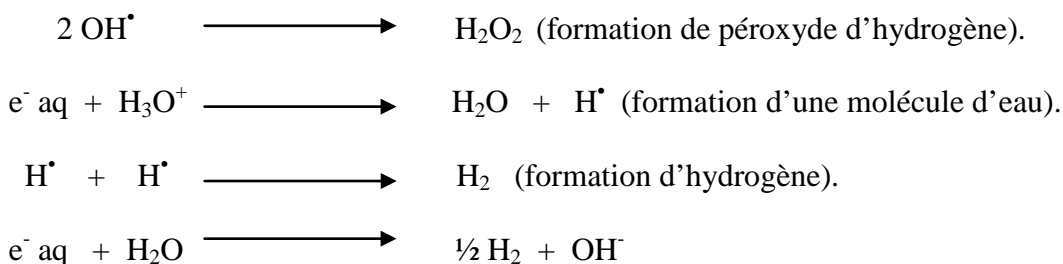




Le radical hydroxyl (OH^{\bullet}) est un puissant oxydant et l'électron hydraté ($e^- \text{aq}$) est tout aussi fort comme réducteur. Ils réagissent rapidement avec l'eau et avec les composés présents dans cette eau (Lemaine, 1995).

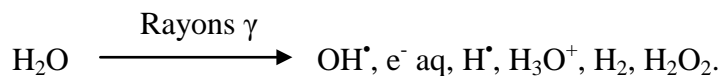
-Formation de produits moléculaires

Dans ce cas, il se produit les réactions suivantes :



Ces réactions se produisent à des temps de micro-secondes (Waite et *al.*, 1992).

Les étapes de la radiolyse de l'eau peuvent se résumer donc par la réaction suivante :



Le radical hydroxyl peut par diffusion, altérer certaines fonctions chimiques d'une molécule d'intérêt biologique, ceci se fait selon trois mécanismes.

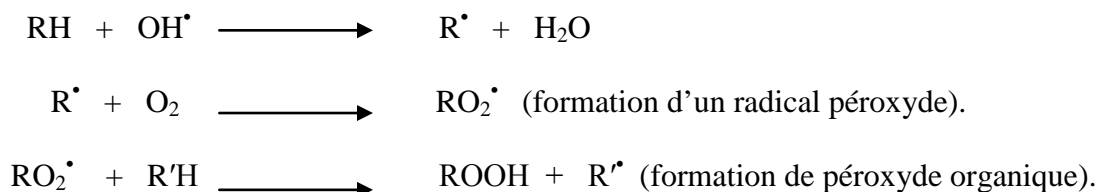
-Ce radical peut arracher un électron à cette molécule, ce phénomène d'oxydation par transfert d'électron conduit à une ionisation de la molécule.

-Ce radical hydroxyl est également capable d'arracher un atome d'hydrogène à la molécule. Ce processus mène à la rupture d'une liaison hydrogène (C - H).

-De même, ce radical est susceptible de se fixer sur une double liaison (C = C) ou sur un cycle aromatique.

Ces trois mécanismes donnent naissance à des peroxydes, tels que les peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) et les peroxydes organiques (ROOH). Le taux de formation de ces oxydants dépend de la quantité d'oxygène dissoute dans le milieu (Tubiana et *al.*, 1986).

Dans ce cas, il se produit les réactions suivantes :





I.5.4.2. Radiolyse des glucides

L'irradiation gamma entraîne des ouvertures de cycle, apparition d'acides et ruptures du pont oxygène. Elle induit également une déshydrogénation et une décomposition de la chaîne qui s'accompagne de dégagement de H₂, de CO, de CO₂ et d'apparition de radicaux libres (Antoni, 1970).

I.5.4.3. Radiolyse des protéines

L'irradiation gamma peut induire des changements de conformation des molécules, entraînant une modification de leur fonction.

Les molécules protéiques réagissent aux radiations en tant qu'entités protéiques ainsi que par leurs acides aminés constitutifs. Les principaux changements radiolytiques des acides aminés à chaîne aliphatique simple sont la désamination et la décarboxylation, les produits résultants sont du NH₃⁺, CO₂, H₂, amines, acides aliphatiques et aldéhydes.

Les acides aminés contenant du soufre sont les plus sensibles aux radiations, leurs sulfures sont oxydés aboutissant à la formation de H₂S, du soufre élémentaire et des composés sulfurés volatils. La cystéine contenant le groupement SH forme des disulfides cystines.

Les acides aminés aromatiques peuvent subir la rupture de leur structure cyclique. Leur désamination peut se produire mais pas au même degré que les acides aminés aliphatiques. L'hydroxylation des noyaux aromatiques est la principale réaction pour la phénylalanine et la tyrosine (Skalka et Antoni, 1970; Ferradini et Pucheault, 1983).

La généralisation des phénomènes affectant les protéines au cours de l'irradiation se manifestent par des modifications de la viscosité, de la solubilité, de la couleur, du spectre d'absorption, du comportement électrophorétique et des caractéristiques immunologiques (Von Kooiji et Loaharanu, 1982 ; Chapelier et *al.*, 2001 ; Oliveira et *al.*, 2007).

I.5.5. Effets des rayonnements gamma sur les protéines des venins de serpents

Des études réalisées sur les venins de serpents ont révélé que l'irradiation gamma entraîne des changements conformationnels et des altérations des propriétés physico-chimiques des constituants de venins. Selon la dose d'irradiation gamma utilisée, ces changements se traduisent par une baisse ou carrément une perte de leurs activités toxiques et enzymatiques (Lauhatirananda et Ganthavorn, 1970 ; Hati et *al.*, 1990 ; Nascimento et *al.*, 1996 ; Boni-Mitake et *al.*, 2001 ; Abib et Laraba-Djebari, 2003 ; Oussedik-Oumehdi et Laraba- Djebari, 2008).

L'irradiation ionisante gamma est capable de produire une variété de modifications chimiques sur les enzymes de venins de serpents. Ces modifications chimiques entraînent la perte de l'activité protéasique de ces enzymes. Ceci résulte de la rupture des liaisons hydrogène, du clivage des ponts disulfures et même de la perte de la structure primaire par

la rupture des liaisons peptidiques (Skalka et Antoni, 1970 ; Baptista et *al.*, 2006 ; Caproni et *al.*, 2009).

Tubiana et *al.*, (1986) et Waite et *al.*, (1992) ont rapporté que le radical hydroxyl OH^\bullet est le principal responsable de ces perturbations biologiques sur les enzymes, mais en absence d'oxygène, ce sont les radicaux hydrogène (H) et l'électron hydraté (e^-_{aq}) qui agissent sur les enzymes.

La perte d'activité des protéines irradiées pourrait être attribuée à plusieurs facteurs. L'irradiation en solution diluée provoque des clivages et des polymérisations des chaînes peptidiques et permet la formation d'agrégats de protéines (Marilyne et *al.*, 2003). L'agrégation n'est pas le seul processus qui conduit à la diminution de l'activité. L'irradiation à l'état sec et en solution induit des modifications des acides aminés, rupture des ponts disulfures, changements de conformation dues à des perturbations des liaisons hydrogènes et formation de liaisons covalentes inter et intramoléculaires (Spencer, 2000 ; Boni-Mitake et *al.*, 2001 ; Oliveira et *al.*, 2009 ; Baptista et *al.*, 2010), (Figure 10).

La nature exacte des lésions moléculaires provoquées par le dépôt initial d'énergie émise par les particules ionisantes gamma, ainsi que les modifications biochimiques qui en résultent n'est cependant pas encore entièrement élucidée.

Plusieurs études ont montré que l'irradiation par les rayons gamma permet la détoxification de différents venins tout en maintenant leurs propriétés immunologiques permettant ainsi d'améliorer la production de sérum antivenimeux lorsqu'ils sont utilisés en tant qu'antigènes (Nascimento et *al.*, 1996 ; Spencer et *al.*, 1997 ; Clissa et *al.*, 1999). D'autres travaux basés sur la détermination de la dose idéale de détoxification du venin de *Cerastes cerastes*, indiquent que l'irradiation à une dose de 2 kGy du venin de *Cerastes cerastes* serait la plus efficace pour minimiser les effets toxiques du venin (Abib et Laraba-Djebari, 2003 ; Oussedik-Oumehdi et Laraba-Djebari, 2008).

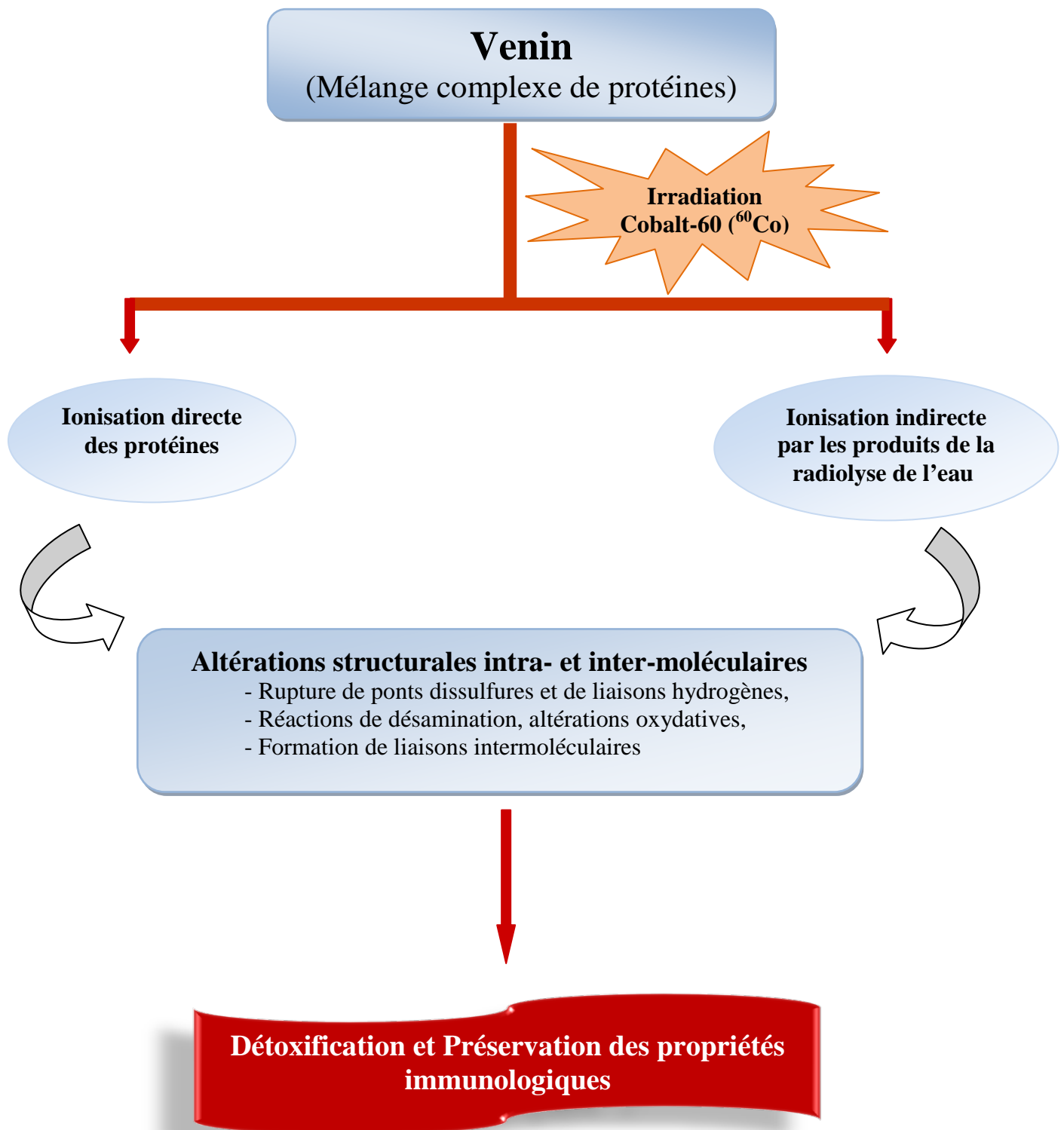


Figure 10 : Effets des rayonnements ionisants gamma sur les protéines du venin (Nascimento et *al.*, 1996 ; Spencer et *al.*, 1997 ; Boni-Mitake et *al.*, 2001 ; Oussedik-Oumehdi et Laraba-Djebari, 2008 ; Caproni et *al.*, 2009 ; Baptista et *al.*, 2010).

Matériel et Méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Venin

Le venin de *Cerastes cerastes* nous a été fourni sous forme lyophilisée par le Laboratoire de Recherche et Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie.

II.1.1.2. Les Animaux

Les souris blanches de souche *NMRI* (20 ± 2 g), ont été fournies par l'animalerie de l'Institut Pasteur d'Algérie (annexe de kouba) et l'animalerie de la FSB-USTHB.

Les lapins utilisés sont de race Albinos (2,5 à 3 kg). Ils sont issus de l'élevage de l'animalerie de l'Institut Pasteur d'Algérie (annexe de kouba).

II.1.2. Matériel analytique

II.1.2.1. Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés dans cette étude, proviennent des Laboratoires de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB et de Recherche et Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Ces produits de nature analytique sont fournis par différentes firmes:

- Acétate d'ammonium ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), Phosphate monosodique (NaH_2PO_4), Phosphate disodique (Na_2HPO_4), $\text{N}\alpha$ -Benzoyl-L-Arginine-Ethyl-Ester Hydrochloride (BAEE), Caséine, Tris (hydroxy-méthyl- amino-méthane : $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), Glycérol, Ammoniaque (NH_3), Ethanol, Méthanol, Acide acétique, Toluène, Bleu de bromophénol ($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$), Alun de fer, Hématoxyline, Eosine cristallisée, Orange G, Erythrosine, Gélatine en poudre, Tween 20, rouge ponceau sont fournis par Merck.
- Réactif de la Créatine Kinase (CK), Polyéthylène glycol (PEG), $\text{N}\alpha$ -CBZ L-Arginine-p-Nitroanilide Hydrochloride ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_5$, HCl), Chloride de calcium anhydride (CaCl_2), 4 α -chloronaphtol, Adjuvant complet de Freund, Adjuvant incomplet de Freund, Conjugué anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase, O-Phénylène Diamine (OPD), Tween20, Acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), 1,10-phénanthroline, Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) sont fournis par Sigma.
- Les gels Sephadex G-75, DEAE Sephadex A-50, Dodecyl Sulfate de Sodium (SDS) sont des produits de Pharmacia Fine Chemicals.
- Arginine Sepharose 4B, Acrylamide sont des produits de Pharmacia Biotech.
- Formaldéhyde et la paraffine sont des produits de Panréac.

- **Autres firmes :** Chlorure de Sodium (NaCl) (Fluka), Acide trichloroacétique (TCA), (Prolabo), Citrate trisodique (Prolabo), Formol à 35 % (Gifrer Barbazat), baume du Canada (Orchidis).

Ce chapitre sera complété par une partie annexe, afin de décrire en détail les différentes méthodes utilisées.

II.2. Méthodes

II.2.1. Détoxification du venin natif de *Cerastes cerastes* par les rayonnements ionisants gamma au Cobalt-60

L'irradiation du venin de *Cerastes cerastes* a été effectuée au Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA). La solution du venin (0,1 %) a été irradié en utilisant une dose de 2 kGy issue du Cobalt-60 (^{60}Co), à trois débits de dose respectivement de 194 Gy/h, 765 Gy/h et 1737 Gy/h.

Après irradiation, les solutions de venins irradiés ont été soumises à une centrifugation à 3000 g pendant 10 minutes. Les protéines solubles contenues dans les surnageants sont récupérées et conservés à -20°C .

II.2.2. Test de toxicité

La détoxification du venin natif de *Cerastes cerastes* par les rayonnements ionisants gamma est évaluée selon la méthode de Hati et collaborateurs (1990). Ce test consiste à injecter par voie intra-péritonéale à des lots de 4 souris de (20 ± 2 g), un volume de 500 μl contenant une solution de venins irradiés à des doses croissantes allant de 2 à 25 DL50.

Les souris du lot témoin (témoin négatif) reçoivent par voie intra-péritonéale, un volume de 500 μl de NaCl 0,9 %. Un autre lot servant également de témoin reçoit une dose du venin natif équivalente à 2 DL50 (96 $\mu\text{g}/20$ g) dans le même volume (témoin positif). La toxicité est déterminée 48 heures après l'injection.

II.2.3. Etude des propriétés biochimiques du venin natif et irradié (V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) de *Cerastes cerastes*

II.2.3.1. Caractérisation protéique du venin de *Cerastes cerastes* après irradiation gamma par RP-HPLC

Les différentes préparations de venins de *Cerastes cerastes* (natif et irradiés) (1 mg/ml), sont soumises à une chromatographie liquide à haute pression en phase reverse, utilisant une colonne C8 (4,6 x 150 mm avec un diamètre de 5 μm).

Le tampon A correspond à l'acide trifluoroacétique à 0,1 % dans l'eau, le tampon B correspond à l'acide trifluoroacétique à 0,1 % dans l'acétonitrile.

L'éluion est effectuée en utilisant un gradient de 0 à 80 % pendant 100 minutes de tampon B dans le tampon A avec un débit de 1 ml/min.

II.2.3.2. Analyse du profil électrophorétique du venin de *Cerastes cerastes* après irradiation gamma par SDS-PAGE

Les échantillons de venin natif et de venins irradiés sont analysés sur gel de polyacrylamide à 20 % en présence de SDS selon la méthode de Laemmli (1970). Les échantillons de venins sont solubilisés dans un tampon de dénaturation Tris-HCl 10 mM contenant de l'EDTA 1 mM ; pH 8, puis dans le SDS à 10 %.

Après chauffage à 100°C pendant 10 minutes, les échantillons sont déposés à raison de 5 µl sur un gel de polyacrylamide. Après migration, le gel subit une série d'étapes de coloration et de décoloration. Les polypeptides sont d'abord fixés avec la solution de glutaraldéhyde à 5 % ensuite colorés par le bleu de coomassie.

II.2.3.3. Détermination des activités enzymatiques du venin de *Cerastes cerastes* avant et après irradiation gamma

II.2.3.3.1. Détermination de l'activité caséinolytique

L'activité caséinolytique est testée selon la méthode de Kunitz (1947), modifiée par Vanderwalt et Joubert (1971), en utilisant comme substrat la caséine à 1 % (P/V) dans un tampon Tris- HCl 0,2 M ; pH 7,2.

II.2.3.3.1.1. Détermination de l'activité caséinolytique en fonction de la concentration du venin natif et irradié (V-194 Gy/h, V-765 Gy/h, V-1737 Gy/h) de *Cerastes cerastes*

L'étude de l'activité caséinolytique en fonction de la concentration du venin natif et irradié (V-natif, V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) de *Cerastes cerastes* est effectuée en utilisant des concentrations de venins allant de 0 à 0,13 UDO. La solution de venin est rajoutée à un volume de 1,9 ml de la solution de la caséine (1 %) préalablement incubée à 37°C pendant 15 minutes. Après incubation du mélange réactionnel pendant 20 minutes à 37°C, un volume de 3 ml de TCA 5 % (V/V) est rajouté dans chacun des tubes pour arrêter la réaction enzymatique. Le mélange réactionnel est ensuite centrifugé à 3000 g pendant 20 minutes et la densité optique du surnageant filtré est mesurée à 280 nm.

II.2.3.3.1.2. Détermination de l'activité caséinolytique en fonction de la concentration du substrat

L'étude de l'activité caséinolytique en fonction de la concentration du substrat est testée avec des concentrations croissantes de caséine allant de 0,5 à 9,5 mg/ml, pré-incubée à 37°C pendant 15 minutes et une concentration constante (0,1 UDO) des différentes solutions de venins (V-natif, V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h).

Après incubation à 37°C pendant 20 minutes, un volume de 3 ml de TCA 5 % (V/V) est rajouté à chaque tube. Le mélange réactionnel est ensuite centrifugé à 3000 g pendant 20 minutes, la lecture de l'absorbance des surnageants filtrés est effectuée à 280 nm.

II.2.3.3.2. Détermination de l'activité Arginine-ester-hydrolase

L'activité Arginine-ester-hydrolase est déterminée selon la méthode de Nishikata (1984), en utilisant un substrat synthétique le N α -Benzoyl-Arginine-Ethyl-Ester Hydrochloride (BAEE) ($6,6 \cdot 10^{-4}$ M) dans un tampon Tris-HCl 0,04 M contenant CaCl₂ 0,01 M ; pH 8.

II.2.3.3.2.1. Détermination de l'activité Arginine-ester-hydrolase en fonction de la concentration des solutions de venins (natif, V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) de *Cerastes cerastes*

Cette étude est réalisée en utilisant des concentrations croissantes des échantillons enzymatiques à tester (V-natif, V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) allant de 0 à 0,13 UDO. La solution de venin est rajouté à un volume de 200 μ l de BAEE à $6,6 \cdot 10^{-4}$ M dans un tampon Tris-HCl 0,04 M ; pH 8 contenant du CaCl₂ 0,01 M pour un volume réactionnel final de 2 ml. Après incubation de ce mélange à 37°C pendant 30 minutes, le produit d'hydrolyse du substrat est mesuré à 253 nm.

II.2.3.3.2.2. Détermination de l'activité Arginine-ester-hydrolase en fonction de la concentration du substrat

L'étude de l'activité Arginine-ester-hydrolase en fonction de la concentration du substrat est effectuée en utilisant des concentrations croissantes de BAEE allant de $0,82 \cdot 10^{-5}$ à $9,9 \cdot 10^{-5}$ M dans un tampon Tris-HCl 0,04 M ; pH 8 contenant du CaCl₂ 0,01 M. La réaction est effectuée en présence d'une concentration constante de venins de *Cerastes cerastes* (V-natif, V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) égale à 0,1 UDO.

Après incubation pendant 30 minutes à 37°C, la lecture de l'absorbance est effectuée à 253 nm.

II.2.3.3.3. Détermination de l'activité amidolytique de type thrombine

L'activité amidolytique est recherchée en utilisant un substrat synthétique, le N α -CBZ L-Arginine p-Nitroanilide Hydrochloride ($92,95 \cdot 10^{-2}$ mg/ml) selon la technique de Stocker et collaborateurs (1986).

Ce substrat chromogénique est un peptide de synthèse spécifique de l'activité de type thrombine.

II.2.3.3.3.1. Détermination de l'activité amidolytique en fonction de la concentration de venins de *Cerastes cerastes* (natif et irradiés)

Cette étude est réalisée en utilisant des concentrations croissantes de venins natif et irradiés (V-natif, V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) allant de 0 à 0,13 UDO, préalablement incubées pendant 10 minutes à 37°C en présence de tampon Tris-HCl 0,01 M ; pH 8,7 contenant du NaCl 0,1 M et du PEG 0,1 % (P/V). La solution de substrat est rajoutée à raison de $92,95 \cdot 10^{-2}$ mg/ml.

Après incubation du mélange réactionnel à 37°C pendant 15 minutes, l'hydrolyse du substrat chromogénique est suivie à 405 nm.

II.2.3.3.2. Détermination de l'activité amidolytique en fonction de la concentration du substrat

L'étude de l'activité amidolytique en fonction de la concentration du substrat est réalisée en maintenant constant les concentrations des échantillons enzymatiques à tester (venin natif et irradié à 0,1 UDO) dans un tampon Tris-HCl 0,01 M ; pH 8,7 contenant du NaCl 0,1 M et du PEG 0,1 % (P/V) préalablement incubés pendant 10 minutes à 37°C. La réaction est effectuée en présence de concentrations croissantes du substrat chromogénique allant de $4,64 \cdot 10^{-3}$ mg/ml à $92,95 \cdot 10^{-3}$ mg/ml.

Après incubation pendant 15 minutes à 37°C, l'activité amidolytique est déterminée par la mesure de l'absorbance à 405 nm.

II.2.3.3.4. Détermination de l'activité phospholipasique

La mise en évidence de l'activité phospholipasique des différents échantillons enzymatiques (V-natif, V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) est réalisée en utilisant la méthode de Cesari et Boquet, (1935) modifiée par Laraba-Djebari et Martin-Euclaire, (1990) et Leite et *al.*, (2004). Elle repose sur l'hémolyse indirecte des globules rouges.

La réaction est effectuée en mélangeant un volume de 950 µl de tampon phosphate 0,13 M; pH 7 et un volume de 0,5 ml de la solution de lécithine à 1 % avec une concentration de 0,1 UDO des solutions de venins (V-natif, V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h). Après incubation d'une heure à 37°C, un volume de 1 ml de globules rouges dilué au 1/20^{ème} est rajouté au volume réactionnel.

Après 1 heure d'incubation à + 4°C, les tubes sont soumis à une centrifugation de 1000 g pendant 15 minutes et la densité optique des surnageants récupérés est effectuée à 540 nm. Une unité hémolytique est considérée comme étant la quantité de l'enzyme qui produit une augmentation d'absorbance de 0,001/minute.

II.2.3.4. Détermination des activités biologiques du venin de *Cerastes cerastes* avant et après irradiation gamma

II.2.3.4.1. Détermination de l'activité hémorragique

II.2.3.4.1.1. Etude macroscopique de l'activité hémorragique du venin natif et irradié de *Cerastes cerastes*

La mise en évidence et la quantification de l'activité hémorragique *in vivo* est effectuée en utilisant la méthode du "skin test" selon Kondo et collaborateurs (1960) modifiée par Gutiérrez et collaborateurs (1985). Ce test consiste à injecter à des lots de souris (5 souris par lot), un volume de 100 µl de l'échantillon à tester (V-natif, V-194 Gy/h, V-765 Gy/h, V-1737 Gy/h et les fractions chromatographiques) par voie sous-cutanée au niveau de la peau dorsale à des doses croissantes allant de 5 µg à 320 µg/20 g. Les souris du lot témoin, reçoivent par voie sous-cutanée au niveau de la peau dorsale un volume de 100 µl de NaCl 0,9 %.

Deux heures après l'injection, les animaux sont sacrifiés, leurs peaux dorsales sont soigneusement prélevées et soumises à la quantification de l'activité hémorragique et à

l'étude microscopique. Les deux diamètres A et B de chaque spot hémorragique sont mesurés. Le rapport $A + B/2$ représentant le diamètre moyen est exprimé en mm.

◆ Evaluation de la dose minimale hémorragique

La dose minimale hémorragique (DMH) est définie comme étant la plus faible quantité de venin injectée par voie sous-cutanée à des souris, provoque une lésion hémorragique de 10 mm de diamètre deux heures après injection (Theakston et Reid, 1983 ; Ownby et *al.*, 1984 ; Rucavado et Lomonte, 1996).

La DMH du venin natif ou irradié ou celle de la molécule hémorragique purifiée a été évaluée après injection de différentes doses de venin (natif ou irradié) ou encore de la fraction purifiée et en mesurant pour chaque dose le diamètre du spot hémorragique.

II.2.3.4.1.2. Etude microscopique de l'activité hémorragique du venin natif et irradié de *Cerastes cerastes*

L'analyse microscopique des altérations induites par le venin natif et irradié de *Cerastes cerastes* ainsi que celles provoquées par la molécule hémorragique purifiée, des coupes histologiques sont effectuées selon les étapes suivantes. Les pièces de peau sont fixées dans du formaldéhyde à 10 % pendant 48 heures puis déshydratées dans des bains croissants d'éthanol. Après inclusion dans de la paraffine puis réhydratation dans des bains décroissants d'alcool, des coupes de 5 μm d'épaisseur sont colorées à l'hématoxyline-éosine.

