

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



THESE

PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTORAT EN
SCIENCES DE LA NATURE

Spécialité : BIOCHIMIE-IMMUNOLOGIE

Par

FATAH CHERIFI

THEME

Apport de l'analyse protéomique dans la purification et la caractérisation de nouvelles biomolécules pharmacologiquement actives à partir du venin de *Cerastes cerastes*: Leur biodistribution et implications dans les processus hémostatique et inflammatoire

Soutenue publiquement le 21-09-2011 devant le jury composé de :

Mme C. TOUIL-BOUKOFFA, Professeur à la FSB-USTHB

Présidente

Mme F. LARABA-DJEBARI, Professeur à la FSB-USTHB

Directrice de thèse

Mr A. NAMANE, Chef de la Plate-Forme de Protéomique, I P de Paris, France

Examinateur

Mme G. FAURE-KUZMINSKA, Docteur au Lab d'Immunologie Structurale, I P de Paris, France

Examinatrice

Mme FZ. ARDJOUN, Professeur au Service d'Hématologie, HCA, Ain Naâdja)

Examinatrice

Mr R. BAKOUR, Professeur à la FSB-USTHB

Examinateur

Mme H. OUSSEDIK-OUMEHDI, Maitre de Conférences à la FSB-USTHB

Examinatrice

A ma mère pour tout

A la mémoire de mon très cher père

A tous les membres de ma famille

A ma femme ainsi que sa famille

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au Laboratoire de Biologie cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Biologiques (USTHB) en collaboration avec le Laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie sous la direction du professeur Laraba-Djebari Fatima.

Si la réalisation et l'achèvement de ce travail ont vu le jour, c'est grâce à Dieu et au concours d'un grand nombre de personnes qu'elles trouvent ici l'expression de mes sincères gratitude.

Je tiens à remercier tout particulièrement:

Madame le professeur Laraba-Djebari Fatima, qui m'a fait l'immense honneur en me proposant cet intéressant sujet. Je tiens à la remercier pour la confiance qu'elle m'a accordée. Je la remercie vivement pour le temps et l'énergie qu'elle m'a consacrée lors de la réalisation de cette étude malgré ses nombreuses responsabilités et pour ses orientations, sa disponibilité, sa rigueur scientifique, son esprit d'équipe et pour ses conseils fort constructifs. Son expérience dans l'univers de la Recherche Scientifique m'a beaucoup apporté. Qu'elle trouve ici, l'expression de mon profond respect et de ma vive reconnaissance.

Madame le professeur Touil-Boukoffa Chafia, pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury et juger ce travail. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour ses nombreux encouragements qui nous ont beaucoup aidés.

Monsieur, le Docteur Abdelkader Namane, qui m'a encouragé et soutenu durant mes stages dans son laboratoire (Plate-forme de Protéomique, Institut Pasteur de Paris), je lui suis grés de l'accueil chaleureux et de nos diverses discussions scientifiques pendant mes séjours au sein de son service. Je le remercie sincèrement pour toute la partie protéomique réalisée dans cette thèse. Veuillez accepter Monsieur Namane A. l'expression de mon profond respect et de ma reconnaissance. Merci aussi d'avoir accepté d'être examinateur dans ce jury.

Madame, le Docteur Grazyna Faure-Kuzminska, chercheur au Laboratoire d'Immunologie Structurale, Service de Biologie structurale, Institut Pasteur de Paris, qui nous fait un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Je vous remercie Madame, pour votre gentillesse et pour nos discussions dans votre laboratoire sur l'usage de Biacore pour les phospholipases A2 anticoagulantes. Veuillez trouver ici l'expression de ma vive reconnaissance.

Madame le professeur Ardjoun Fatma-Zohra, Chef de service d'hématologie de l'hôpital Central d'Armée, Ain Naâdja, qui nous a honoré d'accepter aimablement d'examiner ce présent travail.

Monsieur, le professeur Bakour Rabah, je lui adresse mes vifs remerciements d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Madame le Docteur Habiba Oussedik-Oumehdi, je la remercie tout d'abord pour son aide inestimable et ses encouragements et surtout pour sa gentillesse. Je la remercie aussi d'avoir bien voulu juger cette thèse et accepter d'en être examinatrice.

Je tiens également à adresser vivement mes remerciements à :

Madame, le Professeur Hammoudi-Triki D, pour son amabilité, ses conseils et ses orientations qu'elle m'a prodigué depuis le début de cette thèse.

Monsieur Benayad Tahar, Chef de service de Toxicologie à la Police Scientifique, qui nous a très aimablement fourni de l'aide, c'est grâce à sa contribution que les analyses par HPLC ont été réalisées.

Je remercie particulièrement Mme Saaddine Souad, Ingénieur de Laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins de l'IPA, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Mes remerciements s'adressent aussi particulièrement à Mendil Amina et Adi-Bessalem Sonia avec qui j'ai beaucoup partagé durant les années de cette thèse. Je les remercie pour leur précieuse aide.

Je ne saurai oublier les collègues et amis particulièrement, Amrouche Lynda, Bennacef-Chaou Nadia, Bennacef-Heffar Nouara, Boukhalfa-Abib Hinda, Boussag-Abib Lila, Hamza Loubna, Kamel Assia, Saci Amel, Sami-Merah Sassia, Sebia-Amrane Fatima tout en leur souhaitant une bonne réussite dans leurs travaux de recherche.

Mes remerciements s'adressent aussi aux membres du la plate-forme de Protéomique particulièrement Jaune-Claude Rousselle et Véronique pour m'avoir aidé et pour toute la gentillesse qu'ils m'ont témoigné durant mon séjour au sein de leur équipe.

Mes vifs remerciements vont à mon cher ami Chérif Nadjib ainsi que sa famille, je le remercie pour son amitié, sa gentillesse, ses orientations et sa solidarité