Pour illustrer les différentes observations microscopiques des coupes après l'examen histologique. La prise des photos de la peau a été effectuée au moyen d'un photomicroscope à l'objectif x 10 et l'objectif x 40.

II.2.3.4.2. Détermination de l'activité myotoxique

Le venin de *Cerastes cerastes* est doué d'une forte activité myotoxique (Abib et Laraba-Djebari, 2003). Après irradiation du venin de *Cerastes cerastes* à une dose de 2 kGy en utilisant différents débits de dose, cette activité biologique a été recherchée dans les différentes préparations de venins irradiés.

La mise en évidence de l'activité myotoxique des venins irradiés de *Cerastes cerastes*, a été effectuée par l'évaluation de l'activité enzymatique de la créatine kinase (CK) et par une analyse histologique du muscle squelettique de souris témoins et envenimées. L'envenimation expérimentale est effectuée comme suite :

Deux lots de souris reçoivent par voie intramusculaire au niveau de la cuisse droite, un volume de 500 μl de doses sublétales et létales du venin natif (20 ou 96 $\mu\text{g}/20\text{g}$ de souris). Les venins irradiés ont été injectés aux souris avec une dose "sublétales" équivalente à 5 DL50 (240 $\mu\text{g}/500\mu\text{l}$). Le dernier lot servant de témoin, reçoit un volume de 500 μl de NaCl 0,9% par injection intramusculaire au niveau de la cuisse droite. Les animaux témoins et envenimés (4 souris/lot) sont sacrifiés au bout de 3 heures d'injection. Après sacrifice, le sang est récupéré et les cuisses droites des animaux, débarrassées de leur peau, sont prélevées et soumises à l'étude enzymatique et histopathologique.

II.2.3.4.2.1. Détermination de l'activité enzymatique de la créatine kinase (E.C.2.7.3.2) dans le sérum et le muscle squelettique de souris

L'activité enzymatique de la CK, marqueur de la myonécrose, a été déterminée dans les sérums et les homogénats du muscle squelettique des souris témoins et envenimées. Après 3 heures d'injection des différentes solutions du venin de *Cerastes cerastes* (natif et irradiés), les souris sont sacrifiées. Les muscles squelettiques prélevés subissent une homogénéisation, le sang et les homogénats sont centrifugés à 10 000 g pendant 5 minutes. Les surnageants obtenus vont servir au dosage enzymatique de la créatine kinase.

Le dosage de l'activité enzymatique de la CK est effectué selon les conditions recommandées par sigma. Un volume de 0,02 ml de l'échantillon (sérums et les homogénats du muscle squelettique) est mélangé à 1 ml du substrat de CK. Après incubation à 30° C pendant 3 minutes, une première lecture de l'absorbance est effectuée à 340 nm suivie d'une deuxième lecture après 2 minutes de réaction à 30° C.

La vitesse de formation du NADPH, H⁺ est proportionnelle à l'activité catalytique de la créatine kinase, elle est déterminée par la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

II.2.3.4.2.2. Etude histologique du muscle squelettique de souris envenimées avec le venin natif ou irradié de *Cerastes cerastes*

L'analyse histopathologique du muscle squelettique est réalisée selon le protocole expérimental précédemment décrit.

II.2.4. Etude des propriétés immunologiques du venin natif et irradié (V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) de *Cerastes cerastes*

Afin d'évaluer les effets de l'irradiation gamma sur le pouvoir immunogène et sur l'antigénicité du venin de *Cerastes cerastes*, des immun-sérums expérimentaux, anti-venin natif et anti-venins irradiés ont été préparés. Les capacités neutralisantes des différents échantillons sériques sont déterminées par des tests de neutralisation du venin natif.

II.2.4.1. Préparation des immun-sérums

La préparation des immun-sérums anti-venin natif ou irradié de *Cerastes cerastes*, a été réalisée sur des lapins qui reçoivent huit injections par voie sous cutanée de venin natif (V-natif) ou irradiés (V-194 Gy/h, V-765 Gy/h, V-1737 Gy/h). Les doses injectées sont 500, 600, 700, 800, 900 µg de venin dissout dans du NaCl 0,15 M, respectivement aux jours : 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43 et 49.

Les trois premières injections sont des mélanges d'antigène (venin) et d'adjuvant complet ou incomplet de Freund. L'addition d'adjuvant permet d'utiliser des quantités minimales d'antigène et d'obtenir des réponses en anticorps durables. Avant chaque injection, des prélèvements de sang sont effectués au niveau de la veine de l'oreille pour les quatre lapins. Les lapins sont sacrifiés au bout de 49^{ème} jour. Le sang récupéré est centrifugé à 4000 g pendant 20 min et les immun-sérums récupérés, aliquotés et conservés à - 20°C.

II.2.4.2. Détermination du titre en anticorps des différents immun-sérums anti-venins de *Cerastes cerastes* par ELISA simple

La microplaque est sensibilisée avec le venin natif de *Cerastes cerastes* à raison de 5 µg/ml de tampon carbonate- bicarbonate de sodium 0,1 M ; pH 9,5 pendant une nuit à 4 °C. Après une série de lavages avec du tampon PBS-Tween 20 (0,1 %), suivie d'une saturation des sites non spécifiques avec le tampon PBS- Tween 20 (0,1 %)-lait écrémé à 5% pendant 1 heure à 37 °C, des dilutions de ½ en ½ des anti-venin natif (Anti-Vnatif) et anti-venins irradiés (Anti-V194 Gy/h, Anti-V765 Gy/h et Anti-V1737 Gy/h) sont effectuées dans un tampon PBS 0,1M ; pH 7,4. Après incubation de la réaction à 37 °C pendant 1 heure, une nouvelle série de lavages avec du tampon PBS-Tween 20 (0,1 %) est réalisée.

Le conjugué (anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase) est déposé dans chacun des puits de la microplaque, qui est incubée pendant 1 heure à 37°C. La réaction enzymatique se développe à l'obscurité à température ambiante pendant 15 minutes, après addition du substrat (10 mg de l'OPD dans 10 ml de tampon phosphate 0,01 M ; pH 7,4 + 10 µl d'H₂O₂ à 30 %), puis est arrêtée avec le H₂SO₄ 2N. La densité optique est mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur ELISA (Sanofi PR2100).

II.2.4.3. Détermination de la capacité neutralisante des immun-sérums anti-vipérins natif et irradiés par séroneutralisation

Afin d'évaluer la capacité neutralisante des différents immun-sérums, un test de neutralisation de la toxicité du venin est effectué *in vivo* chez la souris.

Les échantillons de venin natif à des doses allant de 3 à 10 DL50 sont mélangés à un volume de 150 µl de différentes préparations d'immun-sérums expérimentaux anti-venin natif (Anti-Vnatif) et anti-venins irradiés (Anti-V194 Gy/h, Anti-V765 Gy/h et Anti-V1737 Gy/h). Les mélanges réactionnels sont incubés pendant 90 minutes à 37°C. Les animaux (lot de 4 souris) reçoivent des injections par voie i.p. un volume de 500 µl/souris par mélange. Les souris témoins reçoivent un mélange de sérum d'animal sain et de venin natif. La mortalité des animaux est déterminée après 24 heures ou 48 heures d'injection.

La DL50 obtenue après neutralisation est calculée selon la formule de Behrens et Karber (1935).

$$DL50 = DL100 - \frac{\sum a b}{n}$$

DL100 : Dose minimale qui provoque la mort de la totalité des animaux du lot.

a : Moyenne des animaux morts pour deux doses successives.

b : Différence entre les deux doses successives.

n : Moyenne des animaux utilisés dans les deux lots correspondant.

II.2.5. Purification et caractérisation des protéinases hémorragiques à partir du venin natif de *Cerastes cerastes*

Le venin est soumis à différentes techniques chromatographiques (chromatographie d'exclusion moléculaire, échangeuse d'anions, d'affinité et RP-HPLC) afin d'isoler les protéines présentant une activité hémorragique.

Les fractions récupérées par les diverses méthodes chromatographiques ont été testées pour leurs activités hémorragique, protéolytique, amidolytique, estérasique et phospholipasique. Ces différentes activités biologiques et enzymatiques ont été déterminées selon les protocoles expérimentaux précédemment décrits.

L'homogénéité des fractions hémorragiques collectées après chaque étape chromatographique est déterminée par SDS-PAGE à 15 % selon la méthode de Laemmli (1970).

II.2.5.1. Fractionnement du venin de *Cerastes cerastes* par filtration moléculaire sur Sephadex G-75

Le venin natif de *Cerastes cerastes* (1 g correspondant à 916 UDO) dissout dans 4 ml de tampon AcNH_4 0,1 M ; pH 8,5, est déposé à la surface du gel de Sephadex G-75 coulé dans une colonne Pharmacia (2,5 cm x 100 cm) et équilibré avec un tampon d'élution AcNH_4 0,1 M ; pH 8,5.

Les fractions sont collectées à raison de 3 ml/tube, utilisant un débit de 18 ml/heure. La lecture de l'absorbance est effectuée à 280 nm et les effluents de colonne sont rassemblés et lyophilisés.

II.2.5.2. Séparation de la fraction hémorragique GF1 par chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE Sephadex A-50

La fraction hémorragique GF1 (100 UDO), issue de la filtration moléculaire G-75, est soumise à une chromatographie échangeuse d'anions en utilisant une colonne Pharmacia (1,5 cm x 27 cm) contenant du DEAE Sephadex A-50. Ce gel est équilibré à l'aide d'un tampon AcNH_4 0,1 M; pH 8,5 (+ 4°C). Le débit d'élution est réglé à raison de 18 ml/heure.

Après élution à l'équilibre, le gel est soumis d'abord à un gradient de force ionique allant de 0,1 M à 0,5 M d' AcNH_4 ; pH 8,5, ensuite aux différentes éluions successives avec l' AcNH_4 à 2 M et à 3 M ; pH 8,5. L'absorbance des effluents est mesurée à 280 nm.

II.2.5.3. Séparation de la fraction hémorragique D1 par chromatographie d'affinité sur gel d'Arginine Sepharose 4B

La chromatographie d'affinité repose sur les interactions spécifiques qui peuvent exister entre deux molécules. Il s'agit d'une fixation par liaison covalente entre le ligand sur support inerte. L'élution d'une solution protéique ayant de l'affinité pour le ligand s'effectue après formation d'un complexe stable et réversible.

Dans le cas de cette étude, nous avons utilisé l'Arginine Sepharose 4B. La fraction D1 présentant l'activité hémorragique la plus importante (10 UDO), issue de la chromatographie sur DEAE Sephadex A-50 est soumise à une chromatographie d'affinité en utilisant une colonne de (1,5 cm x 6 cm) contenant du gel Arginine Sepharose 4B équilibré avec un tampon Tris-HCl 0,05 M; pH 7,5 (+ 4°C).

L'élution est effectuée en utilisant dans une première étape, un tampon Tris-HCl 0,05 M; pH 7,5, suivie par un gradient de force ionique (Tris-HCl 0,05 M; pH 7,5 → Tris-HCl 0,05 M contenant NaCl à 1,5 M; pH 7,5), puis avec un tampon Tris-HCl à 0,05 M contenant du NaCl à 2 M; pH 7,5. Les protéines de haute affinité sont éluées avec un tampon Tris-HCl 0,1 M, contenant du NaCl 0,5 M et l'urée 8 M; pH 8,5.

Les fractions sont collectées à raison de 3 ml/tube, utilisant un débit de 18 ml/heure. La lecture de l'absorbance est effectuée à 280 nm.

II.2.5.4. Purification de la fraction hémorragique A1 par RP-HPLC

La fraction hémorragique A1 (2,5 UDO), issue de la chromatographie d'affinité sur Arginine Sepharose 4B, est soumise à une chromatographie liquide à haute pression en phase reverse utilisant une colonne C8 (4,6 x 150 mm avec un diamètre de 5 µm).

Le tampon A correspond à l'acide trifluoroacétique à 0,1 % dans l'eau, la tampon B correspond à l'acide trifluoroacétique à 0,1 % dans l'acétonitrile. L'élution est effectuée en utilisant un gradient de 0 à 80 % (V/V) pendant 100 minutes de tampon B dans le tampon A avec un débit de 1 ml/min.

II.2.6. Caractérisation biochimique de la molécule hémorragique CcH1 purifiée à partir du venin de *Cerastes cerastes*

II.2.6.1. Effets de quelques inhibiteurs sur l'activité hémorragique et protéolytique de la molécule hémorragique CcH1

L'utilisation des inhibiteurs spécifiques permettra de caractériser la molécule purifiée. Trois inhibiteurs, l'EDTA (chélateur de métaux) la 1, 10-phénanthroline (inhibiteur des zinc-métalloprotéinases) et le PMSF (inhibiteur des sérines protéinases) ont été testés sur l'activité hémorragique et protéolytique de CcH1, issue de la RP-HPLC de la fraction A1.

La fraction CcH1 (20 µg/20 g) est incubée pendant 1 heure à 37°C avec les différents inhibiteurs à raison de 5 mM. Après incubation, l'activité protéolytique résiduelle de CcH1 est déterminée en utilisant un substrat naturel (la caséine). L'activité hémorragique du mélange CcH1-inhibiteur est quand à elle quantifiée en injectant des volumes de 100 µl du mélange par voie sous-cutanée au niveau de la peau dorsale à des lots de 3 souris. Après 2 heures d'injection, les souris sont sacrifiées, leurs peaux dorsales sont prélevées et les diamètres des spots hémorragiques sont mesurés.

II.2.6.2. Effet de la température sur l'activité hémorragique et protéolytique de la molécule hémorragique CcH1

L'effet de la température sur l'activité hémorragique et protéolytique de la biomolécule CcH1 est testé selon la méthode de Stroka et collaborateurs (2005).

Des solutions de 100 µl contenant 20 µg de la molécule hémorragique purifiée (CcH1) sont chauffées pendant 30 minutes à différentes températures allant de 30 à 70°C. Après incubation, l'activité protéolytique résiduelle de la CcH1 est déterminée en utilisant la caséine comme substrat. Alors que l'activité hémorragique de cette même molécule purifiée est quantifiée en injectant ces solutions par voie sous-cutanée au niveau de la peau dorsale à des lots de 3 souris.

Après 2 heures d'injection, les souris sont sacrifiées leurs peaux dorsales sont prélevées et les diamètres des spots hémorragiques sont mesurés.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Détermination de la toxicité des venins irradiés de *Cerastes cerastes*

Les différents échantillons sont analysés afin de déterminer la toxicité résiduelle des venins de *Cerastes cerastes* irradiés avec une dose de 2 kGy, en utilisant trois débits de dose, un faible (V-194 Gy/h), un moyen (V-765 Gy/h) et un fort (V-1737 Gy/h). L'évaluation de la toxicité résiduelle de ces trois venins irradiés a été effectuée en injectant, à des souris, des doses de venin allant de 2 à 25 DL50.

La dose de 2 DL50 de venin natif provoque la mortalité de tous les animaux 48 heures après l'injection. Cependant l'administration d'une dose de 10 DL50 de l'un des trois venins irradiés V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h, ne provoque aucune perte d'animaux (Tableau VI). En effet, l'augmentation des doses de venins irradiés (V-194 Gy/h) n'a aucun effet sur les animaux jusqu'à une dose de 10 DL50 pour le venin irradié à faible débit (V-194 Gy/h), 20 DL50 pour le venin irradié à moyen débit (V-765 Gy/h) et 25 DL50 pour le venin irradié à fort débit (V-1737 Gy/h), (Tableau VI). Ces résultats indiquent le degré d'atténuation de la toxicité des venins irradiés.

Tableau VI : Evaluation de la toxicité résiduelle du venin de *Cerastes cerastes* après irradiation gamma.

Venins	Dose du venin injectée* (Dose de DL50/20 g de souris)	Taux de souris mortes
Témoin NaCl 0,9 %	-	0/4
Venin natif (V-natif)	1	2/4
	2	4/4
Venin irradié à faible débit de dose (V-194 Gy/h)	2	0/4
	5	0/4
	10	0/4
	15	1/4
	20	3/4
	25	4/4
Venin irradié à moyen débit de dose (V-765 Gy/h)	2	0/4
	5	0/4
	10	0/4
	15	0/4
	20	0/4
	25	4/4
Venin irradié à fort débit de dose (V-1737 Gy/h)	2	0/4
	5	0/4
	10	0/4
	15	0/4
	20	0/4
	25	0/4

*La DL50 du venin de *Cerastes cerastes* est estimée à 48 µg/20 g de souris (Laraba-Djebari, 1996).

Le débit de dose de l'irradiation serait un des paramètres qui interviendrait dans la détoxification du venin. En effet, des travaux réalisés sur le venin de *Crotalus durissus terrificus* irradié à 2 kGy ont montré que l'utilisation d'un débit de dose de 900 Gy/h réduisait sa toxicité de 5 fois par rapport à celle du venin natif (Murata et al., 1990), tandis que l'utilisation d'un débit de dose de 391 Gy/h ne réduisait sa toxicité que de 2,7 fois (Clissa et al., 1999). De même, la détoxification de la crotoxine par irradiation gamma à une dose de 2 kGy et un débit de dose de 554 Gy/h semble avoir réduit de 50 % sa toxicité (Nascimento et al., 1996). Cette perte de toxicité par rayonnement gamma, semble être le résultat de modifications structurales des composants toxiques du venin. L'irradiation gamma serait à l'origine d'altérations structurales des protéines du venin conduisant ainsi à une perte de fonction biologique (Spencer et al., 1997 ; Gallacci et al., 1998 ; Souza et al., 2002).

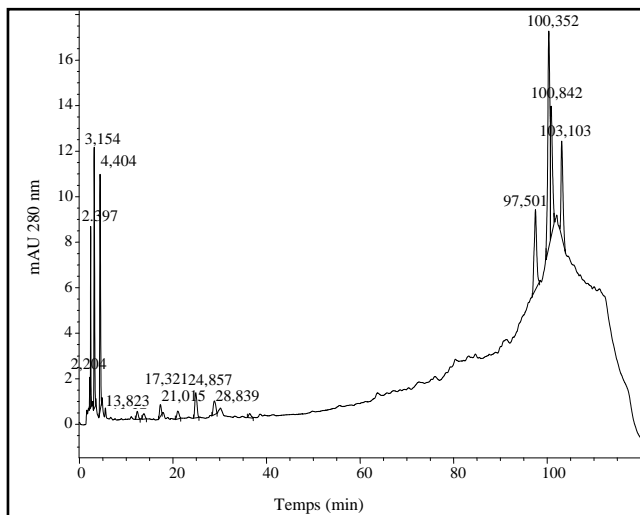
III.2. Effet de la variation du débit de dose de l'irradiation gamma sur les propriétés biochimiques du venin de *Cerastes cerastes*

III.2.1. Analyse chromatographique des préparations du venin de *Cerastes cerastes* (natif et irradiés) par RP-HPLC

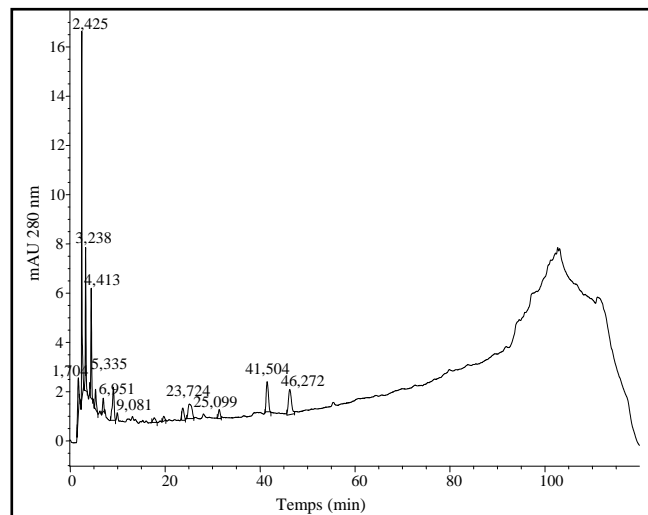
Afin d'examiner les effets de la variation du débit de dose sur les propriétés biochimiques des venins irradiés de *Cerastes cerastes*, les échantillons ont été soumis à une chromatographie liquide à haute pression en phase reverse (RP-HPLC).

L'analyse chromatographique par RP-HPLC montre un profil totalement modifié pour les venins irradiés comparativement au venin natif (Figure 11). Les venins irradiés présentent un profil avec un nombre de pics nettement plus faible que celui du venin natif. Les travaux de Casare et ses collaborateurs (2004) montrent également une modification du profil chromatographique de la crotamine purifiée à partir du venin de *Crotalus durissus terrificus* après irradiation gamma.

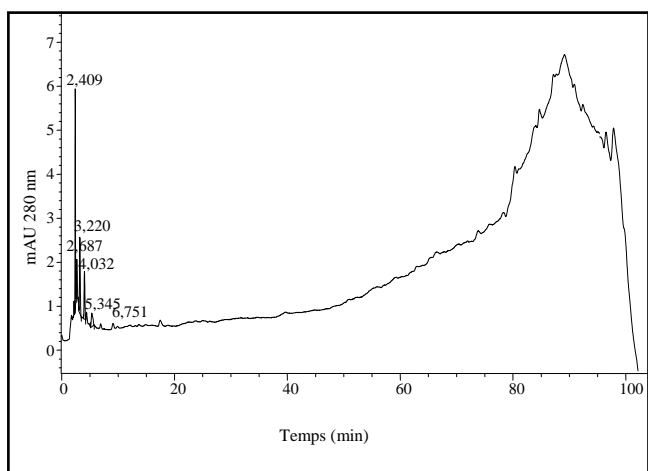
En (1996), Spencer a montré une modification du profil chromatographique du venin de *Bothrops jararacussu* irradié, suggérant ainsi l'apparition de nouvelles espèces moléculaires. Ces espèces moléculaires seraient des agrégats solubles ou insolubles de protéines du venin et/ou des complexes covalents de fragments de protéines formés sous l'effet de radicaux libres.



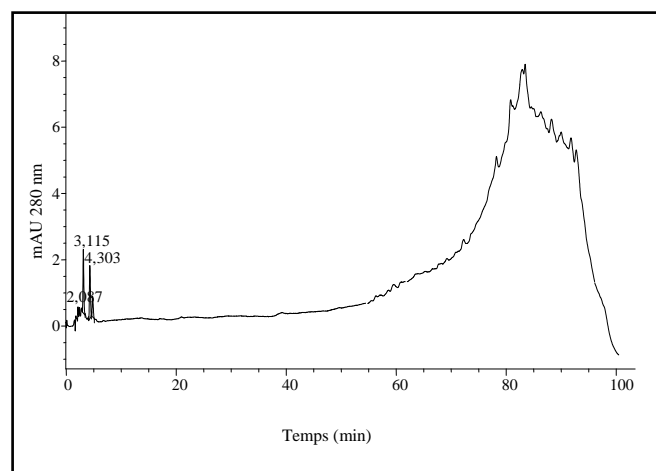
Venin natif (V-natif)



Venin irradié à faible débit de dose (V-194 Gy/h)



Venin irradié à moyen débit de dose (V-765 Gy/h)



Venin irradié à fort débit de dose (V-1737 Gy/h)

Figure 11 : Analyse chromatographique du venin de *Cerastes cerastes* (1 mg/ml) par RP-HPLC avant et après irradiation, en utilisant une colonne C8 (4,6 x 150 mm, avec un diamètre de 5 µm). L'éluion est effectuée en utilisant un gradient de 0 à 80 % (V/V) de tampon B (Acide trifluoroacétique à 0,1 % dans l'acétonitrile) dans le tampon A (Acide trifluoroacétique à 0,1 % dans l'eau) avec un débit de 1 ml/min.

V-natif : Présente 13 pics polypeptidiques ayant des temps de rétention allant de 2 minutes à 103 minutes.

V-194 Gy/h : Présente 11 pics polypeptidiques ayant des temps de rétention allant de 1 minute à 46 minutes.

V-765 Gy/h : Présente 6 pics polypeptidiques ayant des temps de rétention allant de 2 minutes à 6 minutes.

V-1737 Gy/h : Présente 3 pics polypeptidiques ayant des temps de rétention allant de 2 minutes à 4 minutes

III.2.2. Etude de l'homogénéité du venin natif et irradiés (V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) de *Cerastes cerastes* par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'analyse électrophorétique des venins natif et irradiés (V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) révèle une hétérogénéité dans l'électrophorégramme des échantillons étudiés, tant au niveau du nombre des bandes protéiques que de l'intensité respective de chacune d'elles (Figure 12).

La réduction du nombre de bandes protéiques du venin de *Cerastes cerastes* et de leurs intensités est probablement due aux effets d'irradiations, qui ont induit une agrégation des protéines et leur rétention au point de dépôt. Ces venins irradiés montrent également un « smir » qui pourrait provenir d'une dégradation polypeptidique (Figure 12).

L'agrégation des protéines du venin sous l'effet des rayons gamma serait due à la formation de liaisons croisées inter- et intra-moléculaires, de ponts disulfures par les radicaux libérés lors de la radiolyse de l'eau (Davies, 1987 ; Oliveira et al., 2007).

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Clissa et ses collaborateurs en (1999), qui ont constaté la formation d'agrégats solubles et non solubles après irradiation du venin de *Crotalus durissus terrificus*.

III.2.3. Effet du débit de dose d'irradiation gamma sur les activités enzymatiques du venin de *Cerastes cerastes*

Les venins de *Viperidae* représentent une des sources les plus riches en enzymes protéolytiques. Ces enzymes ont été identifiées pour leur action sur le mécanisme de l'hémostase et la formation de l'œdème (Chaves et al., 1995 ; Braud, 2000).

L'étude des différentes activités enzymatiques pouvant être en rapport avec la pathogénèse de ces effets physiopathologiques provoqués par le venin natif et irradié de *Cerastes cerastes*, est réalisée afin de déterminer l'effet du débit de dose de l'irradiation gamma sur les activités des enzymes mise en évidence dans le venin natif de *Cerastes cerastes*. Pour cela, les différentes préparations de venins ont été soumises à une série de tests biochimiques.

III.2.3.1. Détermination de l'activité caséinolytique

L'activité protéolytique des solutions de venins de *Cerastes cerastes* (natif et irradiés) a été testée en utilisant une solution de caséine (1 %) comme substrat. La détermination des paramètres cinétiques de cette activité protéolytique a été réalisée en maintenant constante la concentration de l'échantillon à tester (V-natif, V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) à 0,1 UDO et en faisant varier la concentration de caséine de 0,5 à 9,5 mg/ml.

Les résultats obtenus révèlent une activité catalytique (V_M/K_M) plus faible dans le cas des échantillons de venins irradiés (V-194 Gy/h et V-765 Gy/h). Cette activité est respectivement 2 fois et 4 fois plus faible que celle du venin natif. Elle est complètement abolie lorsque le venin de *Cerastes cerastes* est irradié à un fort débit de dose (1737 Gy/h), (Tableau VII).

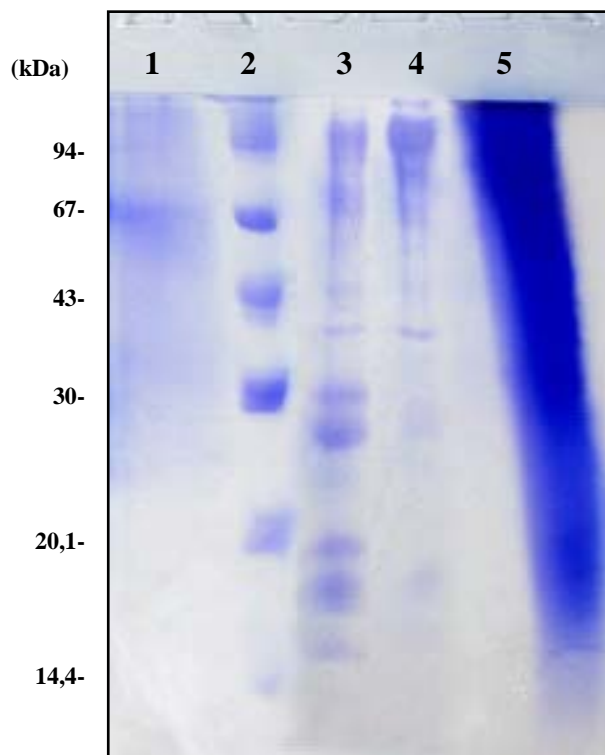


Figure 12 : Analyse électrophorétique des venins de *Cerastes cerastes* (natif et irradiés) sur gel de polyacrylamide à 20 % en présence de SDS à 10 %.

Pistes (1 et 5) : représentent respectivement les deux venins irradiés à fort et moyen débit de dose, ils ne renferment aucune bande protéique.

Piste (2) : Marqueurs de poids moléculaires, la phosphorylase b 94 kDa, la sérum albumine bovine 67 kDa, l'ovalbumin 43 kDa, l'anhydrase carbonique 30 kDa, soybean trypsin inhibitor 20,1 kDa et l' α lactalbumin 14,4 kDa.

Piste (3) : Venin natif, qui représente 10 bandes protéiques de masses moléculaires de 14 500, 28 180, 39 810, 67 000, 70 800, 84 000, 89 120, 91 500, 97 000, 112 200 Da.

Piste (4) : Venin irradié à un faible débit de dose, qui renferme 6 bandes protéiques de masse moléculaire 14 500, 28 180, 39 810, 67 000, 91 500 et 97 000 Da.

III.2.3.2. Détermination de l'activité Arginine-ester-hydrolase

La mise en évidence de l'activité estérasique des venins natif et irradiés (V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) a été réalisée en utilisant le α N -Benzoyl-Arginine-Ethyl-Ester Hydrochloride (BAEE), ($6,6 \cdot 10^{-4}$ M) comme substrat. Les résultats obtenus indiquent que le venin irradié à fort débit de dose (V-1737 Gy/h) ne présente aucune activité Arginine-ester-hydrolase par rapport à celui irradié à moyen débit de dose (V-765 Gy/h), qui présente une faible activité estérasique comparée à celle du venin natif ou V-194 Gy/h (Tableau VII).

En effet, les paramètres cinétiques de cette réaction enzymatique déterminée en présence de concentrations croissantes de BAEE montrent une activité catalytique (V_M/K_M) plus importante pour le venin natif en comparaison à celles des deux autres venins irradiés (V-194 Gy/h, V-765 Gy/h), (Tableau VII).

III.2.3.3. Détermination de l'activité amidolytique de type thrombine

L'activité amidolytique des différentes solutions de venins de *Cerastes cerastes* (natif et irradiés) a été déterminée en utilisant le N -CBZ L-Arginine-p-Nitroanilide Hydrochloride ($92,95 \cdot 10^{-2}$ mg/ml) comme substrat. Ce dernier est un peptide de synthèse spécifique de l'activité de type thrombine. L'hydrolyse de ce substrat chromogénique par les protéinases de type thrombine libère le paranitroanilide (PNA) de couleur jaune, qui est dosé à 405 nm.

La détermination des paramètres cinétiques de l'activité amidolytique des venins natif et irradiés (V-natif, V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) a été effectuée selon la représentation de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burck en utilisant des concentrations croissantes du substrat chromogénique. Les résultats obtenus indiquent que l'activité catalytique (V_M/K_M) du venin natif de *Cerastes cerastes* est 2 fois plus importante que celle du venin irradié à faible débit de dose (V-194 Gy/h) et 4 fois supérieure à celle du venin irradié à moyen débit de dose (V-765 Gy/h). Aucune activité n'a été retrouvée au niveau du venin irradié à fort débit de dose (V-1737 Gy/h), (Tableau VII).

Tableau VII : Effet de la variation du débit de dose d'irradiation gamma sur les activités du venin de *Cerastes cerastes*.

Activités	Paramètres cinétiques	Différentes solutions de Venins			
		Natif	Irradié à 194 Gy/h	Irradié à 765 Gy/h	Irradié à 1737 Gy/h
Caseinolytique (A_{280nm} / mg)	V_M^*/K_M^\dagger	$9,6 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-3}$	$2,27 \times 10^{-3}$	0
Estérasique ($A_{253 nm}$ / mg)	V_M^*/K_M^\dagger	$0,72 \times 10^3$	$0,22 \times 10^3$	$0,16 \times 10^3$	0
Amidolytique (A_{405nm} / mg)	V_M^*/K_M^\dagger	1,25	0,57	0,3	0

* V_M , vitesse maximale; $^\dagger K_M$, constante de Michaelis.

III.2.3.4. Détermination de l'activité phospholipasique

Les PLA₂ des venins de serpents exercent un effet lytique indirect sur les globules rouges suite à une hydrolyse des phospholipides membranaires (Chen et *al.*, 1994).

L'activité phospholipasique des différentes solutions de venins de *Cerastes cerastes* (natif et irradiés) a été également déterminée selon la méthode de Cesari et Boquet, (1935) modifiée par Laraba-Djebari et Martin-Euclaire, (1990) et Leite et *al.*, (2004). Elle repose sur l'hémolyse indirecte des globules rouges.

Les résultats obtenus montrent que le venin natif présente une activité phospholipasique plus importante que celle des trois venins irradiés. La diminution du degré de l'hémolyse des hématies est plus prononcée dans le cas du venin irradié à fort débit de dose (V-1737 Gy/h), (Figure 13).

Les résultats obtenus ont permis de révéler que l'irradiation du venin natif par les rayonnements ionisants gamma à une dose de 2 kGy en utilisant trois débits de dose (194 Gy/h, 765 Gy/h et 1737 Gy/h), provoque une réduction des activités enzymatiques (caséinolytique, Arginine-ester-hydrolase, amidolytique et phospholipasique). Cette réduction des activités semble indiquer que l'irradiation gamma a induit une altération structurale au niveau des protéines du venin sous l'effet des radicaux libres. Ces altérations structurales ont probablement affecté l'intégrité du site actif entraînant ainsi une baisse de l'affinité des enzymes pour leur substrat. La structure tridimensionnelle de l'enzyme a pu elle aussi été affectée par rupture des ponts disulfures ou des liaisons hydrogènes entraînant une inactivation.

III.2.4. Effet du débit de dose d'irradiation gamma sur les activités biologiques du venin de *Cerastes cerastes*

III.2.4.1. Détermination de l'activité hémorragique

III.2.4.1.1. Etude macroscopique de l'activité hémorragique du venin natif et irradié de *Cerastes cerastes*

La détermination de l'activité hémorragique du venin natif et irradié a été effectuée selon la méthode de Kondo et ses collaborateurs (1960) modifiée par Guitérrez et ses collaborateurs (1985). Les souris (20 ± 2g) ont été soumise à une injection par voie sous cutanée au niveau de la peau dorsale, avec les différentes préparations de venins de *Cerastes cerastes* (natif ou irradiés) à des doses croissantes allant de 5 à 320 µg/20 g. Le lot de souris témoins reçoit le même volume de NaCl 0,9 %. Deux heures après l'injection, les souris sont sacrifiées, leurs peaux dorsales prélevées, les spots hémorragiques mesurés et ensuite soumis à une analyse histologique.

Les résultats obtenus montrent des spots hémorragiques au niveau de la surface interne de la peau des souris injectées par le venin natif comparé aux animaux témoins (Figure 14). Les diamètres de ces spots sont d'autant plus importants que les doses du venin natif sont élevées, suggérant ainsi, la présence d'une activité hémorragique dose-dépendante du venin (Figure 15).

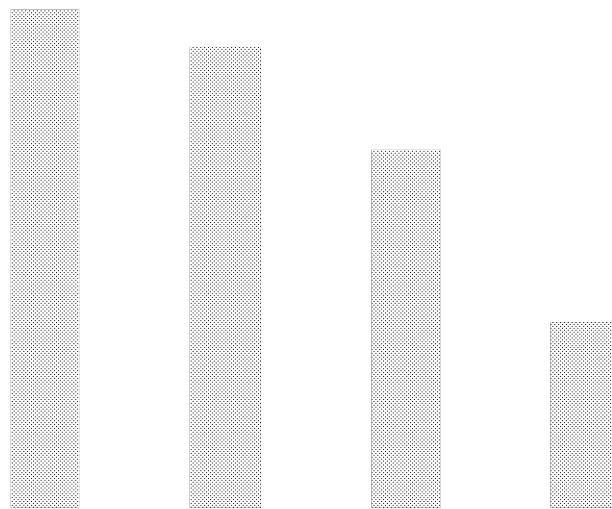
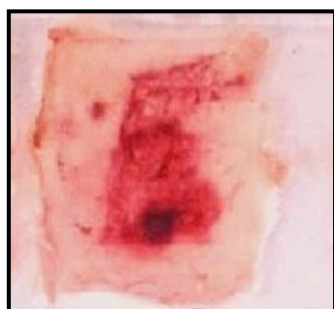


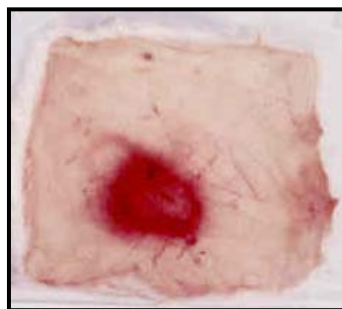
Figure 13 : Activité phospholipasique de type A₂ du venin de *Cerastes cerastes* natif et irradié aux différents débits de dose (V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h).



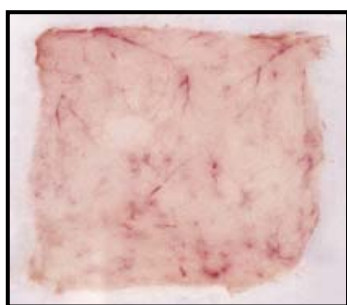
Témoïn NaCl 0,9 %



**Venin natif
(20 µg/ 20 g)**



**Venin irradié (194 Gy/h)
(80 µg/ 20 g)**



**Venin irradié (765 Gy/h)
(80 µg/ 20 g)**



**Venin irradié (1737 Gy/h)
(80 µg/ 20 g)**

Figure 14 : Détermination de l'activité hémorragique après deux heures d'envenimation des souris par voie sous cutanée avec le venin de *Cerastes cerastes* natif ou irradié aux différents débits de dose.

Figure 15 : Effet dose-réponse de l'activité hémorragique des venins de *Cerastes cerastes* natif et irradiés à une dose de 2 kGy et à différents débits de dose (194, 765 et 1737 Gy/h).
DMH_{v-natif} = 3 µg/20 g; DMH_{v-194 Gy/h} = 134 µg/20 g.

L'irradiation du venin à une dose de 2 kGy et un faible débit de dose (V-194 Gy/h), ne provoque aucune lésion hémorragique jusqu'à 40 µg/20 g. Au delà d'une dose de 80 µg/20g, une activité hémorragique apparaît (Figure 15). Aucune lésions hémorragique n'est observée avec les venins irradiés à moyen et fort débit de dose (V-765 et V-1737 Gy/h) (Figure 15).

L'évaluation de la DMH permet de déterminer le pouvoir hémorragique d'un venin, cette dose (DMH) est définie comme étant celle qui provoque un spot hémorragique de 10 mm de diamètre après deux heures d'injection par voie sous-cutanée à des souris (Theakston et Reid, 1983 ; Ownby et al., 1984 ; Rucavado et Lomonte, 1996).

Le venin irradié (V-194 Gy/h) présente une DMH de 134 µg/20 g comparée à celle du venin natif, qui est seulement de 3 µg/20 g indiquant ainsi une réduction de cette activité de 44 fois. Les résultats obtenus semblent suggérer une inactivation des métalloprotéinases hémorragiques sous l'effet des radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau.

III.2.4.1.2. Analyse histopathologique de la peau dorsale des animaux soumis à des injections de venins de *Cerastes cerastes* (natif ou irradiés)

Parallèlement au test macroscopique de l'activité hémorragique « skin test », une étude de la structure des peaux dorsales des souris témoins et envenimées a été réalisée. L'analyse histologique des peaux prélevées sur les souris témoins, montre une structure normale bien organisée. Un épiderme mince comportant des mélanocytes, parsemés d'une couche lâche de kératine. Le derme présente une structure bien organisée et irriguée par un grand nombre de vaisseaux avec une zone papillaire et réticulaire bien distinctes renfermant des follicules pileux (Figures 16A et 17A).

Les coupes histologiques de la peau dorsale des souris envenimées avec la dose sub létale du venin natif de *Cerastes cerastes* (20 µg/20 g), montrent une désorganisation totale du derme et de l'épiderme avec rupture et disparition de ce dernier dans certaines zones. Un œdème et des aires hémorragiques sont observées au niveau du derme et de la jonction dermo-épidermique. Il est observé aussi une destruction de la structure des follicules pileux. Les polynucléaires sont également présents au niveau des régions altérées, indiquant une infiltration inflammatoire (Figure 16B).

L'observation microscopique de la peau dorsale des souris envenimées avec le venin irradié à 194 Gy/h, montre la présence d'un œdème associé à une hémorragie (Figure 16C). Cependant, l'injection du venin irradié à 765 Gy/h ne semble induire qu'un épaissement de l'épiderme (Figure 17B). La peau des animaux ayant reçu le venin irradié à 1737 Gy/h, présente quand à elle, une structure similaire à celle du tissu témoin (Figures 17C). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec d'autres venins de serpents irradiés, *Vipera russelli* et *Crotalus durissus terrificus*. En effet, les rayonnements ionisants gamma semblent induire des changements conformationnels et des altérations des propriétés physico-chimiques des constituants des venins (Hati et al., 1990 ; Nascimento et al., 1996). La dose et le débit de dose d'irradiation gamma seraient des facteurs limitants, entraînant ce type de changements, qui se traduit par une diminution ou quasiment une perte des activités biologiques de ces venins (Clissa et al., 1999 ; Abib et Laraba-Djebari, 2003 ; Oussedik-Oumehdi et Laraba-Djebari, 2008).

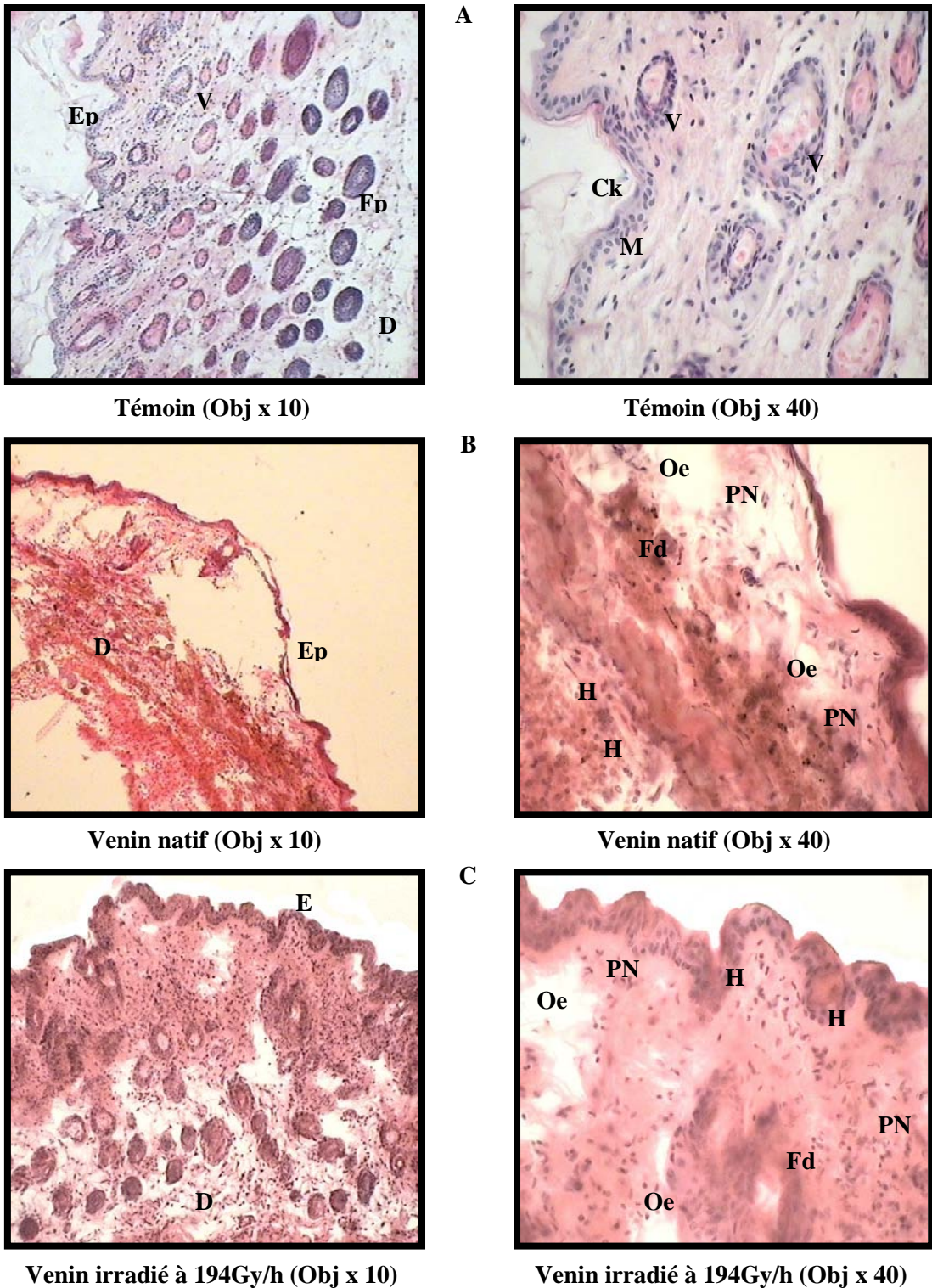
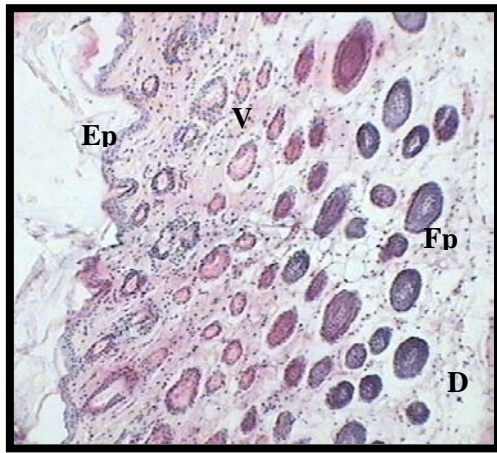


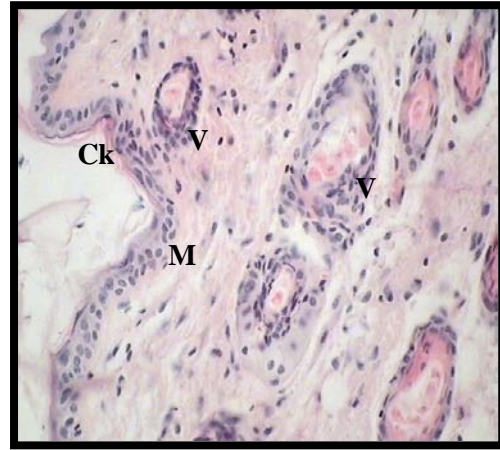
Figure 16 : Altérations tissulaires observées au niveau de la peau dorsale des souris envenimées avec le venin natif (20 µg/20 g) et irradié à faible débit de dose de *Cerastes cerastes* (80 µg/20 g). Coloration à l'hématoxyline-éosine.

Ck : Couche kératinisée ; **D :** Derme ; **Ep :** Epiderme ; **Fd :** Follicule pileux désorganisé ; **Fp :** Follicule pileux ; **H :** Hémorragie ; **M :** Mélanocytes ; **Oe :** Œdème ; **PN :** Polynucléée ; **V :** Vaisseau sanguin.

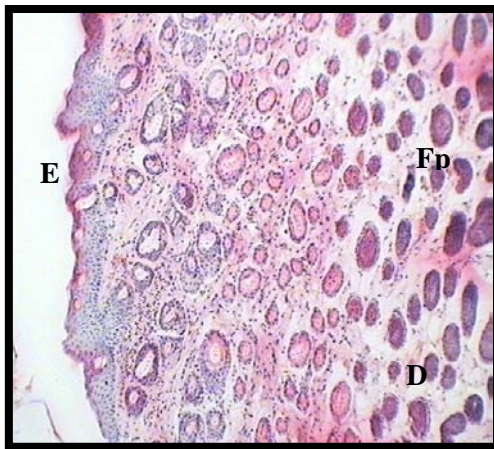


Témoin (Obj x 10)

A

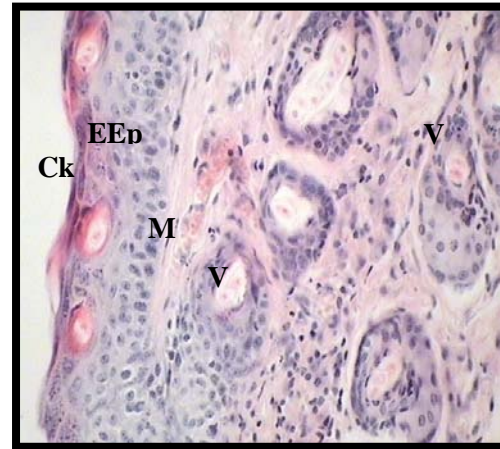


Témoin (Obj x 40)



Venin irradié à 765Gy/h (Obj x 10)

B

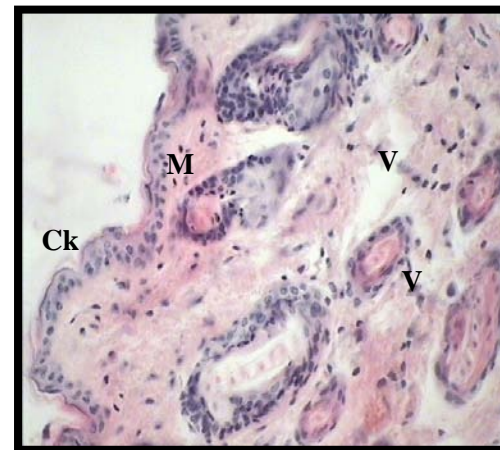


Venin irradié à 765Gy/h (Obj x 40)



Venin irradié à 1737Gy/h (Obj x 10)

C



Venin irradié à 1737Gy/h (Obj x 40)

Figure 17 : Changements morphologiques observés au niveau de la peau dorsale des souris envenimées avec une dose de 80 µg/20 g des venins irradiés à moyen et fort débit de dose. Coloration à l'hématoxyline-éosine.

Ck : Couche kératinisée ; D : Derme ; EEp : Epaisseur épidermique ; Ep : Epiderme ; Fp : Follicule pileux ; M : Mélanocytes ; V : Vaisseau sanguin.

III.2.4.2. Détermination de l'activité myotoxique

III.2.4.2.1. Dosage de l'activité enzymatique de la créatine kinase (E.C.2.7.3.2) dans le sérum et le muscle squelettique de souris

L'évaluation de l'activité de la créatine kinase (CK) sérique et musculaire des souris envenimées avec le venin natif ou irradié à faible débit de dose (V-194 Gy/h), révèle une diminution du taux de cette enzyme dans le muscle squelettique. Cette diminution est accompagnée par une augmentation du taux de la CK au niveau du sérum (Figure 18). Ce résultat est probablement dû à la libération de cette enzyme du tissu altéré vers le sang.

L'augmentation du taux de cette enzyme dans le sérum des souris envenimées avec la dose sublétales du venin natif (20 µg/20 g) est 6 fois supérieur au témoin, alors que celui des souris envenimées avec la dose létale du même venin (96 µg/20g) augmente de 18 fois par rapport au témoin (Figure 18). Ce résultat laisse conclure que la variation du taux de la CK dans le sérum et le muscle squelettique est dose-dépendante. Cette augmentation de la CK a été montrée dans les cas d'envenimation des animaux avec le venin de *Trimeresurus mucrosquamatus* (Nakada et al., 1984).

Selon Ownby et ses collaborateurs (1982), l'élévation du taux de la CK dans le sérum est positivement liée à la quantité du venin ainsi qu'au temps d'injection après la morsure de serpent. L'élévation du taux de la CK dans le sérum reflète une altération membranaire qui pourrait être expliquée par l'augmentation de la perméabilité du sarcolemme à cette enzyme.

Par ailleurs, l'envenimation des souris avec les venins de *Cerastes cerastes* irradiés à moyen et fort débit de dose (V-765 et V-1737 Gy/h), montre que le taux de la CK dans le muscle et le sérum, rappelle celui du témoin (Figure 18). La variation du taux de la CK au niveau du sérum et le muscle squelettique des souris injectées avec les venins irradiés, pourrait s'expliquer par la baisse ou la perte de l'activité des enzymes protéolytiques du venin suite à l'irradiation par les rayonnements gamma.

Figure 18 : Détermination du taux de la créatine kinase (CK) dans le sérum et le muscle squelettique de souris envenimées par voie intramusculaire avec le venin natif ou irradié de *Cerastes cerastes*.

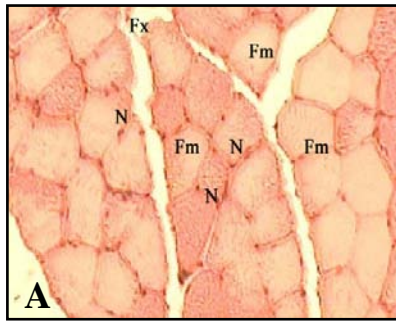
III.2.4.2.2. Etude des altérations tissulaires au niveau du muscle squelettique des souris envenimées avec le venin natif ou irradié de *Cerastes cerastes*

L'analyse des altérations au niveau du muscle squelettique de souris a été entreprise après injection au niveau de la cuisse droite, d'un volume de 500 µl de venin natif de *Cerastes cerastes* à une dose sublétales (20 µg/20 g) ou létale (96 µg/20 g). Les venins irradiés ont été injectés à une dose de 240 µg/20 g (l'équivalent de 5 DL50 du venin natif). Les animaux témoins reçoivent le même volume de NaCl 0,9 %.

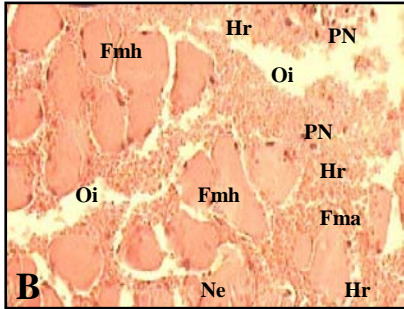
Les tissus prélevés après 3 heures d'injection sont placés dans le fixateur et soumis aux différentes étapes d'un protocole classique d'histologie. Les coupes fines sont colorées à l'Hématoxyline-Eosine.

Les coupes transversales du muscle squelettique de souris témoins, montrent des fibres sous forme polygonales, disposées en faisceaux, chaque fibre musculaire est bien délimitée. Les noyaux ovoïdes sont situés à la périphérie de la fibre sous le sarcolemme (Figure 19A). Les tissus musculaires des souris envenimées avec le venin natif de *Cerastes cerastes* à une dose sublétales (20 µg/20 g), présentent un envahissement du tissu conjonctif par les hématies. Certaines fibres musculaires de taille et de coloration variables sont soit hypertrophiées, soit atrophiées. A ce stade de l'envenimation, les fibres musculaires sont écartées les unes des autres par un œdème au niveau de l'espace interstitiel (Figure 19B). Ces changements tissulaires sont plus importants avec une dose létale du venin de *Cerastes cerastes* (96 µg/20 g). Dans ce cas, le tissu musculaire apparaît totalement nécrosé. Les polynucléaires sont également présents au niveau des régions altérées, indiquant une infiltration inflammatoire. Ceci laisse suggérer un effet dose-réponse du venin natif (Figure 19C).

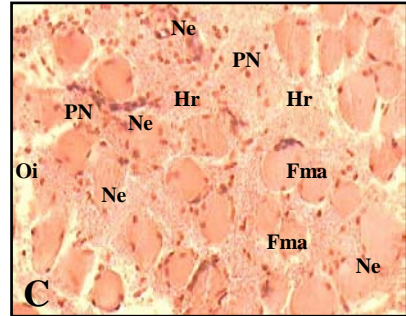
Les altérations tissulaires observées au niveau musculaire des animaux envenimés avec le venin natif de *Cerastes cerastes* (20 µg/20 g et 96 µg/20 g) sont analogues à celles décrites par Fuly et ses collaborateurs (2000) avec le venin de *Lachesis muta* et par Gutiérrez et ses collaborateurs (2000) avec le venin de *Bothrops asper*. Ces auteurs suggèrent l'action de certaines toxines, telles que les PLA₂ sur le sarcolemme des fibres musculaires, conduisant ainsi à la perte de la régulation de la perméabilité membranaire des ions et des macromolécules et donc l'apparition de la myonécrose. Dans le cas du venin de *Vipera aspis aspis*, les dommages des cellules musculaires n'apparaissent que 48 heures après l'injection de ce venin. Ce qui laisse suggérer que l'effet myotoxique du *Vipera aspis aspis* serait le résultat des conditions ischémiques provoquées suite à l'activité hémorragique de ce venin (Komori et Sugihara, 1988).



Témoin NaCl 0,9 %



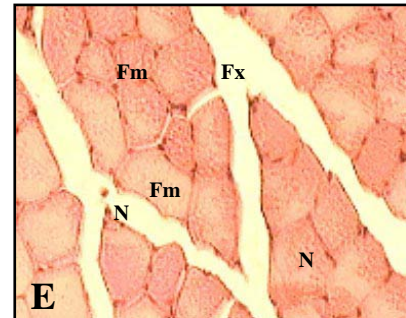
Venin natif (20 µg/ 20 g)



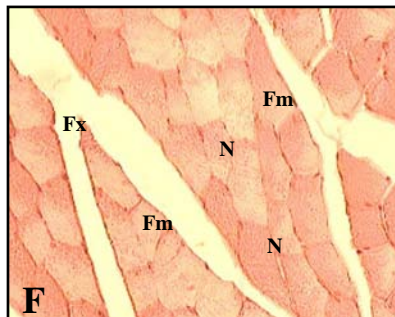
Venin natif (96 µg/ 20 g)



**Venin irradié à 194 Gy/h
(240 µg/ 20 g)**



**Venin irradié à 765 Gy/h
(240 µg/ 20 g)**



**Venin irradié à 1737 Gy/h
(240 µg/ 20 g)**

Figure 19 : Altérations tissulaires observés au niveau du muscle squelettique prélevé sur des souris envenimées avec le venin natif et irradié de *Cerastes cerastes*. Coloration à l'hématoxyline-Eosine, Objectif x 40.

Fm : Fibre musculaire ; **Fma :** Fibre musculaire atrophiée ; **Fmh :** Fibre musculaire hypertrophiée ; **Fx :** Faisceau musculaire ; **Hr :** Hémorragie ; **N :** Noyau ; **Ne :** Nécrose ; **Oi :** Œdème interstitiel ; **PN :** Polynucléée.

La détermination de l'effet du débit de dose d'irradiation gamma sur l'activité myotoxique du venin de *Cerastes cerastes* a été entreprise, en utilisant des rayonnements ionisants gamma à une dose de 2 kGy et trois débits de dose (194, 765 et 1737 Gy/h). L'analyse des tissus musculaires de souris envenimées avec le venin irradié à faible débit de dose (V-194 Gy/h), montre un œdème interstitiel et des fibres musculaires hypertrophiées et pâles avec une nécrose associée à l'hémorragie (Figure 19D). Dans le cas des venins irradiés à moyen et fort débit de dose (V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h), il n'apparaît aucune modification structurale du tissu musculaire (Figures 19E et 19F).

La comparaison des altérations tissulaires provoqués après 3 heures d'injection d'une dose sublétales du venin natif (20 µg/20 g) et celle des venins irradiés (240 µg/20 g), montre que les venins irradiés à moyen et fort débit (V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h) ne provoquent aucun effet myotoxique. Ceci laisse suggérer les rayonnements ionisants gamma provoquent des modifications structurales des molécules responsables de l'activité myotoxique du venin.

III.3. Variation du débit de dose d'irradiation gamma et son effet sur les propriétés immunologiques du venin de *Cerastes cerastes*

III.3.1. Détermination des propriétés antigéniques des venins irradiés par la détermination du titre en anticorps des immun-sérums par ELISA simple

Les immun-sérums préparés suite à une hyper-immunisation avec les différents venins de *Cerastes cerastes* natif et irradiés à 2 kGy et à différents débits de dose : faible (194 Gy/h), moyen (765 Gy/h) et fort (1737 Gy/h) présentent différents titres en anticorps déterminés par ELISA simple (Figure 20).

Le titre de l'immun-sérum anti-venin irradié à une dose de 2 kGy et à moyen débit de dose (Anti-V765 Gy/h) est deux fois plus élevé que celui des immun-sérums anti-venins natif (Anti-Vnatif) et irradié à faible débit de dose (Anti-V194 Gy/h). Il est de 16 fois plus élevé que celui de l'immun-sérum anti-venin irradié à fort débit de dose (Anti-V1737 Gy/h), (Figure 20, Tableau VIII).

Figure 20 : Détermination des titres en anticorps des immun-sérums de lapins hyper-immunisés avec les différentes préparations de venins de *Cerastes cerastes* (natif et irradiés) par ELISA simple.

Tableau VIII : Détermination quantitative des titres en anticorps des immun-sérums expérimentaux de lapin par ELISA simple.

Echantillon sérique	Titre en anticorps des immun-sérums expérimentaux de lapins
Anti-Vnatif	1 024 000
Anti-V194 Gy/h	1 024 000
Anti-V765 Gy/h	2 048 000
Anti-V1737 Gy/h	128 000

L'utilisation d'un moyen débit de dose (765 Gy/h), permet d'obtenir un titre en anticorps plus élevé (2 048 000) que celui obtenu avec le venin natif et les deux venins irradiés permettant une amélioration du pouvoir immunogène du venin irradié à une dose de 2 kGy et à moyen débit de dose (765 Gy/h), (Tableau VIII). Des résultats similaires ont été obtenus après immunisation de lapins avec le venin de *cobra* (Salafranca, 1972), le venin de *Vipera russelli* (Hati et al., 1990), le venin de *Naja naja* (Rogerio et Nascimento, 1995) et le venin de *Crotalus durissus terrificus* (Clissa et al., 1999 ; Ferreira Junior al., 2005) irradié avec des rayonnements ionisantes gamma ou RX. Ces travaux confirment que la résistance des propriétés immunogéniques des molécules du venin aux rayonnements ionisants.

Nascimento et collaborateurs (1996) ont également observé que les agrégats de la crotoxine formés après irradiation gamma à une dose de 2 kGy et un débit de dose de 554 Gy/h induisent une amélioration du titre des anticorps capables de réagir avec la crotoxine native. Cette amélioration des propriétés immunologiques après irradiation gamma serait due à l'agrégation protéique, qui contribue à la formation de molécules de haut poids moléculaire ayant des propriétés plus immunogènes. Baptista et ses collaborateurs en (2004) et (2006), ont également montré que l'ovalbumine irradiée est capable de stimuler le système immunitaire et que les immunoglobulines produites contre l'ovalbumine irradié sont capables de réagir avec la forme native de la protéine.

L'irradiation gamma provoque également des modifications conformationnelles permettant d'exposer les épitopes masqués des protéines (Lee et al., 2002).

III.3.2. Evaluation de la capacité neutralisante par séro-neutralisation des immun-sérums expérimentaux de lapin

L'évaluation de la capacité neutralisante des immun-sérums obtenus en utilisant les antigènes, venin natif ou irradiés, est effectuée par séro-neutralisation. Ce test est réalisé après incubation et injection par voie intrapéritonéale à des souris, de mélanges de doses croissantes de venin natif allant de 3 à 10 DL50 avec les différents échantillons d'immun-sérums (Anti-Vnatif, Anti-V194 Gy/h, Anti-V765 Gy/h et Anti-V1737 Gy/h).

Les résultats expérimentaux montrent que les immun-sérums obtenus contre les venins irradiés sont capables de neutraliser la quasi-totalité de l'activité toxique du venin de *Cerastes cerastes*. L'anti-venin natif (Anti-Vnatif) est capable de neutraliser seulement une dose de 4,50 DL50 comparé aux immun-sérums anti-venins irradiés (Anti-V194 Gy/h, Anti-V765 Gy/h et Anti-V1737 Gy/h), qui eux neutralisent respectivement 5,25 ; 10 et 3,25 DL50 de venin natif (Figure 21).

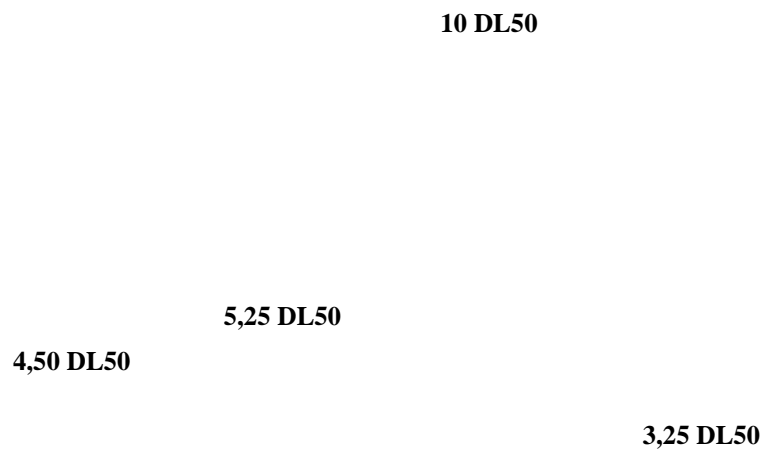


Figure 21 : Neutralisation de la toxicité du venin natif de *Cerastes cerastes* par les immun-sérums expérimentaux anti-venins (natif et irradiés).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Oussedik-Oumehdi et Laraba-Djebari (2008) dans une étude de la capacité neutralisante des immun-sérums dirigés contre le venin de *Cerastes cerastes* (natif et irradié à une dose de 2 kGy). Ces auteurs ont trouvé que l'anti-venin irradié possède une meilleure capacité protectrice vis-à-vis du venin natif comparé à celle de l'anti-venin natif.

Bennacef-Heffar et Laraba-Djebari (2003) ont également montré que le venin de *Vipera lebetina* irradié à une dose de 2 kGy et un débit de dose de 255 Gy/h induit la synthèse d'anticorps ayant de meilleures capacités neutralisantes que l'immun-sérum anti-venin natif.

L'irradiation gamma semble améliorer les propriétés immunologiques du venin irradié à 2 kGy, en utilisant un débit de dose de 765 Gy/h. L'amélioration des propriétés immunologiques est attribuée aux altérations oxydatives des protéines irradiées. Il semblerait que les macrophages scavenger phagocytent préférentiellement les molécules oxydées ou portant des charges négatives, entraînant une meilleure présentation des antigènes (Cardi et al., 1998).

III.4. Purification et caractérisation des protéinases hémorragiques à partir du venin natif de *Cerastes cerastes*

III.4.1. Purification des protéinases hémorragiques du venin de *Cerastes cerastes* par différentes méthodes chromatographiques

Afin d'isoler les protéines présentant une activité hémorragique à partir du venin de *Cerastes cerastes*, ce venin est soumis à différentes techniques chromatographiques (chromatographie d'exclusion moléculaire, échangeuse d'anions, d'affinité et RP-HPLC)

En effet, le fractionnement du venin de *Cerastes cerastes* soumis à une filtration moléculaire sur Sephadex G-75, a permis de retrouver l'activité hémorragique dans les fractions GF₁ et GF₂ (Figure 22). La fraction GF₁ soumise à une chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE Sephadex A-50, nous a permis de retrouver l'activité hémorragique dans les sous fractions D₁ et D₂ (Figure 23). L'activité hémorragique de fraction D₁ soumise à une chromatographie d'affinité, est retrouvée au niveau de la fraction A1 (Figure 24), puis dans la sous fraction CcH1 issue de la RP8-HPLC de la fraction A₁ (Figure 25). L'analyse électrophorétique de la fraction hémorragique (CcH1) par SDS-PAGE, montre une seule bande protéique de 25 kDa (Figure 26). De même, cette molécule hémorragique (CcH1) présente une activité protéolytique, mais semble être dépourvue des activités estérasiqque et phospholipasiqque (Tableau IX).

Tableau IX : Activités enzymatiques du venin de *Cerastes cerastes* et de la molécule hémorragique purifiée (CcH1) sur différents substrats.

Enzymes	Activité	
	Venin	CcH1
Protéase (A _{280 nm} / mg)	0,842	0,375
Estérase (A _{253 nm} / mg)	0,215	0,000
Phospholipase A ₂ (A _{540 nm} / mg)	0,370	0,000

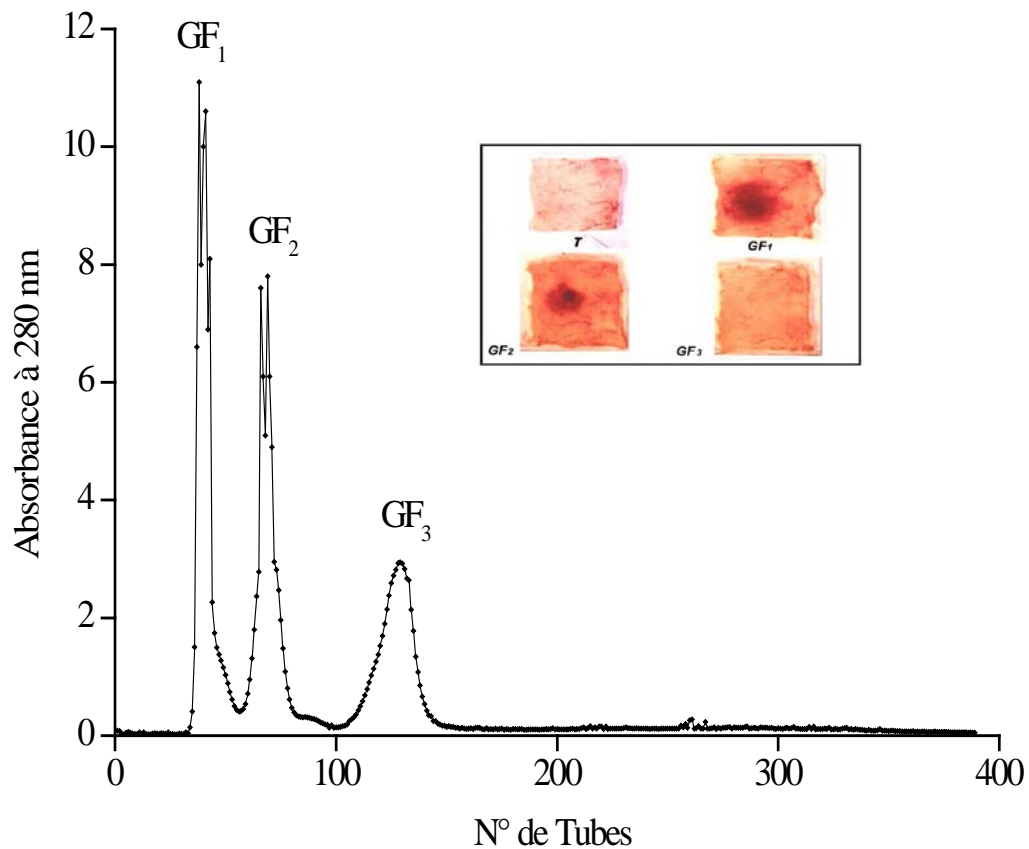


Figure 22 : Fractionnement du venin natif de *Cerastes cerastes* par filtration moléculaire sur Sephadex G-75, en utilisant une colonne de type Pharmacia (2,5 cm x 100 cm). L'éluion a été réalisée avec un tampon d'AcNH₄ 0,1 M, pH 8,5. Le débit est maintenu constant à 18 ml/heure.

Les fractions GF₁ et GF₂ sont douées d'une activité hémorragique.

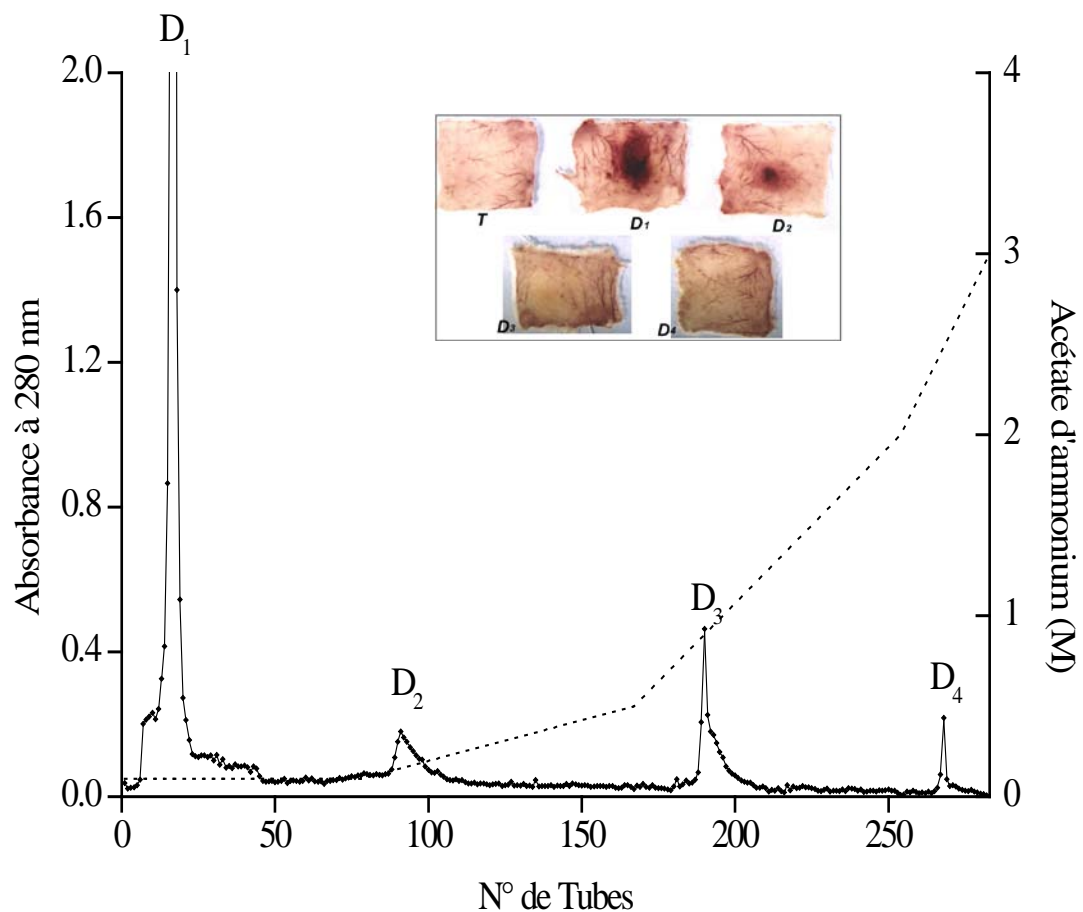


Figure 23 : Chromatographie échangeuse d’anions sur DEAE Sephadex A-50 de la fraction hémorragique GF₁, issue de la chromatographie d’exclusion moléculaire, en utilisant une colonne Pharmacia (1,5 cm x 27 cm) et un tampon d’élution d’AcNH₄ 0,1 M, pH 8,5, suivi d’un gradient linéaire d’AcNH₄ allant de 0,1 M à 0,5 M, pH 8,5 et d’une élution à l’équilibre avec l’AcNH₄ à 2 M ensuite à 3 M, pH 8,5. Le débit est maintenu constant à 18 ml/heure.

Les fractions D₁ et D₂ présentent une activité hémorragique.

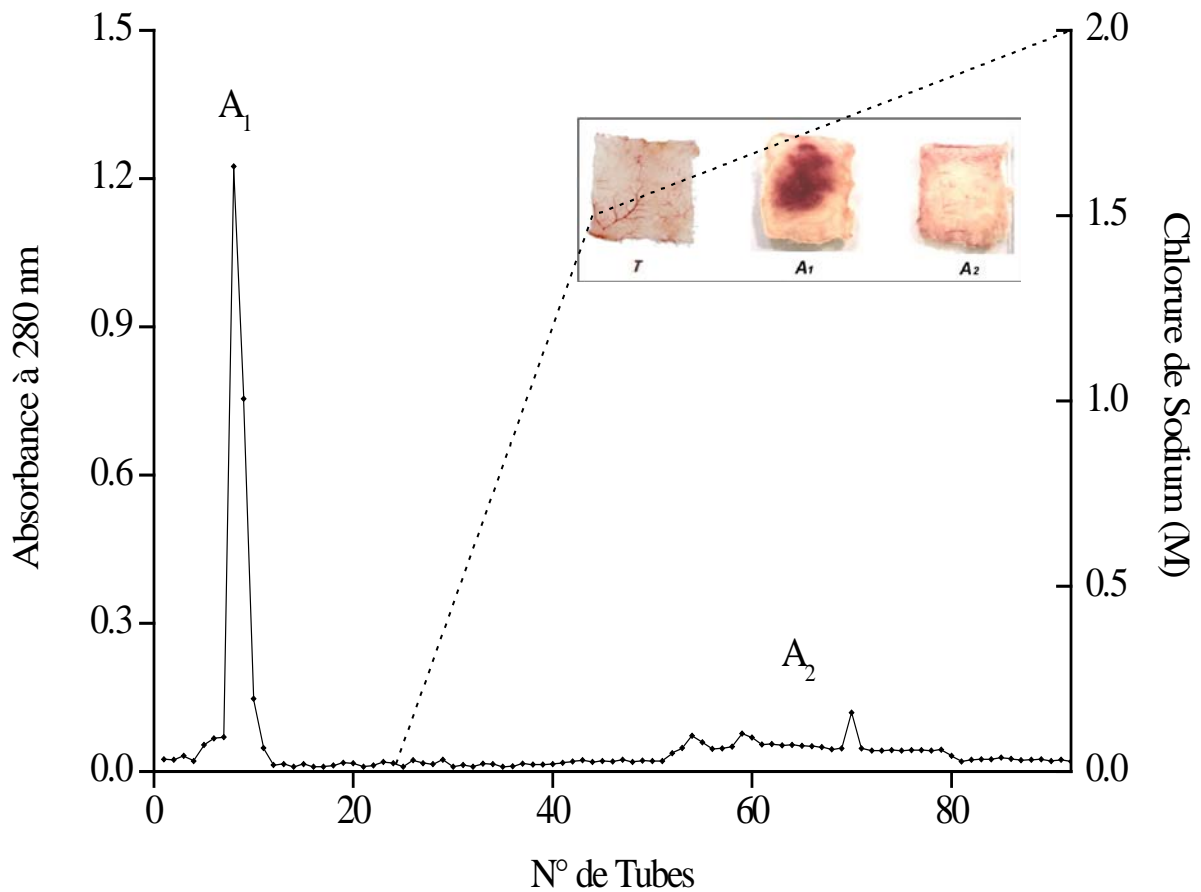


Figure 24 : Chromatographie d'affinité sur Arginine Sepharose 4B de la fraction D₁, obtenue par chromatographie échangeuse d'anions, en utilisant une colonne (1,5 cm x 6 cm) et un tampon d'élution de Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, suivi d'un gradient linéaire de NaCl allant de 0 M-1,5 M, pH 7,5 et d'une élution à l'équilibre avec un tampon de Tris-HCl 0,05, NaCl 2 M, pH 7,5. Le débit d'élution est maintenu constant à 18 ml/heure.

La fraction A₁ est douée d'une activité hémorragique.

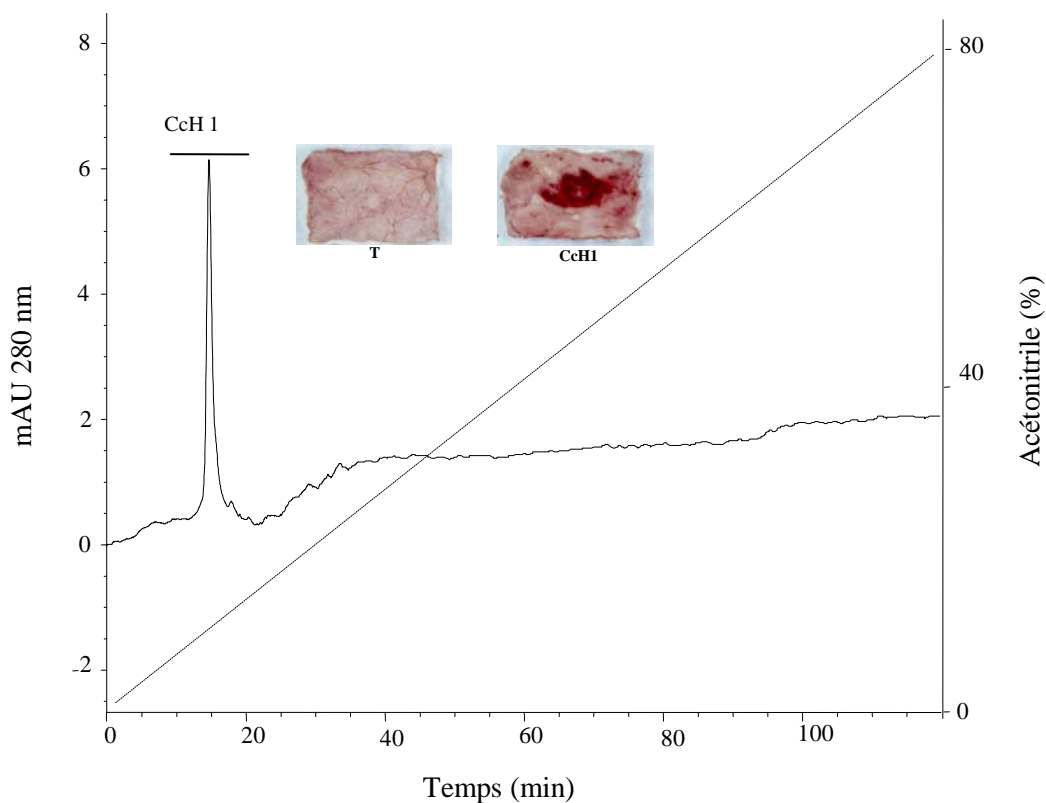


Figure 25 : Purification de la fraction hémorragique A₁, issue de la chromatographie d'affinité, par RP-HPLC en utilisant une colonne C8 (4,6 x 150 mm, avec un diamètre de 5 µm). L'éluion est effectuée en utilisant un gradient de 0 à 80 % (V/V) de tampon B (Acide trifluoroacétique à 0,1 % dans l'acétonitrile) dans le tampon A (Acide trifluoroacétique à 0,1 % dans l'eau) avec un débit de 1 ml/min.

La fraction CcH1 présente une activité hémorragique.

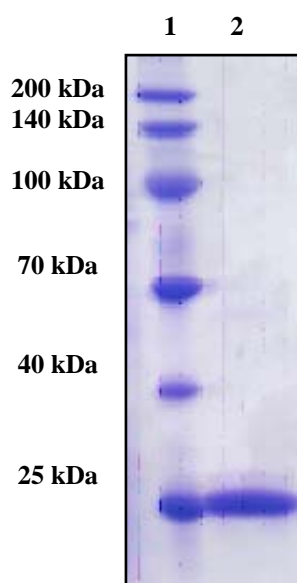


Figure 26 : Profil électrophorétique de la fraction hémorragique CcH1 (piste 2) du venin natif de *Cerastes cerastes* sur gel de polyacrylamide (15 %) en présence de SDS (10 %).

III.4.2. Caractérisation biochimique de la molécule hémorragique CcH1 purifiée à partir du venin de *Cerastes cerastes*

III.4.2.1. Détermination de l'activité hémorragique de la molécule hémorragique CcH1 purifiée à partir du venin de *Cerastes cerastes* en utilisant des tests macroscopique et microscopique

La détermination de l'activité hémorragique de la molécule hémorragique CcH1 purifiée a été effectuée selon la méthode de Kondo et ses collaborateurs (1960) modifiée par Guitérrez et ses collaborateurs (1985). Les souris (20 ± 2 g) ont été soumis à une injection par voie sous cutanée au niveau de la peau dorsale, avec les différentes préparations de venin natif ou de CcH1 à des doses croissantes allant de 10 à 40 μ g/20 g. Le lot de souris témoins reçoit le même volume de NaCl 0,9 %. Deux heures après l'injection, les souris sont sacrifiées, leurs peaux dorsales prélevées, les spots hémorragiques mesurés et ensuite soumis à une analyse histologique.

L'analyse macroscopique de la peau dorsale des souris envenimées avec le venin de *Cerastes cerastes* ou de sa fraction CcH1, a montré que la molécule CcH1 est douée d'une activité hémorragique moins importante que celle du venin avec une DMH estimée respectivement de 16 μ g/20 g comparée à celle du venin qui est de 3 μ g/ 20 g de souris (Figures 27 et 28).

Afin d'observer les altérations structurales provoquées par la biomolécule hémorragique CcH1 (20 μ g/20 g), une étude histologique des peaux de souris envenimées a été entreprise. L'observation microscopique de la peau des souris témoins montre une structure normale constituée d'un épiderme mince comportant des mélanocytes, parsemés d'une couche lâche de kératine et d'un derme bien organisé et irrigué par un grand nombre de vaisseaux avec une zone papillaire et réticulaire bien distinctes renfermant des follicules pileux (Figure 29A).

Les coupes histologiques de la peau des souris envenimées avec le venin de *Cerastes cerastes* (20 μ g/20 g) ou de sa fraction hémorragique purifiée (CcH1) montrent un aspect complètement désorganisé avec de profondes altérations structurales, telles que le brunissement de l'épiderme, qui serait dû notamment à une infiltration par les mélanocytes, avec rupture et disparition de ce dernier dans certaines zones et la formation de l'œdème. Des aires hémorragiques sont également observées au niveau du derme ainsi qu'une infiltration inflammatoire (Figures 29B et 29C). Cependant, ces altérations sont moins importantes après injection de la CcH1. En effet, l'hémorragie est moins prononcée en comparaison à celle provoquée par le venin natif à la même dose. Ceci est en accord avec le résultat de la DMH, qui est 5 fois supérieure que celle du venin natif.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Borkow et *al.*, (1993) et Gutiérrez et *al.*, (1995) sur les métalloprotéinases hémorragiques "BH2" et "BaP1" isolées à partir du venin de *Bothrops asper* et par Gomes et *al.*, (2009) sur la métalloprotéinase hémorragique "BthMP" purifiée à partir du venin de *Bothrops moojeni*. Ces protéinases présentent toutes une faible activité hémorragique comparée à celle du venin.



Témoïn NaCl 0,9 %



Venin (20 µg/ 20 g)



CcH1 (20 µg/20 g)

Figure 27 : Aspect des spots hémorragiques obtenus deux heures après injection de souris par voie sous cutanée avec le venin de *Cerastes cerastes* ou de la molécule hémorragique purifiée (CcH1).

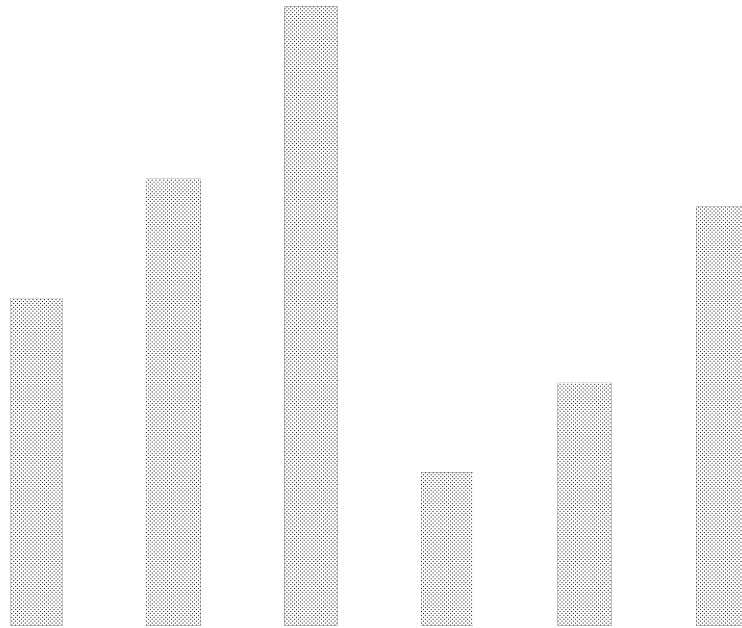


Figure 28 : Détermination de l'activité hémorragique après deux heures d'envenimation des souris par voie sous cutanée avec différentes doses de venin ou de la molécule hémorragique (CCH1) purifiée. $DMH_{V\text{-natif}} = 3 \mu\text{g}/20 \text{ g}$; $DMH_{CCH1} = 16 \mu\text{g}/20 \text{ g}$.

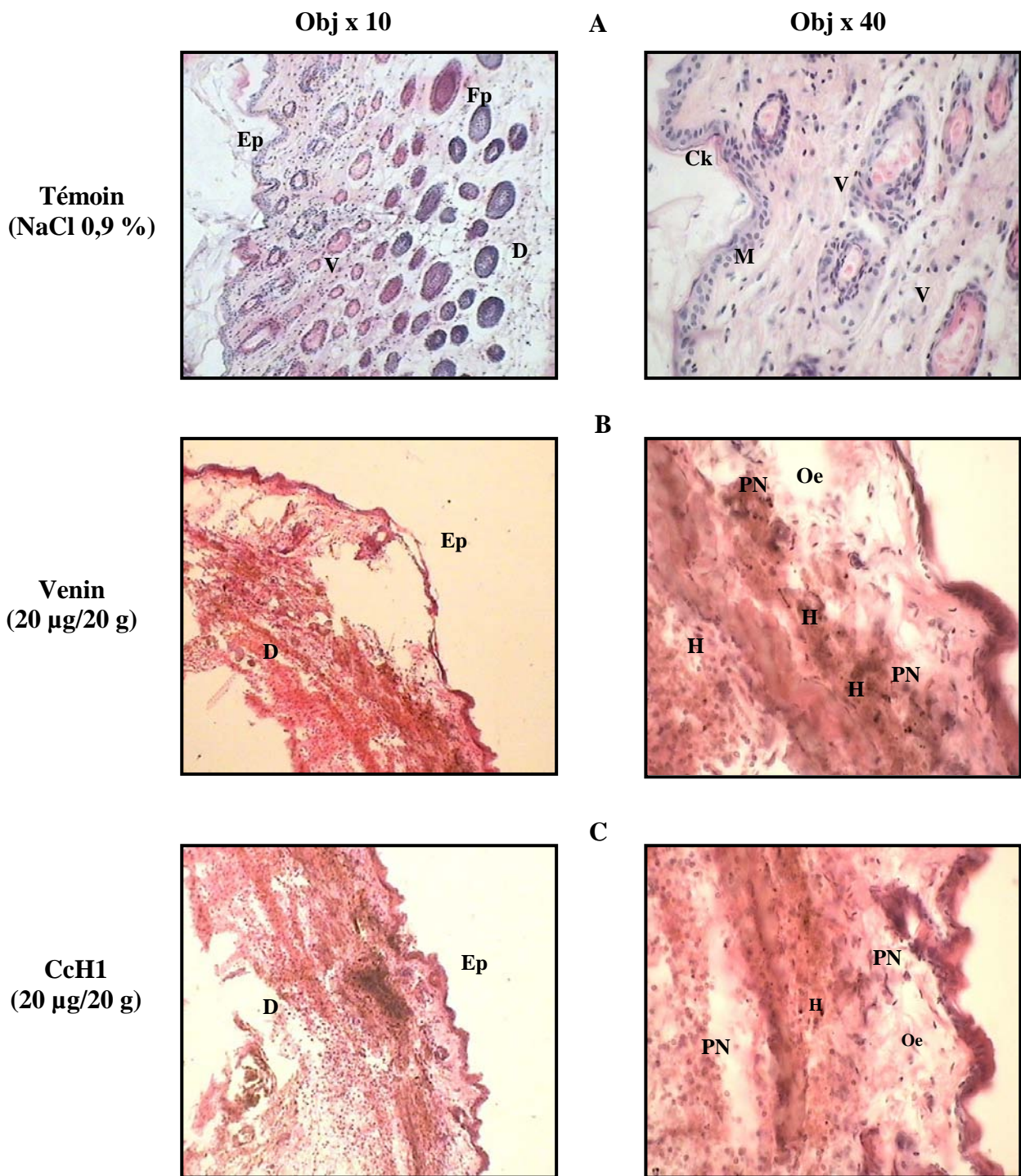


Figure 29 : Altérations tissulaires observées au niveau de la peau dorsale des souris envenimées avec une dose de 20 µg/20 g de venin natif ou de sa molécule hémorragique purifiée. Coloration à l'hématoxyline-éosine.

Ck : Couche kératinisée ; **D :** Derme ; **Ep :** Epiderme ; **Fp :** Follicule pileux ; **H :** Hémorragie ;
M : Mélanocytes ; **Oe :** Œdème ; **PN :** Polynuclée ; **V :** Vaisseau sanguin.

III.4.2.2. Effet des inhibiteurs protéasiques sur l'activité hémorragique et protéolytique de la molécule hémorragique CcH1

Afin d'examiner l'implication des métalloprotéinases ou des sérine protéinases dans l'activité hémorragique et protéolytique de la molécule CcH1, trois inhibiteurs, l'EDTA (chélateur de métaux) la 1, 10-phénanthroline (inhibiteur des zinc-métalloprotéinases) et le PMSF (inhibiteur des sérines protéinases) ont été testés après leur incubation pendant 1 heure à 37°C avec les échantillons de la molécule hémorragique CcH1 (20 µg/20 g).

Les résultats obtenus en présence de 5 mM d'EDTA et de la 1,10-phenanthroline montrent que ces deux substances sont capables d'inhiber totalement l'activité protéolytique et hémorragique de la biomolécule CcH1. Le PMSF (5 mM) quand à lui n'a aucun effet sur l'activité hémorragique et l'activité protéolytique de cette molécule (Figure 30). Ces résultats suggèrent que CcH1 serait une métalloprotéinase à zinc. Ils sont en accord avec les travaux de Gutiérrez et *al.*, (1995), de Franceschi et *al.*, (2000) et de Aguilar et *al.*, (2001) sur les hémorragines purifiées à partir du venin de *Bothrops asper* et de *Crotalus vegrandis*.

III.4.2.3. Effet de la température sur l'activité hémorragique et protéolytique de la molécule hémorragique CcH1

Afin de caractériser les molécules du venin de *Cerastes cerastes* responsables de l'hémorragie, des solutions de 100 µl contenant la fraction CcH1 (20 µg/20 g) sont chauffées à différentes températures (30, 40, 50, 60 et 70°C) pendant 30 minutes. Après ces différentes incubations, l'activité hémorragique et protéolytique est déterminée.

Les résultats obtenus montrent une réduction significative de l'activité hémorragique et protéolytique jusqu'à abolition de ces deux activités biologiques à une température égale à 70°C (Figure 31). Ceci permet de suggérer que les molécules induisant l'hémorragie sont thermosensibles.

Stroka et ses collaborateurs (2005) ont également montré que les deux activités (hémorragique et protéolytique) de la métalloprotéinase hémorragique BlaH1 purifiée à partir du venin de *Bothrops lanceolatus* sont complètement inhibées lorsque cette protéinase est chauffée à une température au delà de 50°C.

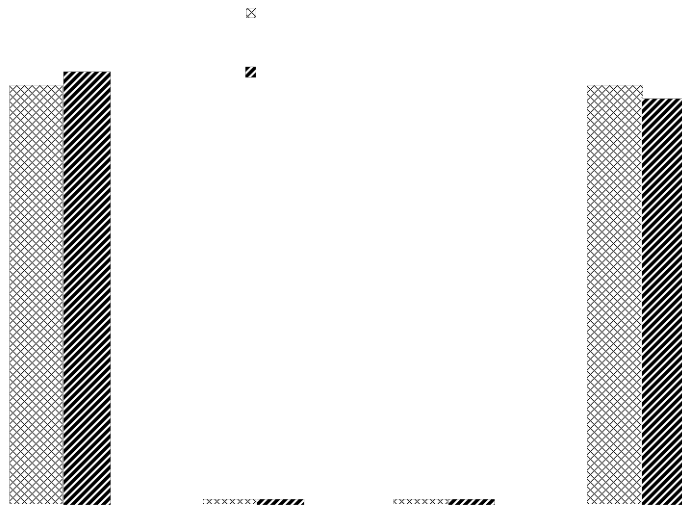


Figure 30 : Action des inhibiteurs de protéinases (EDTA, 1,10-phenanthroline et le PMSF à une concentration de 5 mM) sur l'activité hémorragique et protéolytique de la molécule hémorragique CcH1 purifiée à partir du venin de *Cerastes cerastes*.

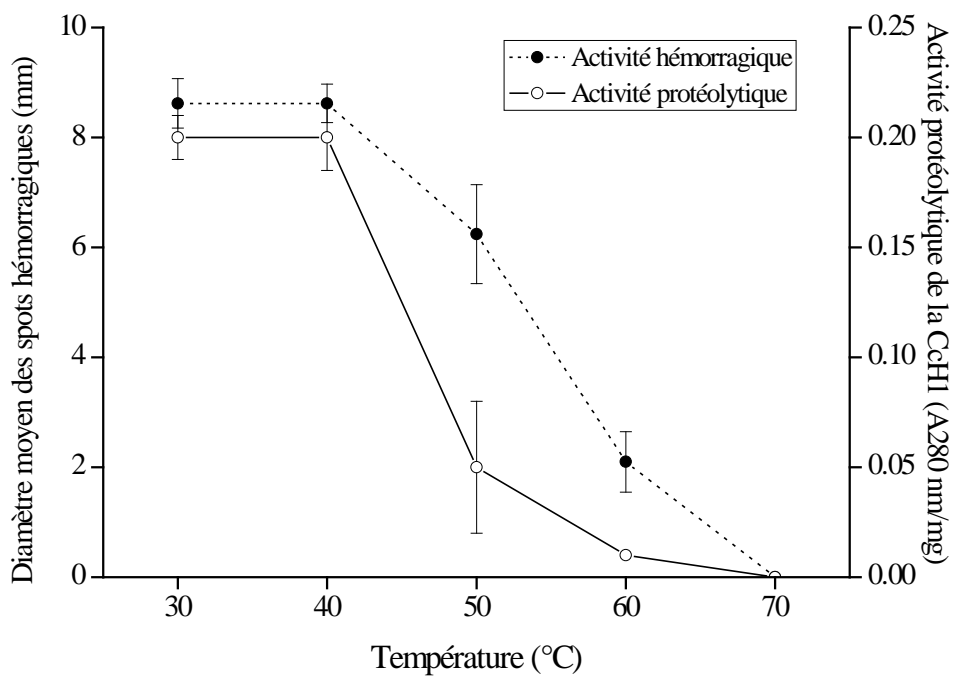


Figure 31 : Effet de la température sur l'activité hémorragique et protéolytique de la molécule hémorragique CcH1 purifiée à partir du venin de *Cerastes cerastes*.

Discussion générale

IV. Discussion générale

L'envenimation ophidienne se caractérise par une série complexe de perturbations physiopathologiques locales et systémiques, incluant les inflammations extensives évoluant vers la nécrose ou la gangrène, nécessitant souvent l'amputation du membre atteint, des troubles hémorragiques sous la forme d'une hémorragie locale ou diffuse, des troubles rénaux et éventuellement un choc cardiovasculaire caractéristique des envenimations sévères.

Les venins de *Viperidae* constituent une source potentielle de protéines bioactives. Ces venins sont caractérisés par une forte activité hémorragique dont sont responsables notamment les métalloprotéinases hémorragiques. Certains constituants du venin sont capables d'interférer dans les mécanismes hémostatiques et de créer des conditions ischémiques aggravant l'envenimation. Les protéinases, les hyaluronidases, les estérases et les phospholipases A₂ sont responsables de l'augmentation de la perméabilité capillaire conduisant à l'œdème pulmonaire (Bjarnason et Tu, 1978 ; Yamaguchi et *al.*, 2001). Les phospholipases A₂ et les protéinases sont impliquées dans les lésions pouvant toucher le cortex rénal (Boer-Lima et *al.*, 1999). Toutes ces activités des venins de *Viperidae* conduisent souvent à un tableau clinique alarmant ou l'immunothérapie constitue le seul traitement efficace de l'envenimation.

L'immunothérapie anti-vipérine consiste en l'administration d'anti-venins produits par hyper-immunisation de chevaux. L'anti-venin anti-vipérin utilisé en Algérie est bivalent. Il est dirigé contre le venin de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina*. En raison de la toxicité élevée de ces venins, les animaux producteurs subissent diverses atteintes pathologiques, pouvant, à long terme, diminuer l'efficacité du système immunitaire et donc réduire la qualité des anti-venins produits. A cet effet, une irradiation gamma du venin de *Cerastes cerastes* a été entreprise et cela dans le but d'atténuer sa toxicité.

Les travaux effectués dans cette étude ont porté, d'une part, sur la caractérisation des propriétés biochimiques et biologiques des venins irradiés, en vue de déterminer les modifications subis par ces derniers sous l'effet des rayonnements gamma. D'autre part, sur l'examen de l'apport de l'irradiation gamma dans l'amélioration des propriétés immunogènes des venins irradiés pour la préparation d'immun-sérums hautement neutralisants.

En effet, le venin de *Cerastes cerastes* a été irradié à une dose de 2 kGy, en utilisant trois débits de dose : faible (194 Gy/h), moyen (765 Gy/h) et fort (1737 Gy/h) pour donner respectivement trois venins de *Cerastes cerastes* irradiés V-194 Gy/h, V-765 Gy/h et V-1737 Gy/h. Ces trois venins modifiés ont subi plusieurs tests de caractérisation avant d'être utilisés dans des protocoles d'immunisation.

L'irradiation gamma du venin de *Cerastes cerastes* aux différents débits de dose a montré que la toxicité est atténuée jusqu'à 25 DL50 (1200 µg/20 g). Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux, qui montrent que l'irradiation gamma des venins permet la diminution de leur toxicité (Hati et *al.*, 1990 ; Murata et *al.*, 1990 ; Souza-Filho et *al.*, 1992 ; Nascimento et *al.*, 1996 ; Clissa et *al.*, 1999 ; Spencer, 2000 ; Oliveira et *al.*, 2009 ; Baptista et *al.*, 2010). Cette perte de la toxicité peut être attribuée à des modifications structurales des composants toxiques du venin. L'irradiation gamma serait à l'origine d'altérations de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire par rupture des ponts

disulfures et des liaisons hydrogènes, conduisant ainsi à une perte de fonction biologique des composants toxiques du venin (Spencer et *al.*, 1997 ; Souza et *al.*, 2002 ; Carponi et *al.*, 2009).

En effet, l'analyse chromatographique et électrophorétique des venins irradiés de *Cerastes cerastes* montre une modification drastique dans les profils chromatographique et électrophorétique. De nombreux pics et de bandes protéiques ont complètement disparus, une traînée est également observée sur les profils électrophorétiques. Ces résultats confirment la baisse de solubilité et la dégradation et/ou l'agrégation des protéines du venin sous l'effet des rayonnements gamma. Les travaux de Spencer, (1996) ; Bennacef-Heffar et Laraba-Djebari, (2003) ; Oussedik-Oumehdi et Laraba-Djebari, (2008) et Baptista et *al.*, (2010), rapportent les mêmes observations. Les radicaux libres libérés lors de ce processus peuvent altérer la structure des protéines en agissant sur les ponts disulfures. Les travaux de Souza-Filho et ses collaborateurs (1992) ont rapporté que l'irradiation gamma de la crotoxine, toxine isolée à partir du venin de *Crotalus durissus terrificus* et présentant une activité phospholipase A₂, conduit à la rupture de six ponts disulfures. Cette rupture affecte l'activité phospholipasique de cette toxine.

Clissa et ses collaborateurs (1999) ont également constaté que l'irradiation gamma du venin de *Crotalus durissus terrificus* a conduit à la formation d'agréats solubles et non solubles. Il a été également rapporté une réduction du nombre de bandes polypeptidiques lors de l'analyse électrophorétique de la bothropstoxine-1, toxine purifiée à partir du venin de *Bothrops jararacussu*, irradiée au Cobalt-60 (Baptista et *al.*, 2006 ; Carponi et *al.*, 2009).

Moon et Song (2001) ont montré que l'irradiation de l'ovalbumine et l'ovomucoïde en solution au Cobalt-60 altère leurs structures secondaires et tertiaires par fragmentation et agrégation des chaînes polypeptidiques due aux radicaux libres et aux produits moléculaires générés. De même, les profils électrophorétiques de l'ovalbumine et l'ovomucoïde sont modifiés.

Cette perte de toxicité peut également être corrélée à la diminution des activités enzymatiques du venin. Dans cette étude, les résultats obtenus montrent que les venins irradiés de *Cerastes cerastes* à une dose fixe de 2 kGy et aux différents débits de dose utilisés présentent une diminution considérable des activités protéolytique et phospholipasique. Cette diminution est dépendante du débit de dose d'irradiation gamma appliqué sur le venin. Des résultats similaires ont été décrit par Murata et ses collaborateurs (1990) et par Clissa et collaborateurs (1999), qui ont montré que l'irradiation gamma du venin de *Crotalus durissus terrificus* à une dose de 2 kGy aux débits de doses de 391 Gy/h et de 900 Gy/h, réduit sa toxicité d'un facteur de 2,7 et 5 respectivement. De même, les travaux de Hati et collaborateurs en (1990), ont révélé une réduction des activités protéolytiques, phosphodiesterase et hyaluronidase du venin de *Vipera russelli* soumis à une irradiation gamma.

Les venins de *Viperidae* sont très hémorragiques. L'hémorragie est d'abord locale au niveau du site de la morsure, puis devient systémique s'étend vers les différents organes après diffusion du venin. Les métalloprotéinases de venins de *Viperidae* sont connues pour leur activité hydrolytique sur la lame basale des vaisseaux sanguins et sur les composants de la matrice cellulaire, l'inactivation de ces enzymes peut affecter directement l'activité toxique du venin.

Dans cette étude, l'activité hémorragique du venin de *Cerastes cerastes* présente avec une DMH de 3 µg/20 g. L'étude histopathologique de cette activité laisse apparaître de nombreuses altérations tissulaires au niveau de la peau. Il apparaît une destruction de la structure de l'épiderme et des follicules pileux. Il est observé aussi des zones hémorragiques et oedématisées au niveau de la jonction dermo-épidermique entraînant un détachement de l'épiderme ainsi qu'une infiltration inflammatoire.

Des lésions histopathologiques analogues à celles observées avec le venin de *Cerastes cerastes* ont été décrites avec un certain nombre d'autres venins, notamment le venin de *Hippasa partita* et de *Bothrops asper* après une envenimation des souris. Il apparaît au niveau de la peau dorsale, une désorganisation totale du derme et de l'épiderme avec rupture et disparition de ce dernier dans certaines zones. Une hémorragie est également observée dès les premières minutes qui suivent l'injection du venin (Nagaraju et al., 2007 ; Escalante et al., 2009 ; Gutiérrez et al., 2009b).

Après irradiation à moyen et fort débit de dose, l'activité hémorragique du venin de *Cerastes cerastes* est complètement abolie. L'irradiation gamma semble également être à l'origine d'une perte de fonction biologique du venin. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Souza et collaborateurs (2002) montrant que l'irradiation gamma du venin de *Bothrops jararacussu* à la dose de 2 kGy abolie son activité neurotoxique et myotoxique au niveau de la jonction neuromusculaire. Dans une étude de l'effet de la dose d'irradiation gamma sur les activités biologiques du venin de *Cerastes cerastes*, Abib et Laraba-Djebari (2003) et Oussedik-Oumehdi et Laraba-Djebari (2008) ont rapporté que l'irradiation gamma de ce venin à une dose de 2 kGy abolie son activité oedématisée, hémorragique, myotoxique et dermonécrotique.

L'activité protéolytique des métalloprotéinases est Zn^{+2} dépendante (Bjarnason et Fox, 1994 ; Omori-Satoh et al., 2000 ; Wang et al., 2005 ; Muniz et al., 2008), alors que l'activité hémorragique est dépendante de l'activité protéolytique (Bjarnason et Fox, 1994 ; Anai et al., 2002 ; Moraes et Selistre-de-Araujo, 2006 ; Escalante et al., 2009). Une altération de la fixation de l'ion Zn^{+2} sous l'effet des rayonnements gamma peut également inactiver ces enzymes. Les rayonnements gamma peuvent avoir d'autres effets sur la structure tridimensionnelle de ces métalloprotéinases hémorragiques, aboutissant ainsi à une inactivation enzymatique.

Les travaux de Sanner et Pihl (1969) ont montré que l'inactivation des enzymes sous l'effet de l'irradiation gamma semble être le résultat d'une altération de la structure générale de l'enzyme par rupture des ponts disulfures et des liaisons hydrogènes lui faisant perdre sa configuration native ou d'une altération au niveau du site actif.

Boni-Mitake et collaborateurs (2001) ont irradié au ^{60}Co la crotamine, qui est une toxine isolée du venin de *Crotalus durissus terrificus* et qui induit des spasmes paralytiques du muscle squelettique. Ces auteurs ont observé une modification du comportement électrophorétique de la toxine irradiée, suggérant une altération structurale. Ils ont également constaté une réduction de 48 % de sa toxicité.

Les rayons gamma provoquent la radiolyse des molécules d'eau produisant des radicaux libres. Ces radicaux réagissent avec les macromolécules, c'est l'effet indirect de l'irradiation gamma. Cet effet indirect est à l'origine de 99,9 % des altérations structurales occasionnées aux protéines (Kempner, 2002 ; Oliveira et al., 2007). Les radicaux libres induisent des réactions de désamination et de rupture des ponts disulfures. Les groupements thiols peuvent être à l'origine de la formation de nouveaux ponts disulfures entre différentes protéines, formant ainsi des agrégats de haut poids moléculaire non toxiques mais plus immunogènes (Schessler et Davies, 1983 ; Nascimento et al., 1996 ; Spencer, 2000 ; Baptista et al., 2010).

Les venins de *Cerastes cerastes* (natif et irradiés), ont été utilisés dans des protocoles d'immunisation de lapins, afin de déterminer l'effet de l'irradiation gamma sur les propriétés immunologiques du venin de *Cerastes cerastes*.

La caractérisation immunologique des immun-sérums préparés montre, d'une part, que les anticorps anti-venins irradiés sont capables de reconnaître les protéines du venin natif. D'autre part, le débit de dose d'irradiation gamma serait un des paramètres qui interviendrait dans l'amélioration de l'immunogénicité du venin. En effet, le titre en anticorps de l'immun-sérum anti-venin irradié à 2 kGy et à moyen débit de dose est deux fois plus élevé que celui des immun-sérums anti-venins natif et irradiés à faible et fort débits de dose. Ainsi, les travaux de Ferreira Junior et ses collaborateurs (2005) ont constaté que l'immun-sérum anti-venin de *Crotalus durissus terrificus* irradié à une dose de 2 kGy et un débit de dose de 5,25 kGy/h, induit la production d'anticorps avec une capacité neutralisante supérieure à celle obtenue avec l'immun-sérum anti-venin natif. Cette forte réponse immunitaire des venins irradiés peut être associée à un changement de la pharmacocinétique des composants de ces venins. En effet, selon Cardi et ses collaborateurs (1998), les modifications structurales de la crotoxine irradié à 2 kGy ne mènent plus la molécule vers les sites nerveux mais elle est captée par les macrophages.

La dose d'irradiation ainsi que son débit sont des facteurs limitants pour une meilleure détoxification et préservation des propriétés immunologiques des molécules du venin. En effet, l'utilisation d'un fort débit de dose (1737 Gy/h), permet d'obtenir un faible titre en anticorps en comparaison avec les immun-sérums anti-venins natif et irradié à faible et moyen débit de dose. Le venin de *Cerastes cerastes* semble avoir subi une totale détoxification après irradiation à un débit de dose de 1737 Gy/h. Les travaux de Lauhatirananda et al., (1970) quand à eux montrent que l'application d'une dose élevée de rayonnements gamma (3 Mrad et 4 Mrad) au venin de *cobra* peut induire des altérations des propriétés immunologiques des molécules protéiques du venin. Clissa et collaborateurs (1999) ont montré que l'immun-sérum obtenu avec le venin de *Crotalus durissus terrificus* irradié à 2 kGy est plus efficace que celui produit contre le venin irradié à 5 kGy et 10 kGy.

Dans une étude réalisée sur l'ovalbumine irradiée aux différentes doses d'irradiation gamma (1,5 ; 2 ; 5 ; 10 ; 20 ; 50 et 100 kGy), Masuda et ses collaborateurs (2000) ont révélé que l'ovalbumine irradié à faible dose (1,5 ; 2 et 5 kGy) subit un changement structurale négligeable et par conséquent, l'ovalbumine garde sa structure native, tandis que l'irradiation à une forte dose (10 ; 20 ; 50 et 100 kGy) permet d'obtenir une ovalbumine complètement dénaturée.

La capacité des immun-sérums préparés à neutraliser l'activité toxique du venin de *Cerastes cerastes* a été également testée. En effet, la comparaison entre la nouvelle DL50 obtenue avec l'immun-sérum expérimental Anti-Vnatif (1500 DL50/ml de sérum/kg d'animal) et celles obtenues avec les trois autres immun-sérums Anti-V194 Gy/h (1750 DL50/ml de sérum/kg d'animal), Anti-V765 Gy/h (3083 DL50/ml de sérum/kg d'animal) et Anti-V1737 Gy/h (1083,33 DL50/ml de sérum/kg d'animal) montre une amélioration du pouvoir immunogène des protéines des venins irradiés. Des résultats similaires ont été rapportés par Clissa et ses collaborateurs (1999). Ces chercheurs ont montré qu'un volume de 1 ml de sérum anti-venin de *Crotalus durissus terrificus* irradié à 2 kGy neutralise 297 µg de venin natif, alors que le même volume de sérum anti-venin natif peut neutraliser seulement 165 µg de venin natif.

Par ailleurs, l'étude réalisée par Oussedik-Oumehdi en 2007 sur le venin de *Cerastes cerastes*, montre que la nouvelle DL50 obtenue avec l'immun-sérum anti-venin irradié à une dose de 2 kGy et un débit de dose de 255 Gy/h est de 2666,5 DL50/ml de sérum/kg d'animal. Cette DL50 est supérieure à celle obtenue avec l'Anti-V194 Gy/h, mais inférieure à celle obtenue avec l'Anti-V765 Gy/h. Ceci laisse conclure que le débit de dose est un paramètre important, qui influence l'amélioration du pouvoir immunogène des protéines du venin de *Cerastes cerastes* après irradiation. A la lumière de ces résultats, il semblerait que, l'irradiation du venin de *Cerastes cerastes* à une dose de 2 kGy et un débit de dose de 765 Gy/h est un outil intéressant pour la préparation d'immun-sérums hautement neutralisants.

L'amélioration des propriétés immunologiques après irradiation gamma serait dû à l'agrégation protéique qui contribue à la formation de molécules de haut poids moléculaire ayant des propriétés plus immunogènes (Nascimento et al., 1996). Cette constatation n'est pas suffisante, car une amélioration des propriétés immunogènes a été rapportée sans agrégation protéique importante. En effet, la protéine recombinante "heat shock protein" irradiée au Cobalt-60 du *Mycobacterium leprea*, induit une synthèse d'anticorps de capacité neutralisante supérieure à celle des anticorps induits par la forme native de cette protéine, en absence d'agrégation protéique (Pinho et al., 1995).

L'amélioration des propriétés immunologiques serait due à une meilleure présentation des antigènes irradiés par les cellules immunocompétentes (macrophages). En effet, l'irradiation gamma entraîne des altérations structurales oxydatives au sein des molécules irradiées. Goldstein et ses collaborateurs (1979) et Cardi et ses collaborateurs (1998) rapportent que les macrophages "scavenger" phagocytent de façon préférentielle les antigènes oxydés ou portant des charges négatives.

La purification et la compréhension du mécanisme d'action des composants du venin, responsables de divers effets pathophysiologiques, permettraient d'améliorer la sérothérapie anti-venimeuse, qui reste à l'heure actuelle, le seul traitement spécifique des envenimations.

Ce travail a porté également, sur la purification des molécules responsables de l'activité hémorragique du venin de *Cerastes cerastes*. Pour cela, ce venin a été soumis à différentes techniques chromatographiques (chromatographie d'exclusion moléculaire, échangeuse d'anions, d'affinité et RP-HPLC). En effet, lorsque le venin natif a été soumis à une filtration moléculaire sur Sephadex G-75, l'activité hémorragique a été retrouvée dans les fractions GF1 et GF2. Lorsque la fraction GF1 a été séparée par chromatographie

échangeuse d'anions sur DEAE Sephadex A-50, l'activité hémorragique a été retrouvée dans les sous fractions D1 et D2. Par ailleurs, en soumettant la fraction D1 à une chromatographie d'affinité, l'activité hémorragique a été retrouvée au niveau de la fraction A1, puis dans la sous fraction CcH1 issue de la RP8-HPLC de la fraction A1.

Des résultats similaires, où l'activité hémorragique d'un venin se retrouvait répartie entre les différentes sous fractions obtenues après purification, ont été décrit par les travaux de Mebs et Panholzer, (1982) sur le venin de *Bitis arietans*, de Xu et collaborateurs (1981), de Mori et collaborateurs (1984) sur le venin d'*Agkistrodon acutus* et de Mandelbaum et al., (1984) sur le venin de *Bothrops neuwiedi*, qui ont mis en évidence plusieurs composants hémorragiques dans ces venins.

Après les différentes tentatives de purification, il nous a été permis de constater que l'activité hémorragique du venin de *Cerastes cerastes* semble être liée à la présence dans le venin de la molécule CcH1, ayant une masse moléculaire de 25 kDa, suggérant qu'elle appartient à la classe I des métalloprotéinases hémorragiques. Cette classe des métalloprotéinases hémorragiques, renferme les hémorragines de masse moléculaire comprise entre 20-30 kDa et qui présentent une faible activité hémorragique. Cela est lié à leur structure, puisque ces enzymes possèdent uniquement un domaine « métalloprotéinase » indispensable pour l'activité protéolytique de l'enzyme (Bjarnason et Fox, 1994 ; Chen et al., 2004 ; Bello et al., 2006 ; Fox et Serrano, 2008). En effet, l'analyse macroscopique et microscopique des peaux de souris envenimées avec la CcH1 a permis de montrer que cette biomolécule est douée d'une faible activité hémorragique en comparaison à celle du venin natif, en injectant la même dose. Ceci est en accord avec le résultat de la DMH, qui est 5 fois supérieure que celle du venin natif. Ce faible pouvoir hémorragique a également été observé avec les molécules hémorragiques, BaH2 isolée à partir du venin de *Bothrops asper* (Borkow et al., 1993) et BthMP purifiée à partir du venin de *Bothrops moojeni* (Gomes et al., 2009).

Par ailleurs, les métalloprotéinases comprenant uniquement le domaine catalytique (classe P-I) sont douées d'une faible activité hémorragique que les métalloprotéinases qui possèdent un domaine de type désintégrine et un domaine riche en cystéines (appartiennent aux autres classes des métalloprotéinases), (Fox et Serrano, 2005 ; Gomes et al., 2009 ; Gutiérrez et al., 2009a). Ceci est dû au fait que ces domaines augmenteraient l'extravasation des globules rouges en affectant la fonction plaquettaire et confèreraient une plus grande activité toxique aux métalloprotéinases en dirigeant ces enzymes vers des localisations critiques des capillaires sanguins (Franceschi et al., 2000 ; Gutiérrez et al., 2009a).

Maruyama et collaborateurs (1993) et Kamiguti et collaborateurs (1998), ont montré que l'hémorragie induite par le venin de *Bothrops jararaca* est due à l'action de la jararagine, une métalloprotéinase hémorragique purifiée à partir de ce venin, cette protéinase hémorragique dégrade la sous unité β_1 de l'intégrine $\alpha_2 \beta_1$, qui est le récepteur du collagène situé au niveau de la membrane plasmique des plaquettes. Cependant, la reconnaissance de l'intégrine $\alpha_2 \beta_1$ par la jararagine se fait à l'aide de son domaine de type désintégrine et du domaine riche en cystéine, par contre la protéolyse se fait par le domaine métalloprotéinase.

De plus, l'utilisation des anti-protéasiques (EDTA, 1,10-phenanthroline et le PMSF) a révélé que cette biomolécule hémorragique (CcH1) est une métalloprotéinase à

zinc. Cet effet inhibiteur de l'EDTA et de la 1,10-phenanthroline sur les molécules des venins de serpents douées d'une activité hémorragique a également été observé avec les fractions hémorragiques NHFa et NHFb du venin de *Bothrops neuwiedii* (Mandelbaum et al., 1984), des fractions hémorragiques jararafibrase III et IV du venin de *Bothrops jararaca* (Maruyama et al., 1993), de la fraction hémorragique EoVMP2 isolée à partir du venin de *Echis ocellatus* (Howes et al., 2003 et 2005) et de la fraction hémorragique purifiée à partir du venin de *Bothrops lanceolatus* (Stroka et al., 2005).

Certains constituants hémorragiques sont caractérisés par la présence d'ion zinc uniquement, comme c'est le cas de l'hannahtoxine du venin de *Ophiophagus hannah* (Huang et al., 1984) et de la métalloprotéinase hémorragique EoVMP1 du venin de *Echis ocellatus* (Howes et al., 2003 et 2005). D'autres contiennent à la fois les ions Zn^{2+} et Ca^{2+} comme la mucrotoxine A du venin de *Trimeresurus mucrosquamatus* (Sugihara et al., 1983), la Bothropasin du venin de *Bothrops jararaca* (Muniz et al., 2008), la BthMP du venin de *Bothrops moojeni* (Gomes et al., 2009) et la VLH2 du venin de *Vipera lebetina* (Hamza et al., 2010a).

Ces métalloprotéinases peuvent agir selon différents mécanismes, le mécanisme principal d'action implique un clivage sélectif de liaisons peptidiques clés dans les composants protéiques de la membrane basale et de la matrice extracellulaire, ce qui affecte l'interaction entre la membrane basale et les cellules endothéliales. En conséquence, les cellules endothéliales entament une série de modifications morphologiques et fonctionnelles. Le premier changement ultrastructurel est une diminution du nombre de vésicule de pinocytose et le détachement de certaines cellules endothéliales de la lame basale. Des projections cytoplasmiques se détachent des cellules vers la lumière des capillaires sanguins. La conséquence de ces processus de perte cytoplasmique est l'amincissement des cellules endothéliales et l'apparition de zones de ruptures au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales. L'extravasation du sang se fait à travers ces points de rupture (Moreira et al., 1994 ; Gutiérrez et Rucavado, 2000).

Dans un second mécanisme, les métalloprotéinases hémorragiques induisent une inflammation locale avec libération de médiateurs inflammatoires, ce qui impliquerait la contraction des cellules endothéliales et l'élargissement des jonctions intercellulaires. Les cellules endothéliales deviennent ainsi perméables au sang qui s'échappe vers l'espace du tissu conjonctif (érythrodiapédèse). Dans ce cas, ces cellules restent intactes (Hati et al., 1999).

Ainsi, les métalloprotéinases hémorragiques isolées à partir des venins semblent avoir un mécanisme d'action différent sur les cellules endothéliales. En effet, les hémorragines HR-1, HR-2a, HR-2b isolées à partir du venin de *Trimeresurus flavoviridis* provoquent une hémorragie par érythrodiapédèse (Hati et al., 1999). Alors que les hémorragines ACL-1 isolée à partir du venin d'*Agkistrodon contortrix laticinctus*, l'atrollysine-a isolée à partir du venin de *Crotalus atrox* et la protéinase H isolée à partir du venin de *Crotalus adamenteus* provoquent une hémorragie à la suite d'une lyse des cellules endothéliales (Johnson et Ownby, 1993).

Selon Moraes et Selistre-de-Araujo (2006) ; Moura-da-Silva et collaborateurs (2008) ; Gomes et collaborateurs (2009) et Gutiérrez et collaborateurs (2009b), c'est l'activité protéolytique des hémorragines qui en est la principale cause. Cette activité

perturbe l'assemblage et l'organisation des composants protéiques de la lame basale des capillaires sanguins, tels que la laminine, la fibronectine et le collagène de type IV, ayant pour résultat une perturbation ou une lyse des cellules endothéliales.

Parmi les métalloprotéinases hémorragiques capables d'hydrolyser le collagène de type IV, la fibronectine et la laminine de la lame basale des capillaires sanguins, il ya les hémorragines BaH1, BaH4 et BaP1 purifiées à partir du venin de *Bothrops asper*, l'hémorragine LHF-II isolée à partir du venin de *Lachesis muta muta* (Gutiérrez et al., 1995; Franceschi et al., 2000; Gutiérrez et al., 2009b) et l'ammodytase, une métalloprotéinase hémorragique purifiée à partir du venin de *Vipera ammodytes ammodytes* (Leonardi et al., 2007).

Conclusion et perspectives

V. Conclusion et perspectives

L'irradiation au Cobalt-60 semble être une méthode de détoxification efficace pour les venins de serpents. Elle permet de réduire de façon considérable les activités enzymatique et biologique des composants du venin tout en préservant et en améliorant leurs pouvoirs immunogènes. Cette contribution à l'étude du venin modifié de *Cerastes cerastes* par les rayonnements ionisants gamma a eu pour objectif d'analyser l'effet de la variation du débit de dose d'irradiation sur la toxicité et l'immunogénicité du venin de *Cerastes cerastes*. Plusieurs approches (toxicité, histologique et immunologique) ont été abordées.

Les venins irradiés de *Cerastes cerastes* sont dépourvus de toute toxicité jusqu'à 25 DL50. Cette perte de toxicité suite au traitement par rayonnement gamma, semble être le résultat des modifications structurales au sein des protéines du venin. Ce qui provoque une perte d'activité enzymatique ou biologique et qui semble affecter directement la toxicité du venin de *Cerastes cerastes*.

Les venins irradiés de *Cerastes cerastes* présentent des profils chromatographiques et électrophorétiques complètement modifiés. Une disparition de pics et de bandes polypeptidiques ainsi qu'une traînée est observée sur le profil électrophorétique. Ces observations confirment une baisse de solubilité suite à une dégradation et/ou une agrégation des protéines sous l'effet des rayonnements gamma.

L'irradiation gamma a induit une diminution des activités protéolytiques et phospholipase A_2 . A dose d'irradiation égale, les altérations induites sur les enzymes contenants dans le venin de *Cerastes cerastes* semblent avoir un caractère dose-réponse avec le débit de dose. De même, les activités biologiques du venin de *Cerastes cerastes* (hémorragique et myotoxique) semblent radiosensibles aux débits de dose d'irradiation appliqués.

Cette étude a également montré, que les venins irradiés sont immunogènes, l'immun-sérum dirigé contre le venin irradié à une dose de 2 kGy, en utilisant un débit de 765 Gy/h, présente une capacité neutralisante supérieure à celle des autres anti-venins.

La dose de 2 kGy et le débit de dose de 765 Gy/h (classé comme étant un moyen débit de dose) semblent être les meilleures conditions d'irradiation du venin de *Cerastes cerastes*, car ils permettent un compromis entre détoxification et préservation des propriétés immunogènes. L'irradiation gamma présente l'avantage d'améliorer l'immunogénicité sans addition de molécules exogènes au venin, molécules qui peuvent détourner la réponse immunitaire à leur profit, comme cela a été observé pour d'autres méthodes chimiques de détoxification.

La purification des molécules responsables de l'activité hémorragique du venin natif de *Cerastes cerastes* par différentes techniques chromatographiques a permis de montrer que cette activité semble être liée à la présence d'une hémorragine, appelée CcH1, ayant une masse moléculaire de 25 kDa, suggérant son appartenance à la classe I des métalloprotéinases hémorragiques. L'utilisation des inhibiteurs de protéinases (EDTA, 1,10-phenanthroline et le PMSF) ont permis de caractériser cette biomolécule hémorragique (CcH1) comme étant une métalloprotéinase à zinc.

Cette étude préliminaire ouvre la voie à plusieurs perspectives qui contribueraient à une meilleure compréhension et neutralisation des effets physiopathologiques observés lors d'une envenimation vipérine. Il serait intéressant de:

- Caractériser la cible spécifique de ces hémorragines sur les capillaires sanguins (la lame basale et/ou les cellules endothéliales) en :

* Testant (*in vitro*), leur capacité à dégrader les composants protéiques de la lame basale (laminine, fibronectine et le collagène de type IV).

* Testant (*in vitro*), leur action cytotoxique vis à vis des cellules endothéliales en culture.

* Réalisant une étude, en microscopie électronique, du spot hémorragique obtenu au niveau de la peau dorsale des souris envenimées avec la molécule hémorragique purifiée "CcH1".

- Déterminer sa séquence en acides aminés et sa structure tridimensionnelle par cristallographie.

- Irradier ces molécules hémorragiques purifiées au Cobalt-60, en utilisant une dose de 2 kGy et un débit de dose de 765 Gy/h pour une mise en place éventuelle d'une sérothérapie spécifique, qui pourrait être d'un grand apport pour le clinicien dans le traitement des symptômes causés par ce *Viperidae*.

- Produire des anticorps spécifiques anti-molécules hémorragiques irradiés hautement neutralisants pour une meilleure protection des victimes aux morsures de serpents.

Références bibliographiques

VI. Références bibliographiques

VI.1. Articles

Abib, H., Laraba-Djebari, F. (2003) Effects of ^{60}Co gamma radiation on toxicity and hemorrhagic, myonecrotic, and edema-forming activities of *Cerastes cerastes* venom. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**: 1125-1130.

Abdalla, S., Bילו, Y., Disi, A. (1992) Effects of sand viper (*Cerastes cerastes*) venom on isolated smooth muscle and heart and on haematological and cardiovascular parameters in the Guinea-pig. *Toxicon* **30** : 1247-1255.

Aguilar, I., Giron, M. E., Rodriguez-Acosta, A. (2001) Purification and characterization of a hemorrhagic fraction from the venom of the Uracoan rattlesnake *Crotalus vegrandis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1548** : 57-65.

Alexander, G., Grothusen, J., Zepeda, H., Schwartzman, R.J. (1998) Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon* **26** : 953-960.

Anai, K., Sugiki, M., Yoshida, E., Maruyama, M. (2002) Neutralization of snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. *Toxicon* **40** : 63-68.

Andereimar M., Soares, J. R., Giglio, J.R. (2003) Chemical modifications of phospholipase A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. *Toxicon* **42** : 855-868.

Andriani, E.P. (1996) Irradiation of crotoxin in aqueous solution: the role of the main reactive species in structural and biological alterations. *J. Venom. Anim. Toxins* **2** : 168.

Andriao-Escarso, S. H., Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Angulo, Y., Diaz, C., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Giglio, J. R. (2000) Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms : Effects of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* **82** : 755-763.

Angulo, Y., Nunez, 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** : 879-887.

Angulo, Y., Lomonte, B. (2009) Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* **54** : 949-957.

Antoni, F. (1970) The effect of ionizing radiation on some molecules of biological importance. *International Atomic Energy Agency* **149** : 13-21.

Araya, C., Lomonte, B. (2007) Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A₂ homologues of snake venoms. *Cell. Biol.* **3** : 263-268.

Ariaratnam, C. A., Meyer, W. P., Perera, G., Eddleston, M., Kuleratne, S. A. M., Attapatu, W., Sheriff, R., Richards, A. M., Theakston, R. D. G., Warrell, D. A. (1999) A new monospecific ovine Fab fragment antivenom for treatment of envenoming pharmacokinetic study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61** : 259-265.

Audebert, F., Sorkine, M., Bon, C. (1992) Envenoming by bites in France: clinical gradation and biological quantification by ELISA. *Toxicon* **30** : 599-609.

Baptista, J. A., Spencer, P. J., Oliveira, M. S., Casare, N., Nascimento, N. (2006) Immune response against antigens irradiated with ⁶⁰Co gamma-rays. *J. Radioanal and Nucl. Chem.* **269** : 565-569.

Baptista, J. A., Vieira, D. P., Galisteo júnior, A. J., Higa, O. Z., Casare, M., Yonamine, C. M., Caproni, P., Campos, L. A., de Andrade júnior, H. F., Spencer, P. J., Nascimento, N. (2010) Structure alteration and immunological properties of ⁶⁰Co-gamma-rays irradiated bothropstoxin-I. *J. Radioanal Nucl. Chem* **283** : 691-698.

Basheer, A. R., El-Asmar, M. F., Sosiau, G. (1995) Characterization of a potent platelet aggregation inducer from *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) venom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein structure and Molecular Enzymology* **1250** : 97-109.

Bazaa, A., Marrakchi, N., El Ayeb, M., Sanz, L., Calvete, J. J. (2005) Snake venomomics: comparative analysis of the venom proteomes of the Tunisian snakes *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina*. *Proteomics* **5** : 4223-4235.

Bello, C. A., Hermogenes, A. L. N., Magalhães, A., Veiga, S. S., Gremski, L. H., Richardson, M., Sanchez, E. F. (2006) Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie* **88** : 189-200.

Bennacef-Heffar, N., Laraba-Djebari, F. (2003) Evaluation of the effect of gamma rays on the venom of *vipera lebetina* by biochemical study. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81** : 1110-1117.

Berhens, B., Karber., G. (1935) Wie sind reihenversuche fur biologische auswertungen am zweckmassigsten anzuordnen. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **177** : 379-388.

Bicalho, R. X., Rocha, O. A., Heneine, L. G. D., Magalhaes, A., Heneine, I. F. (1990) The effect of stepwise iodination on biological properties of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* **28** : 171-179.

Bjarnason, J. B., Tu, A. T. (1978) Hemorrhagic toxins from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom : Isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemrrhagic toxin. *Biochem* **17**: 3395-3404.

Bjarnason, J. B., Fox, J.W. (1994) Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther* **62**: 325-372.

Boer-Lima, P. A., Gontijo, J. A. R., Cruz Hofling, M. A. (1999) Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61** : 698-705.

Bon, C. (2000) Immunothérapie antivenimeuse des envenimations vipérines pour une approche plus rationnelle d'un traitement empirique. *Bull. Soc. Toxicol. Clin. Infotox* **11** : 8-11.

Bonfim, V.L., de Carvalho, D.D., Pnce-Soto, L.A., Kassab, B.H., Marangoni, S. (2008) Toxicity of phospholipases A₂ D49 (6-1 and 6-2) and K49 (BJ-VII) from *Bothrops jararacussu* venom. *Cell. Biol. Toxicol.* **10** : 1007-1017.

Boni-Mitake, M., Costa, H., Spencer, P. J., Vassiliff, V. S., Rogero, J. R. (2001) Effects of ⁶⁰Co gamma radiation on crotamine. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34** : 1531-1538.

Bonta, I. L., Vargaftig, B. B., Bhargava, N., De Vos, C. J. (1970) Method for study of snake venom induced hemorrhages. *Toxicon* **8** : 3-10.

Borkow, G., Gutiérrez, J. M., Ovadia, M. (1993) Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* **31** : 1137-1150.

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* **150** : 285-290.

Braud, S., Bon, C., Wisner, A. (2000) Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* **82** : 851-859.

Calgarotto, A.K., Damico, D.C.S., Ponce-Soto, L.A., Baldasso, P.A., Da Silva, S. L., Souza, G.H.M.F., Eberlin, M.N., Marangoni, S. (2008) Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A₂ BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* **51** : 1509-1519.

Calvet, F., Daude, C.H., Lamand, R., Demoncheaux, J.P., Perraudin, C. (2007) Morsures de serpents en Afrique de l'ouest. *Médecine et Armées* **35** : 17-25.

Caproni, P., Baptista, J. A., de Almeida, T. L., Passos, L. A. C., Nascimento, N. (2009) Study of irradiated bothropstoxin-1 with ⁶⁰Co gamma rays: Immune system behavior. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* **15** : 216-225.

Cardi, B. A., Nascimento, N., Andrade, J. H. F. (1998) Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ⁶⁰Co γ rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. *Int. J. Radiat. Biol.* **73** : 557-564.

Casare, M. S., Baptista, J. A., Spencer, P. J., Nascimento, N. (2004) Effect of ⁶⁰Co radiation on the molecular structure of crotamine. *Radiation physics and chemistry* **71** : 417-418.

- Chakrabarty, D., Datto, K., Gomes, A., Bhattacharyya, D.** (2000) Hemorrhagic protein of Russell's viper venom with fibrinolytic and esterolytic activities. *Toxicon* **38** : 1475-1490.
- Chapelier, A., Desmadril, M., Houée-Levin, C.** (2001) Gamma radiation effects on α -lactalbumin: structural modifications. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **79** : 154–157.
- Chaves, F., Barboza, M., Gutiérrez, J. M.** (1995) Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* **33** : 31-39.
- Chen, N. L., Liu, C. S., Chang, C. C.** (1994) Isolation and characterization of a toxic phospholipase A₂ from the venom of Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*). *Biotechnol. Appl. Biochem.* **19** : 61-73.
- Chen, R. Q., Jin, Y., Wu, J. B., Zhou, X. D., Li, D-S., Lu, Q. M., Wang, W. Y., Xiong, Y. L.** (2004) A novel high molecular weight metalloproteinase cleaves fragment F1 of activated human prothrombin. *Toxicon* **44** : 281-287.
- Chijiwa, T., Hamai, S., Tsubouchi, S., Ogawa, T., Deshimaru, M., Oda-Ueda, N., Hattori, S., Kihara, H., Tsunasawa, S., Ohno, M.** (2003) Interisland mutation of a novel phospholipase A₂ from *Trimeresurus flavoviridis* venom and evolution of *Crotalinae* group II phospholipases A₂. *J. Mol. Evol.* **57** : 546-554.
- Chippaux, J. P.** (1996) La sérothérapie antivenimeuse en Afrique, cent ans après Calmette. *Médecine d'Afrique Noire* **43** : 45- 49.
- Chippaux, J. P., Amadi-Eddine, S., Fagot, P.** (1999) Diagnostic et surveillance des hémorragies dues aux envenimations vipérines en savane africaine. *Bull. Soc. Pathol. Exot* **92** : 109-113.
- Chippaux, J. P., Massougbojji, A., Stock, R. P., Alagon, A., The investigators of African Antivipmyn in Benin** (2007) Clinical trial of an F(ab')₂ polyvalent equine antivenom for African snake bites in Benin. *Am. J. Trop. Med. Hyg* **77** : 538-546.
- Chippaux, J. P.** (2008) Estimating the global burden of snakebite can help to improve management. *PLoS Med* **5** : 1538-1539.
- Cho, S. Y., Hahn, B. S., Yang, K. Y., Kim, Y. S.** (2001) Purification and characterization of calobin II, a second type of thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper). *Toxicon* **39**: 499-506.
- Cintra, A.C.O., Marangoni, S., Oliveira, B., Giglio, J.R.** (1993) Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J. Protein. Chem* **12** : 57-64.
- Clissa, P. B., Nascimento, N., Rogero, J. R.** (1999) Toxicity and immunogenicity of *Crotalus durissus terrificus* venom treated with different doses of gamma rays. *Toxicon* **37** : 1131-1141.

Costa, T.R., Menaldo, D.L., Oliveira, C.Z., Santos-Filho, N.A., Teixeira, S.S., Nomizo, A., Fuly, A.L., Monteiro, M.C., de Souza, B.M., Palma, M.S., Stábeli, R.G., Sampaio, S.V., Soares, A.M. (2008) Myotoxic phospholipases A₂ isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region. Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. *Peptides* **29** : 1645-1656.

Davies, K. J. A., Delsignore, M. E., Lin, S. W. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J. Biol. Chem.* **262** : 9902–9907.

De la Hoz, L., Netto, F. M. (2007) Structural modifications of β -lactoglobulin subjected to gamma radiation. *International Dairy Journal* **18** : 1126- 1132.

De-Roodt, A. R., Dolab, J. A., Hajos, S. E., Gould, E., Dinapoli, H., Troiano, J. C., Gould, J., Dokmetjian, J. C., Carfagnini, J.C., Fernandez, T., Amoroso, M., Segre, L., Vidal, J. C. (2000) Some toxic and enzymatic activities of *Bothrops ammodytoides* (yarara nata) venom. *Toxicon* **38** : 49-61.

De-Roodt, A. R., Litwin, S., Vidal, J. C. (2003) Hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatin and lethality; *Toxicon* **41** : 949-958.

Dixon R. W., Harris J. B. (1999) Nerve terminal damage by β -bungarotoxin, its clinical significance. *A. M. J. Pathol.* **154** : 447-455.

Diaz, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. (1992) Isolation and characterization of basic myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* **298** : 135-142.

Dufton, M. J., Hider, R. C. (1983) Classification of phospholipases A₂ according to sequence. Evolutionary and pharmacological implications. *Eur. J. Biochem* **137** : 545-551.

El-Asmar, M. F., Shaban, E., Hagag, M., Swelam, N., Tu, A. (1986) Coagulant component in *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) venom. *Toxicon* **24** : 1037-1044.

El-Ayeb, M., Karoui, H. (1997) Identification des composés toxiques dans les venins de vipères *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*. *Archs. Inst. Past. Tunis T* **73** : 93-95.

Escalante, T., Rucavado, A., Pinto, A. F. M., Terra, R. M. S., Gutiérrez, J. M., Fox, J. W. (2009) Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins. *J. Proteome Res.* **8** : 5120-5131.

Espino-Solis, G. P., Riaño-Umbarila, L., Becerril, B., Possani, L.D. (2001) Antidotes against venomous animals: State of the art and perspectives. [Journal of Proteomics](#) **72** : 183-199.

Evans, J., Ownby, C. L. (1999) Neutralization of edema, hemorrhage and myonecrosis induced by North American crotalid venoms in simulated first-aid treatments. *Toxicon* **37** (4) : 633-650.

- Ferreira Junior, R. S., Nascimento, N., Martinez, J. C., Alves, J. B., Meira, D. A., Barraviera, B.** (2005) Immunization with native and cobalt 60-irradiated *Crotalus durissus terrificus* venom in swiss mice : assessment of the neutralizing potency of antisera. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* **11** : 134-152.
- Ferreira, L. M., Moura-da- Silva, A. M., Mota, I., Takehara, H. A.** (2000) Neutralization of thalassophryme nattereri (niquim) fish venom by an experimental antivenom. *Toxicon* **38** : 1149-1156.
- Flowers, H. H.** (1966) Effect of X-irradiation on the antigenic character of *Agkistrodon piscivorus* venom. *Toxicon* **3** : 301- 304.
- Fox, J. W., Serrano, S. M. T.** (2005) Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* **45** : 969-985.
- Fox, J. W., Serrano, S. M. T.** (2008) Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS journal* **275** : 3016-3030.
- Franceschi, A., Rucavado, A., Mora, N., Gutiérrez, J. M.** (2000) Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of snake *Bothrops asper*. *Toxicon* **38** : 63-77.
- Fry, B. G.** (1999) Structure-function properties of venom components from Australian elapids. *Toxicon* **37** : 11-32.
- Fuly, A. L., Calil-Elias, S., Zingali, R. B., Guimaraes, J. A., Melo, P. A.** (2000) Myotoxic activity of acidic phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Toxicon* **38** : 961-972.
- Gallacci, M., Nunes, E. C., Moreira, E. G., Nascimento, N., Rogero, J. R., Vassilieff, V. S.** (1998) Reduction of crotoxin-induced neuromuscular blockade by gamma radiation. *Toxicon* **36** : 941-945.
- Gambero, A., Thomazzi, S. M., Cintra, A. C., Landucci, E. C., De Nucci, G., Antunes, E.** (2004) Signalling pathways regulating human neutrophil migration induced by secretory phospholipases A₂. *Toxicon* **44** : 473-481.
- Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., Brown, M. S.** (1979) Binding site on macrophages that mediate uptake and degradation of acidulated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceeding of the National Academy of sciences* **76** : 333-337.
- Gomes, M. S. R., Mendes, M. M., Oliveira, F., Andrade, R. M., Bernardes, C. P., Hamaguchi, A., Alcântara, T. M., Soares, A. M., Rodrigues, V. M., Homs-Brandeburgo, M. I.** (2009) BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* **53** : 24-32.

Guidolin, R., Dias Da Silva, W., Higashi, H. G., Caricati, C. P., Lima, M. L. S. R., Morais, J. F., Pinto, J. R., Marcelino, J. R. (1989) Hyperimmunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópicos e crotálico tratados por glutaraldeído. Mem. Inst. Butantan **51** : 85-90.

Gutiérrez, J. M., Ownby, C. L., Odell, G. V. (1984) Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom : Partial characterization and action on skeletal muscle. Toxicon **22** : 115-128.

Gutiérrez, J. M., Geni, J. A., Rojas, G., and Cerdas, L. (1985) Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venom by a polyvalent antivenom. Toxicon **23** : 887-893.

Gutiérrez, J. M., Lomonte, B. (1995) Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. Toxicon **33** : 1405-1424.

Gutiérrez, J. M., Romero, M., Diaz, C., Borkow, G., Ovidia, M. (1995) Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). Toxicon **33** : 19-29.

Gutiérrez, J.M., Borkow G., Ovidia M. (1996) Inhibition of the hemarragic activity of *Bothrops asper* venom by novel neutralizing mixture. Toxicon **35** : 865-877.

Gutiérrez, J. M., Leon, G., Rojas, G., Lomonte, B., Rucavado, A., (1998) Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. Toxicon **36** : 1529-1538.

Gutiérrez, J. M., Rucavado, A. (2000) Snake venom metalloproteinases : Their role in the pathogenesis of local tissue damage. Biochimie **82** : 841-850.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Diaz, C. (2005) Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. Toxicon **45** : 997-1011.

Gutiérrez, J.M., Escalante, T., Rucavado, A. (2009a) Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxicon **54** : 976-987.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Chaves, F., Diaz, C., Escalante, T. (2009b) Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxicon **54** : 958-975.

Hamza, L., Gargioli, C., Castelli, S., Rufini, S., Laraba-Djebari, F. (2010a) Purification and characterization of a fibrinogenolytic and hemorrhagic metalloproteinases isolated from *Vipera lebetina* venom. Biochimie, doi : 10.1016/j.biochi.2010.02.025.

Hamza, L., Girardi, T., Castelli, S., Gargioli, C., Cannata, S., Patamia, M., Luly, P., Laraba-Djebari, F., Petruzzelli, R., Rufini, S. (2010b) Isolation and characterization of a myotoxin from the venom of *Macrovipera lebetina transmediterranea*. Toxicon, doi : 10.1016/j.toxicon.2010.04.001.

- Hanafy, M. S., Rahmy, N. A., Abd El-Khalek, M. M.** (1999) The dielectric properties of neutron irradiated snake venom and its pathological impact. *Phys. Med. Biol.* **44** : 2343-2364.
- Hati, R. N., Mandal, M., Hati, A. K.** (1990) Active immunization of rabbit with gamma irradiated Russell's viper venom toxoid. *Toxicon* **28** : 895-902.
- Hati, R.N., Mitra, P., Sarker, S., Bhattacharyya, K.K.** (1999) Snake venom hemorrhagins. *Crit. Rev. Toxicol.* **29** : 1-19.
- Harris, J. B.** (1989) Snake venoms in science and clinical medicine 3. Neuropharmacological aspects of the activity of snake venoms. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* **83** : 745-747.
- Heneine, L. G. D., Cardoso, V. N., Daniel, J. P., Heneine, I. F.** (1986) Detoxification of the T₂ fraction from a scorpion (*Tityus serrulatus*, Lutz and Mello) venom by iodination and some immunogenic properties of derivatives. *Toxicon* **24** : 501-505.
- Higaki, J.M., Fletterick, R. J., Craik, C.S.** (1992) Engineered metalloregulation in enzymes. *TIBS* **17** : 100-104.
- Howes, J. M., Wilkinson, M. C., Theakston, R. D. G., Laing, G. D.** (2003) The purification and partial characterization of two novel metalloproteinases from the venom of the West African carpet viper, *Echis ocellatus*. *Toxicon* **42** : 21-27.
- Howes, J.M., Kamiguti, A.S., Theakston, R. D. G., Wilkinson, M. C., Laing, G. D.** (2005) Effects of three novel metalloproteinases from the venom of the West African saw-scaled viper, *Echis ocellatus* on blood coagulation and platelets. *Biochimica et Biophysica Acta* **1724** : 194 – 202.
- Huang, T.F., Chang, J.H., Ouyang, C.** (1984) Characterization of hemorrhagic principles from *Trimeresurus gramineus* snake venom. *Toxicon* **22** : 45-52.
- Huang, T.F.** (1998) What have snakes taught us about integrins? *Cell. Mol. Life. Sci.* **54** : 527-540.
- Hutton, R.A., Warrel, D. A.** (1993) Action of snake venom components on the haemostatic system. *Blood* **7** : 176-189.
- Incerpi, S., Devito, P., Luly, P et Ruffini, S.** (1995) Effect of ammodytin L from *Vipera ammodytes* on L-6 cells from rat Skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Acta.* **1268**: 137-142.
- Ishimaru, K., Kihara, H., Ohno, M.** (1980) Purification and properties of phospholipase A₂ from venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake). *Biochem. J.* **88** : 443-451.
- Ito, M., Hamato, J., Sakurai, Y., Matsumoto, M., Fujimura, Y., Suzuki, M., Hashimoto, K., Titani, K., Matsui, T.** (2001) Complete amino acid sequence of kaouthiagin, a novel cobra venom metalloproteinase with two disintegrin-like sequences. *Biochem.* **40** : 4503-4511.

- Jia, L., Shimokawa, K., Bjarnason, J. B., Fox, J. W.** (1996) Snake venom metalloproteinases : Structure, function and relationship to the adamalysin family of proteins. *Toxicon* **34** : 1269-1276.
- John, T. R., Smith, J. J., Kaiser, I. I.** (1996) A phospholipase A₂ like pseudogene retaining the highly conserved introns of Mojave toxin and other snake venom group II phospholipase A₂, but having different exons. *DNA and Cell. Biology* **15** : 661-668.
- Johnson, E. K., Ownby, C. L.** (1993) Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (Broad-Banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. *Toxicon* **31** : 243-255.
- Joseph, J. S., Chung, M. C. M., Mirschin, P. J., Kini, R. M.** (2002) Effect of snake venom procoagulants on snake plasma : Implications for the coagulation cascade of snakes. *Toxicon* **40** : 175-183.
- Kamiguti, A. S., Zuzel, M., Therakston, R. D. G.** (1998) Snake venom metalloproteinases and disintegrins : Interactions with cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31** : 853-862.
- Kasturi, S., Gowda, T. V.** (1989) Purification and characterization of a major phospholipase A₂ from Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. *Toxicon* **27** : 229-237.
- 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 Med* **5** : 1591-1604.
- Kempner, E. S.** (2001) Effects of high-energy electrons and gamma rays directly on protein molecules. *J. Pharm. Sci.* **90** : 1637-1646.
- Kini, R. M., Evans, H. J.** (1989) A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* **27** : 613-635.
- Kini, R. M., Evans, H. J.** (1992) Structural domains in venom proteins : Evidence that metalloproteinases and non enzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon* **30** : 265-293.
- Kini, R. M.** (2003) Excitement a head : structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* **42** : 827-840.
- Kishida, M., Nikai, T., Mori, N., Kohmura, S., Sugihara, H.** (1985) Characterization of mucrotoxin a from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus* (the Chinese habu snake). *Toxicon* **23** : 637-645.
- Koh, Y. S., Chung, K. H., Kim, D. S.** (2001) Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. *Toxicon* **39** : 555-560.

- Kohli, H. S., Sakhuja, V.** (2003) Snake bites and acute renal failure. Saudi J kidney Dis transplant. **14** : 165-176.
- Komori, Y., Nikai, T., Sugihara, H.** (1990) Purification and characterization of three phospholipases A₂ from the venom of *Vipera aspis aspis*. Jap. J. Med. Sci. Biol. **43** : 253-254.
- Komori, Y., Nonogaki, T., Nikai, T.** (2001) Hemorrhagic activity and muscle damaging effect of *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinase (Elastase). Toxicon **39** : 1327-1332.
- Komori, Y., Sugihara, H.** (1988) Physiological and biochemical properties of a kallikrein-like enzyme from the venom of *Vipera aspis aspis* (aspic viper). Toxicon **26** : 1193-1204.
- Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murata, R., Ohsaka, A.** (1960) Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. Jap. J. Med. Sci. Biol **13** : 43-51.
- Kouyoumdjian, J. A., Harris, J. B., Johnson, M. A.** (1986) Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. Toxicon **24** : 575-583.
- Krizaj, I., Gubensek, F.** (2000) Neuronal receptors for phospholipase A₂ and β -neurotoxicity. Biochimie **82** : 807-814.
- Kunitz, M.** (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor: General properties. J. Gen. Physiol. **30** : 291-310.
- 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** : 337.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227** : 680-685.
- Laing, G. D., Kamiguti, A. S., Wilkinson, M. C., Lowe, C. M., Theakston, R. D. G.** (1995) Characterization of a purified PLA₂ from the venom of the papuan black snake (*Pseudechis papuanus*). Biochem. Biophys. Acta **1250** : 137-143.
- Laraba-Djebari, F., Martin-Euclaire, M. F.** (1990) Purification and characterization of PLA₂ from *Cerastes cerastes* (Horn viper) snake venom. Toxicon **28** : 637-647.
- Laraba-Djebari, F., Martin-Euclaire, M. F., Matchot, 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** : 1399-1410.
- Laraba-Djebari, F., Martin-Euclaire, M. F., Maucco, 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. Eur. J. Biochem. **233** : 756-765.

Larréché, S., Mion, G., Goyffon, M. (2008) Troubles de l'hémostase induits par les venins de serpents. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* **27** : 302–309.

Lauhatirananda, P., Ganthavorn, S., Hayadom, V. (1970) Radiation effects on venom cobra. *International Atomic Energy Agency-PL* **334** : 107-112.

Lee, S.Y., Jeon, G.R., Lee, J.W., Oh, S.J., Yook, H.S., Cho, K.H., Byun, M.W. (2002) Reduced allergenicities of irradiated ovalbumin and ovomucoid determined by skin prick test and ELISA inhibition test. *J. Allergy Clin. Immunol.* **109** : 945.

Leite, R. S., Ramos, O. H. P., Gomes, A. R. S., Salvini, T. F., Souza, D. H. F., Franco, W., and Selistre-de-Araujo, H. S. (2004) Effects of a myotoxic Asp49 phospholipase A₂ (ACL-I PLA₂) isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom on water transport in the isolated toad urinary bladder. *Toxicon.* **43** : 847-853.

Lemaine, G. (1995) Effets biologiques des rayonnements ionisants au niveau cellulaire In : Cours post-universitaire de radioprotection. *International Atomic Energy Agency vol I:* 227-271.

Leonardi, A., Gubensek, F., Krizaj, I. (2001) Purification and characterization of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes*. *Toxicon* **40** : 55-62.

Leonardi, A., Fox, J.W., Trampus-Bakija, A., Krizaj, I. (2007) Ammodytase, a metalloprotease from *Vipera ammodytes ammodytes* venom, possesses strong fibrinolytic activity. *Toxicon* **49** : 833-842.

Liu, C. S., Chen, J. M., Chang, C. H., Chen, S. W., Tsai, I. H., Lu, H. S., Lo, T. B. (1990) Revised amino acid sequences of the three major phospholipases A₂ from *Bungarus fasciatus* (banded krait) venom. *Toxicon* **28** : 1457-1468.

Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Furtrado, M. F., Otero, R., Rosso, J. P., Vargas, O., Carmona, E., Rovira, M. E. (1990) Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox*. *Snake venoms. Toxicon* **28**: 1137-1146.

Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Borkow, G., Ovadia, M., Tarkowski, A., Hanson, L. A . (1994) Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells in vitro. *Toxicon* **32** : 505-510.

Mancuso de mesquita, L. C., Selistre, H. S., Giglio, J. R. (1991) The hypotensive activity of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) venom : Identification of its origin. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44** : 345-353.

Mandelbaum, F. R., Assakura, M. T., Reichl, A. P. (1984) Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (Jararaca pintada). *Toxicon* **22** : 193-206.

Marilyne, A. S., Houée-Levin, C., Potier, M. (2003) Radiation-induced protein fragmentation and inactivation in liquid and solid aqueous solutions. Role of OH and electrons. *Radiation Physics and Chemistry* **72** : 301- 306.

- Markland, F. R.** (1998) Snake venoms and hemostatic system. *Toxicon* **36** : 1749-1800.
- Marrakchi, N., Barbouche, R., Zingali, R., Bon, C., Guermazi, S., Karoui, H., El-Ayeb, M.** (1995) Purification and characterization of two serine-protease from the venom of *Cerastes cerastes*, cerastocytin and cerastotin. *Toxicon* **33** : 1127-1128.
- Marrakchi, N., Barbouche, R., Guermazi, S., Bon, C., El-Ayeb, M.** (1997) Procoagulant and platelet-aggregating properties of cerastocytin from *Cerastes cerastes* venom. *Toxicon* **35** : 261-272.
- Martinez, M., Rael, E. D., Naddux, N. L.** (1990) Isolation of a hemorrhagic toxin from Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) venom. *Toxicon* **28** : 685-694.
- Maruyama, M., Sugiki, M., Yoshida, E., Shimaya, K., Kihara, H.** (1992) Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes : Possible role in haemorrhage. *Toxicon* **30** : 1387-1397.
- Maruyama, M., Tanigawa, M., Sugiki, M., Yoshida, E., Mihara, H.** (1993) Purification and characterization of low molecular weight fibrinolytic/hemorrhagic enzymes from snake (*Bothrops jararaca*) venom. *Enzyme Protein* **47** : 124-135.
- Masuda, T., Yasumoto, K., Kitabatake, N.** (2000) Monitoring the irradiation-induced conformational changes of ovalbumin by using monoclonal antibodies and surface plasmon resonance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64** : 710-716.
- Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K.** (2000) Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1477** : 146-156.
- Mebs, D.** (1970) A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *Int. J. Biochem* **1** : 335.
- Mebs, D., Panholzer, F.** (1982) Isolation of a hemorrhagic principle from *Bitis arietans* (puff adder) snake venom. *Toxicon* **20** : 509-512.
- Menez, A.** (1993) Structures des toxines des animaux venimeux. *Pour la Science* **19** : 34-40.
- Moon, S., Song, K. B.** (2001) Effect of γ -irradiation on the molecular properties of ovalbumin and ovomucoid and protection by ascorbic acid. *Food Chemistry* **74** : 479-483.
- Moraes, C. K., Selistre-de-Araujo, H.** (2006) Effect of rACLF, a recombinant snake venom metalloproteinase on cell viability, chemokine expression and degradation of extracellular matrix proteins. *Toxicon* **48** : 641-648.
- Morais, V., Massaldi, H.** (2005) Effect of pepsin digestion on the antivenom activity of equine immunoglobulins. *Toxicon* **46** : 876-882.
- Moreira, L., Borkow, G., Ovadia, M., Gutiérrez, J. M.** (1994) Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom on mouse capillary blood vessel. *Toxicon* **32** : 977-987.

Mori, N., Nikai, T., Sugihara, H. (1984) Purification of a proteinase (Ac5-proteinase) and characterization of hemorrhagic toxins from the venom of the Hundred-PACE snake (*Agkistrodon acutus*). *Toxicon* **22** : 451-461.

Moroz, C., Goldblum, N., Varies, A. (1963) Preparation of *Vipera palestinae* antineurotoxin using carboxymethylcellulose- bound neurotoxin as antigen. *Nature* **200** : 697- 698.

Moura-da-Silva, A. M., Ramos, O. H. P., Baldo, C., Niland, S., Hansen, U., Ventura, J. S., Furlan, S., Butera, D., Della-Casa, M. S., Tanjoni, I., Clissa, P. B., Fernandes, T., Chudzinski-Tavassi, A. M., Eble, J. A. (2008) Collagen binding is a key for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Biochimie* **90** : 484-492.

Muniz, J. R. C., Ambrosio, A. L. B., Selistre-de-Araujo, H. S., Cominetti, M. R., Moura-da-Silva, A. M., Oliva, G., Garratt, R. C., Souza, D. H. F. (2008) The three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom: Insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups. *Toxicon* **52** : 807-816.

Murakami, M. T., Arni, R. K. (2003) A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipase A₂s. *Toxicon* **42** : 903-913.

Murakami, M. T., Kuch, U., Betzel, C., Mebs, D., Arni, R. K. (2008) Crystal structure of a novel myotoxic Arg49 phospholipase A₂ homolog (zhaoermiatoxin) from *Zhaoermia mangshanensis* snake venom. Insights into Arg49 coordination and the role of lys122 in the polarization of the C-terminus. *Toxicon* **51** : 723-735.

Murata, Y., Nishikawa, A. K., Nascimento, N., Higashi, H. G., Dias, D. S. W., Rogero, J. R. (1990) Gamma irradiation reduces the toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities. *Toxicon* **28** : 617.

Nagaraju, K., Girish, K. S., Fox, J. W., Kemparaju, K. (2007) Partitagin a hemorrhagic metalloprotease from *Hippasa partita* spider venom: Role in tissue necrosis. *Biochimie* **89**: 1322-1331.

Nakada, K., Nakada, F., Ito, E., Inoue, F. (1984) Quantification of myonecrosis and comparison of necrotic activity of snake venom by determination of creatine phosphokinase activity in mice sera. *Toxicon* **22** : 921-930.

Nascimento, N. D., Seebart, C. S., Francis, B., Rogero, J. R., Kaiser, I. I . (1996) Influence of ionizing radiation on crotoxin: Biochemical and immunological aspects. *Toxicon* **34** : 123-131.

Nikai, T., Taniguchi, K., Komori, Y., Masuda, K., Fox, J.W., Sugihara, H. (2000) Primary structure and functional characterization of bilitoxin-1, a novel dimeric P-II snake venom metalloproteinase from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch. Biochem. Biophys* **378** : 6-15.

Nishikata, M. (1984) Trypsin-like protease soybean seeds: Purification and some properties. *J. Biochem.* **95** : 1169-1177.

Oliveira, C. L. P., De la Hoz, L., Silva, J. C., Torriani, I. L., Netto, F. M. (2007) Effects of gamma radiation on β -lactoglobulin: oligomerization and aggregation, *Biopolymers* **85** : 284–294.

Oliveira, K. C., Spencer, P. J., Nascimento, N. (2009) Physico-chemical characterization of gamma rays irradiated crotonamine. *International Nuclear Atlantic Conference-INCA* : 01-06.

Omori-Satoh, T., Yamakawa, Y., Mebs, D. (2000) The antihemorrhagic factor, erinacin, from the european hedgehog (*Erinaceus europeans*), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P₃₅ lectin domains. *Toxicon* **38** : 1561-1580.

Oussedik-Oumehdi, H., Laraba-Djebari, F. (2008) Irradiated *Cerastes cerastes* Venom as a Novel Tool for Immunotherapy. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* **30** : 37-52.

Ouyang, C., Teng, C. M., Huang, T. F. (1992) Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon* **30** : 945-966.

Ownby, C. L., Gutiérrez, J. M., Colberg, T. R., Odell, G. V. (1982) Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon* **20** : 877-885.

Ownby, C. L., Colberg, T. R., Odell, G. V. (1984) A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venom : Ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. *Toxicon* **22** : 227-233.

Ownby, C. L., Colberg, T. R., Odell, G. V. (1985) Ability of a mixture of antimyotoxin a serum and polyvalent (*Crotalidae*) antivenom to neutralize myonecrosis, hemorrhage and lethality induced by prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Toxicon* **23** : 317-324.

Ownby, C. L., Nikai, T., Imai, K., Sugihara, H. (1990) Pathogenesis of hemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). *Toxicon* **28** : 837-846.

Pearn, J., Mc-Guire, B., Mc-Guire, L., Richardson, P. (2001) The envenomation syndrome caused by the australian red-bellied black snake *Pseudechis porphyriacus*. *Toxicon* **38** : 1715-1729.

Peichoto, M. E., Acosta, O., Leiva, L., Teibler, P., Marunak, S., Ruiz, R. (2004) Muscle and skin necrotizing and edema-forming activities of duvernoy gland secretion of the xenodontine colubrid snake *Philodryas patagoniensis* from the north-east of Argentina. *Toxicon* **44** : 589-596.

Petretski, J. H., Kanashiro, M., Silva, C. P., Alves, E. W., Kipnis, T. L. (2000) Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33** : 1293-1300.

- Pinho, J. R. R., Cardi, B. A., Andrade, J. H. F., Barr, P. J., Buthurst, I. C., Vicente, E. J., Schenberg, A. C.** (1995) Immunogenic properties of the *M leprae* recombinant 18 kDa antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma irradiation. *Int. J. Leprosy* **63** : 381-390.
- Premawardena, A. P., Seneviratne, S. L., Gunatilake, S. B., De-Silva, H. J.** (1998) Excessive fibrinolysis : The coagulopathy following merrem's Hump-Nosed viper (*Hypnale hypnale*) bites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58** : 821-823.
- Preston, S. A., Davis, C. E., Harris, J. B.** (1990) The assessment of muscle fibre loss after the injection of the venom of *Notechis scutatus* (Australian tiger snake). *Toxicon* **28** : 201-214.
- Rafael, A., Tanjoni, I., Fernandes, I., Moura-da-Silva, A. M., Furtado, M. F. D.** (2008) An alternative method to access *in vitro* the hemorrhagic activity of snake venoms. *Toxicon* **51** : 479-487.
- Ramos, O. H. P., Selistre-de-Araujo, H. S.** (2006) Snake venom metalloproteases-structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **142** : 328-346.
- Reid, H. A., Theakston, R. D. G.** (1984) Morsure de serpents. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé* **62** : 27-38.
- Rogero, J. R., Nascimento, N.** (1995) Detoxification of snake using ionising radiation. *J. Venom. Anim. Toxins* **1** : 7-10.
- Rucavado, A., Lomonte, B.** (1996) Neutralization of myonecrosis, hemorrhage, and edema induced by *Bothrops asper* snake venom by homologous and heterologous pre-existing antibodies in mice. *Toxicon* **34** : 567-577.
- Rucavado, A., Flores-Sanchez, E., Franceschi, A., Magalhaes, A. Gutiérrez, J. M.** (1999) Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon* **37** : 1297-1312.
- Salafranca, E.S.** (1972) Irradiated cobra (*Naja naja philippinensis*) venom. *Japanese journal of medical science and biology* **25** : 206.
- Salvini, T. F., Belluzzo, S. S., Selistre de Araujo, H. S., Souza, D. H. S.** (2001) Regeneration and change of muscle fiber types after injury induced by a hemorrhagic fraction isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* venom. *Toxicon* **39** : 641-649.
- Samel, M., Subbi, J., Siigur, J., Siigur, E.** (2002) Biochemical characterization of fibrinogenolytic serine proteinases from *Vipera lebetina* snake venom. *Toxicon* **40** : 51-54.
- Sanchez, E. F., Magalhaes, A., Diniz, C. R.** (1987) Purification of a hemorrhagic factor (LHF-I) from the venom of the Bushmaster snake *Lachesis muta muta*. *Toxicon* **25** : 611-619.

Sanner, T., Pihl, A. (1969) Enzymological aspect of food irradiation: fundamental aspects of enzyme inactivation by ionizing radiation. IAEA-PL. **28** : 23-36.

Sauviat, M. P., Meunier, F. A., Kreger, A., Molgo, J. (2000) Effects of trachynilysin, a protein isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom, on frog atrial heart muscle. *Toxicon* **38** : 945-959.

Schessler, H., Davies, J. V. (1983) Radiation induced reductions with bovine serum albuminates. *Int. J. Radiat. Biol.* **43** : 291-301.

Selistre, H. S., Queiroz, L. S., Cunha, O. A. B., De-Souza, G. E. P., Giglio, J. R. (1990) Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (Jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon* **28** : 261-273.

Sellahewa, K. H., Gunawardena, G., Kumararatne, M. P. (1995) Efficacy of antivenom in the treatment of severe local envenomation by the Hump-Nosed viper (*Hypnale hypnale*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53** : 260-262.

Six, D.A., Dennis, E.A. (2000) The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes : Classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* **1488** : 1-19.

Skalka, M., Antoni, F. (1970) Effect of radiation on the biological properties of proteins. International Atomic Energy Agency-PL **334** :1-11.

Soares, A. M., Andriao-Escarso, S. H., Angulo, Y., Lomonte, J; M., Gutiérrez, B., Marangoni, S., Toyama, M. H., Arni, R. K., Giglio, J. R. (2000) Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* **373** : 7-15.

Souza, F. A. D., Spencer, P. J., Rogero, J. R., Nascimento, N., Pai-Silva, M. D., Gallacci, M. (2002) ⁶⁰Co gamma irradiation prevents *Bothrops jararacassu* venom neurotoxicity and myotoxicity in isolated mouse neuromuscular junction. *Toxicon* **40** : 1101-1106.

Souza-Filho, J. N., Guarnieri-Cruz, M. C., Murata, Y., Rogero, J. R. (1992) Detoxification of the crotoxin complex by gamma radiation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **25** : 103-113.

Spencer, P. J. (1996) Biochemical and immunological alterations of ⁶⁰Co irradiated *Bothrops jararacassu* venom. *J. Venom. Anim. Toxins* **2** : 165.

Spencer, P. J., Nascimento, N., Rogero, J. R. (1997) Effect of ⁶⁰Co gamma irradiation on the antigenic and immunogenic properties of *Bothrops jararacassu* venom. *J. Venom. Anim. Toxins* **3** : 240.

Spencer, P. J. (2000) Effect of radiation on the structure of Bothropstoxin-I. *J. Venom. Anim. Toxins* **6** : 282-291.

Sugihara, H., Moriura, M., Nikai, T. (1983) Purification and properties of a lethal, hemorrhagic protein, "Mucrotoxin A", from the venom of Chinese habu snake (*Trimeresurus mucrosquamatus*). *Toxicon* **21** : 247-255.

- Stocker, K., Fisher, H., Brogli, M.** (1986) Chromogenic assay for the prothrombin activator ecarin from the venom of the saw-scaled viper (*Echis carinatus*). *Toxicon* **24** : 81-89.
- Stroka, A., Donato, J. L., Bon, C., Hyslop, S., Lôbo de Araujo, A.** (2005) Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Ferde-lance) snake venom. *Toxicon* **45** : 411-420.
- Takeya, H., Oda, K., Onikura, A., Mitaya, T., Iwanaga, S., Nikai, T., Sugihara, H., Omori-Satoh, T.** (1990) The structure and function relationship of hemorrhagic factors isolated from the venoms of *Trimeresurus flavoviridis* and *Crotalus ruber ruber*. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* **43** : 252-253.
- Tejason, P., Ottolenghi, A.** (1970) The effect of ultra-violet light on the toxicity and the enzymatic and antigenic activities of snake venom. *Toxicon* **8** : 225-233.
- Tõnismägi, K., Samel, M., Trummal, K., Rönholm, G., Siigur, J., Kalkkinen, N., Siigur, E.** (2006) L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* : isolation, characterization, effect on platelets and bacteria. *Toxicon* **48** : 227-237.
- Tsai, I. H., Wang, Y. M., Chen, Y. H., Tsai, T. S., Tu, M. C.** (2004) Venom phospholipases A₂ of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*) : molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. *Biochem.J.* **377** : 215-223.
- Valentin, E., Lambeau, G.** (2000) What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂. *Biochimie* **82**: 815-831.
- Vandenberg, B., Tessari, M., De-Haas, G. H., Verhei, J. H. M., Bøelens, R., Kaptein, R.** (1995) Solution structure of porcine pancreatic phospholipase A₂. *The EMBO journal* **14** : 4123-4131.
- Vanderwalt, S., Joubert, F.** (1971) Studies on puff adder (*Bitis arietans*) venom : Purification and properties of protease A. *Toxicon* **9** : 153-161.
- Visudhiphan, S., Tonmukayakul, A., Tumliang, S., Dumavibhat, B., Piankijagum, A.** (1989) Dark green pit viper (*Trimeresurus popeorum*) bite : Clinical and serial coagulation profiles in 51 cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **41** : 570-575.
- Von Kooij, J. G., Loaharanu, P.** (1982) Training manual on food irradiation techniques and technology. International Atomic Energy Agency **114** : 1-10.
- Waite, T. D., Kruger, P., Bryan, E., Swinwood, J. F.** (1992) Irradiation treatment of water and wastes. Rapport of the activities of the american of civil engeneers in symposium of karlshule : Application of isotopes and radiation in conservation of the environment. International Atomic Energy Agency : 143-151.
- Wang, W. J., Huang, T. F.** (2002) Purification and characterization of a novel metalloproteinase, Acurhagin from *Agkistrodon acutus* venom. *Thromb. Haemost.* **87** : 641-650.

Wang, W. J., Shih, C., Huang, T. (2005) Primary structure and anti-platelet mechanism of a snake venom metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom, *biochimie* **87** : 1065-1077.

Ward, R.J., Alves, A.R., Neto, J.R., Arni, R.K., Casari, G. (1998) A sequence space analysis of lys49 phospholipase A₂: clues towards identification of residues involved in a novel mechanism of membrane damage and in myotoxicity. *Protein Engineering* **11** : 285-294.

Watanabe, L., Shannon, J. D., Valente, R. H., Rucavado, A., Alapé-Giron, A., Kamiguti, A. S., Theakston, R. D., Fox, J. W., Gutiérrez, J. M., Arni, R. K. (2003) Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. *Protein Sci.* **12** : 2273-2281.

White, J. (2005) Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon* **45** : 951-967.

Xu, X., Wang, C., Liu, J., Lu, Z. (1981) Purification and characterization of hemorrhagic components from *Agkistrodon acutus* (Hundred pace snake) venom. *Toxicon* **19** : 633-644.

Yamaguchi, Y., Shimohigashi, Y., Chijiwa, T., Nakai, M., Ogawa, T., Hattori, S., Ohno, M. (2001) Characterization, amino acid sequence and evolution of edema-inducing, basic phospholipase A₂ from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *Toxicon* **39** : 1069-1076.

Zhang, D., Botos, I., Gomis-Ruth, F. X., Doll, R., Blood, C., Njoroge, F. G., Fox, J. W., Bode, W., Meyer, E. F. (1994) Structural interaction of natural and synthetic inhibitors with the venom metalloproteinase, atrolysin C (form d). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91** : 8447-8451.

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** : 444-453.

VI.2. Thèses et Ouvrages

Aubry, P. (2007) Envenimation par les animaux terrestres. *Medecine Tropicale*.

Audebert, F. (1993) Analyse chimique et pharmacocinétique des envenimations par les vipères européennes. Thèse de Doctorat. Université de Paris VII pp : 1-23.

Avrameas S., Ternynck T. (1991) Techniques immunoenzymatiques. Edition. Inserm. Société Française d'Immunologie pp : 14-30.

Bertin, M. (1987) Les effets biologiques des rayonnements ionisants pp : 260.

Bourgeois, C. M., Mescle, J. F., Zucca, J. (1990) Microbiologie alimentaire. Edition Lavoisier. Tome I pp : 295-309.

Cabanne, F., Bonenfant, J. L. (1980) Anatomie pathologique : principes de pathologie générale et spéciale. Edition Maloine S. A, Paris.

Cesari, E., Boquet, P. (1935) Venins de serpent et anti-venins. Edition Med. Flammarion pp : 63.

Choumet, V., Audebert, F., Rivière, G., Urtizberea, A., Sabouraud, S., Schermann, J.M., Bon, C. (1996) New approaches in antivenom therapy. Natural toxins II, Edited by Singh B. R and Th. T: 515-519.

Ernest, C. H., Zug, R. (1999) Snakes bites and venom (*Viperidae*). Editions Harrison, New York pp : 126.

Ferradini, C., Pucheault, J. (1983) Biologie de l'action des rayonnements ionisants. Edition MASSON pp : 205.

Golvan, Y. J. (1983) Eléments de parasitologie médicale. Edition FLAMMARION pp : 519-533.

Gruber, U. (1992) Guide des serpents d'Europe d'Afrique du Nord du Moyen-Orient. Delachaux et Niestlé, Paris pp : 30-177.

Laraba-Djebari, F. (1984) Contribution à l'étude structurale et biochimique de la phospholipase A₂ du venin de *Cerastes cerastes* d'Afrique. Thèse de Magister. U.S.T.H.B. pp : 72.

Laraba-Djebari, F. (1996) Etude des polypeptides pharmacologiquement actifs isolés à partir de la vipère *Cerastes cerastes* et du scorpion *Androctonus australis hector*, purification, caractérisation biochimique et pharmacologique. Thèse de Doctorat d'Etat, USTHB pp : 182.

Largeoux, J., Andereose, M., Langrognat, M. (1995) Tout l'univers. Vol 2. Edition Hachette. Paris pp : 462-465.

Martoja, R., Martoja, M. (1967) Initiation aux techniques de l'histologie animale. Edition MASSON pp : 20-50.

Mathivet E. (1993) Les serpents. Edition Larousse pp : 276-279.

Oussedik-Oumehdi, H. (2007) Effet de l'irradiation gamma sur les propriétés biochimiques et immunologiques du venin de *Cerastes cerastes*: Apport dans l'immunothérapie ophidienne. Thèse de Doctorat d'Etat, USTHB pp :129.

Pulce C., Descoes J., Testud F., Vial T., Payen C. (2003) Les envenimations vipérines en France. Vigitox 21.

Ringwold, J. C. (2001) Les serpents venimeux. "les amis de l'Aquarium 1932".

Serve F. (1992) Morsures de serpents en France. In Urgences medico chirurgicales de l'adulte. Carli P., Riou B., Arnette : 805-808.

Slatter, R. J. (1990) Radioisotopes in biology : a practical approach. IRL Press, USA.

Tubiana, M., Dutreix, J., Wanbersie, A. (1986) Radiobiologie. Edition HERMANN pp : 1-103.

Warrell, D. A. (1995) Clinical toxicology of snakebite in Africa and the Middle East/Arabian Peninsula. In Meier, J., White, J. (Eds.), Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. CRC Press, Boca Raton pp : 433-492.

Wisner, A., Bon, C. (2002). Venins et hémostasie. Toxines et recherche biomédicale. Edition scientifique et médicale pp : 321-324.

Yamamoto, O. (1992) Effect of radiation on protein stability. In: Ahern, T.J and Manning, M.C.Editors, Stability of protein pharmaceuticals, Plenum Press, New York. NY, USA pp : 361-419.

Annexe

Fiche technique de l'étude enzymatique

Calcul de l'activité enzymatique en UI/l

$$\text{Activité (UI/l)} = \frac{\Delta \text{ DO/min} \times \text{VT} \times 1000}{\text{Abs mM} \times \text{VE} \times 1}$$

VT = Variation d'absorbance par minute.

1000 = Facteur de conversion des UI/ml en UI/l.

Abs mM = Absorption millimolaire.

Abs mM du NADH à 340 nm = 6,3.

Abs mM de paranitrophénol à 405 nm = 18,45.

VE = Volume de l'échantillon.

1 = Trajet optique de la cuve = 1 cm.

$$\text{Activité CK (UI/l)} = \frac{\Delta \text{ DO/min} \times 1,02 \times 1000}{6,22 \times 0,02 \times 1} = \Delta \text{ DO/min} \times 8200.$$

Fiche technique de l'étude histologique

Préparation des alcools

- Alcool 70° = 100 ml d'alcool 100° + 48 ml d'eau distillée.
- Alcool 90° = 100 ml d'alcool 100° + 13 ml d'eau distillée.

Fiche technique N°1

Déshydratation des pièces après fixation

- 1 bain d'alcool 70° : pendant 10 à 15 minutes.
- 2 bains d'alcool 90° : pendant 10 à 15 minutes dans chacun.
- 3 bains d'alcool 100° : pendant 10 à 15 minutes dans chacun.
- 3 bains de toluène : pendant 10 à 15 minutes dans chacun.

Fiche technique N°2

Déparaffinage et hydratation

- 2 bains de toluène.
- 1 bain d'alcool 100°.
- 1 bain d'alcool 90°.
- 1 bain d'alcool 70°.
- 1 bain d'eau distillée.

Fiche technique N°3

Coloration topographique : Hématoxyline-Eosine

1- Colorant basique : "Hématoxyline"

Solution A

- Acide sulfurique concentré 1,6 ml.
- Alun de fer 2 g.
- Eau distillée 100 ml.

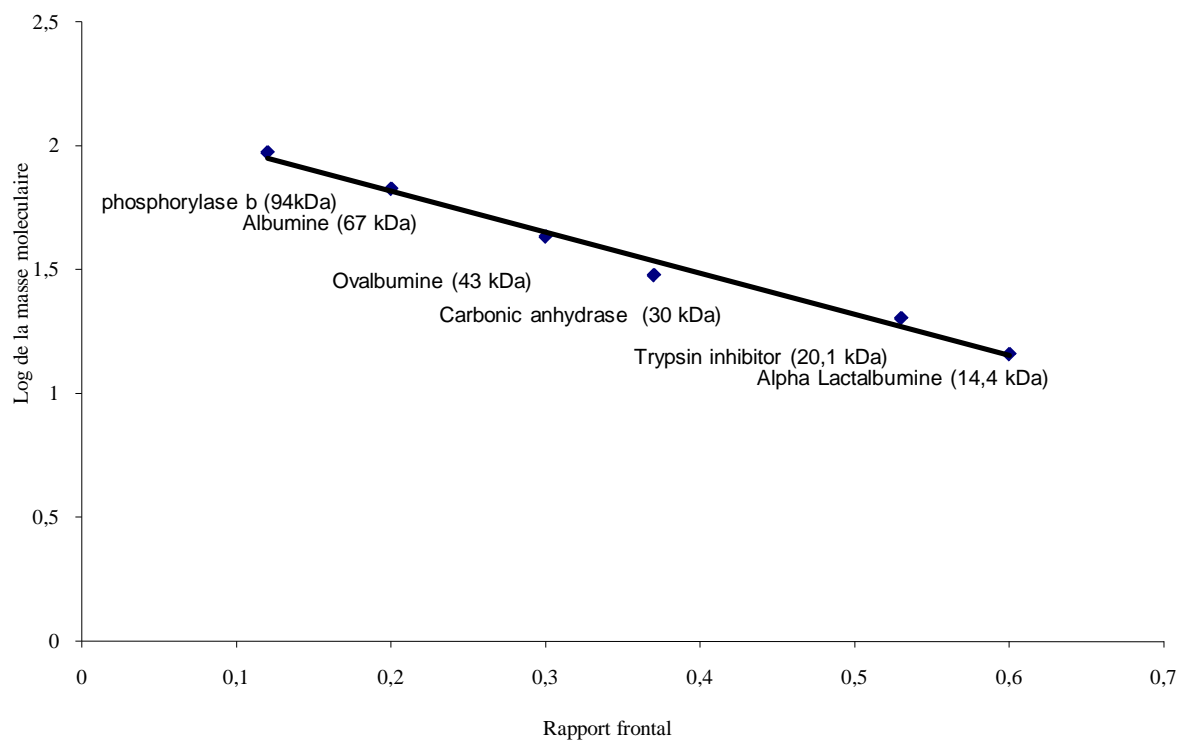
Solution B

- Hématoxyline 1 g.
- Alcool 95° 100 ml.

2- Colorant acide : "Eosine"

- Eosine 1 g.
- Eau distillée 100 ml.

Résultat : l'Hématoxyline permet de mettre en évidence les noyaux par une coloration teintée en noir, alors que le matériel extranucléaire est coloré en rose rouge due au colorant acide (Eosine).



Courbe d'étalonnage pré-établie avec les marqueurs de poids moléculaire par SDS-PAGE.

Résumé

Les venins de serpents constituent une source potentielle de protéines bioactives. Chacune de ces protéines peut provoquer de graves perturbations des systèmes biologiques de l'organisme. Ces perturbations sont à l'origine de l'œdème, de l'hémorragie et de la nécrose tissulaire caractéristique d'une envenimation vipérine. Ces symptômes représentent un sérieux problème clinique. Très souvent, ils ne sont presque pas neutralisés par les différentes préparations d'immun-sérums.

Dans cette étude, le venin de *Cerastes cerastes* a été irradié en utilisant une dose de 2 kGy émise par le Cobalt-60 à différents débits de doses estimés à 194, 765 et 1737 Gy/h. Après irradiation, la toxicité de ces venins est atténuée jusqu'à 25 DL50, alors que l'injection de 2 DL50 du venin natif (non irradié) provoque la mort de la totalité des souris d'un lot d'animaux. Les différentes préparations de venins de *Cerastes cerastes* (natif et irradiés) ont été séparées par RP-HPLC et électrophorèse. Les profils électrophorétique et chromatographique se sont révélés totalement modifiés comparés à celui du venin natif. Cette modification serait probablement due à la dégradation et/ou l'agrégation des protéines du venin expliquant en partie cette détoxification.

L'étude biochimique des différentes activités enzymatique et biologique des venins irradiés de *Cerastes cerastes* a montré que l'irradiation gamma a induit une diminution des activités protéolytiques et phospholipase A₂. A dose d'irradiation égale, les altérations induites sur les enzymes contenants dans le venin de *Cerastes cerastes* semblent avoir un caractère dose-réponse avec le débit de dose. De même, les activités biologiques du venin de *Cerastes cerastes* (hémorragique et myotoxique) semblent radiosensibles aux débits de dose d'irradiation appliqués.

Les venins natif et irradiés de *Cerastes cerastes*, ont été utilisés dans des protocoles d'immunisation de lapins, afin de tester leurs capacités neutralisantes sur les activités toxiques du venin natif. La caractérisation immunologique des immun-sérums préparés révèle que les venins irradiés sont immunogènes. Cependant, l'immun-sérum dirigé contre le venin irradié à une dose de 2 kGy, en utilisant un débit de 765 Gy/h, a une capacité neutralisante supérieure à celle des autres anti-venins.

La dose de 2 kGy et le débit de dose de 765 Gy/h semblent être les meilleures conditions d'irradiation du venin de *Cerastes cerastes*, car ils permettent un bon compromis entre détoxification et préservation des propriétés immunogènes. L'irradiation gamma présente l'avantage d'améliorer l'immunogénicité sans addition de molécules exogènes au venin, molécules qui peuvent détourner la réponse immunitaire à leur profit, comme cela a été observé pour d'autres méthodes chimiques de détoxification.

Par ailleurs, la purification des molécules responsables de l'activité hémorragique du venin natif de *Cerastes cerastes* par différentes techniques chromatographiques a permis de montrer que cette activité semble être liée à la présence d'une hémorragine, appelée CcH1, ayant une masse moléculaire de 25 kDa, suggérant qu'elle appartient à la classe I des métalloprotéinases hémorragiques. De plus, l'utilisation des anti-protéasiques (EDTA, 1,10-phenanthroline et le PMSF) a révélé que cette biomolécule hémorragique (CcH1) est une métalloprotéinase à zinc.

Mots clés : Venin; *Cerastes cerastes*; Irradiation gamma; Détoxification; Immunogénicité; Hémorragie; Purification ; Métalloprotéinase.

Abstract

The snake venoms are constituted of a true biochemical arsenal, containing a large variety of biologically active peptides and proteins. They are responsible for the development of local and systemic damage, and alterations at the site of the bite, which develop rapidly after the accident. Serotherapy is the most specific and effective treatment for the snake bites. The antivenoms are commonly obtained by hyperimmunization of animals that suffer from venom toxicity. The present report describes effects of dose rate of gamma radiation on toxicity, biochemical and immunological properties of *Cerastes cerastes* venom. This venom was irradiated with 2 kGy dose, using three doses rate of 194, 765 and 1737 Gy/h. These treated venoms did not have any residual lethal effects until 25 DL50. A biochemical characterization of in vitro enzymatic activities was performed. Caseinolytic, amidolytic, phospholipase A₂, hemorrhagic and myotoxic activities were reduced in the irradiated venom with a dose of 2 kGy, using a 194 and 765 Gy/h doses rate. These activities were completely abolished in the 1737-Gy/h-irradiated venom. However, Irradiated venoms were immunogenic and the antibodies elicited by them able to recognize the native venom by enzyme-linked immunosorbent assay. Antisera raised against these toxoids had a higher neutralizing capacity than did the antiserum produced against the native venom. These results indicate that irradiation of *Cerastes cerastes* venom with a dose of 2 kGy dose, under a dose rate of 765 Gy/h, may offer an effective method for reducing the chronic toxic effects of venom in immunized animals. Furthermore, in this study, a hemorrhagic metalloproteinase (Cch1) was purified from *Cerastes cerastes* venom. This hemorrhagin was homogeneous on SDS-PAGE, with a molecular mass of 25 kDa. The hemorrhagic and proteolytic activities of Cch1 were inhibited by EDTA and 1,10-phenanthroline, but not by PMSF, suggesting that this protein is a zinc-metalloproteinase. The molecular mass and the inhibition assays suggest that the metalloproteinase Cch1 belongs to class P-I of SVMs.

Key words : *Cerastes cerastes* venom, Gamma radiation; Dose rate; Detoxification; Immunogenicity; Hemorrhage; Metalloproteinase.

ملخص

التسمم الثعباني يمثل مشكلا عويصا في الصحة العمومية في مختلف دول العالم . في الجزائر الأنواع الأكثر شيوعا هي *Vipera libetina* و *Cerastes cerastes*. لدغة هذا الأخير تؤدي إلى اختلالات نسيجية واستقلابية خطيرة والتي تعد مصدرا لظهور الأوديمية, النزيف الدموي والموت النسيجي. إن سم الثعابين عبارة عن خليط من البروتينات التي من بينهم عدد من الأنزيمات. هذه المركبات البروتينية هي التي تسبب هذه الإضطرابات الخطيرة في النظام البيولوجي لجسم الإنسان.

في هذه الدراسة تم التطرق الى النشاط النزيف الدموي الناجم عن لدغة *Cerastes cerastes*. تقييم النشاط النزيف الدموي دل على أن سم هذا الثعبان يحدث تسمما جلديا مؤديا بعد ساعتين . هذا النشاط ظهر بعد حقن فأران بسم الأصلي لثعبان *Cerastes cerastes* (V-natif), بينما السم المتغير (V-194 Gy/h, V-765 Gy/h و V-1737 Gy/h) تسبب في ظهور إضطرابات نسيجية أقل شدة من الاتي سببها السم الأصلي. قد يعود هذا الإنخفاض إلى الإشعاع Gamma الذي أدى إلى تخفيض مكونات السامة للسم الأصلي. هذه المكونات قد تكون المتسبب الوحيد لكل الأضرار الملحوظة. إن الدراسة التي تتناول الخصائص المناعية للمصل المضاد التجريبي الذي أعد باستخدام السم الأصلي و المتغير للأفعي *Cerastes cerastes* (Anti-V194 Gy/h, Anti-V765 Gy/h, Anti-V1737 Gy/h و Anti-Vnatif) أظهرت أن المصل المضاد التجريبي (Anti-V765 Gy/h) يحتوي على أكثر قطع F(ab')₂ المتخصص بالمقارنة مع المصل المضاد Anti-Vnatif و Anti-V194 Gy/h, Anti-V1737 Gy/h. يظهر من خلال النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة أن إستعمال الأشعاع Gamma بنسبة 2 kGy و 765 Gy/h يعتبر أفضل بنسبة لفقدان مفعول مكونات السم الأصلي للأفعي *Cerastes cerastes* مع صيانة كل خصائصه المناعية. برهنت مختلف المحاولات لفصل الجزيئات المتسببة في ظهور النزيف الدموي و المتواجدة في السم الأصلي للأفعي *Cerastes cerastes* تبين أن هذا النشاط راجع لوجود مركبة بروتينية ذات كتلة جزيئية 25 000 دالتون. الكلمات الدالة : *Cerastes cerastes*, سم, إشعاع Gamma, النزيف الدموي, الخصائص المناعية.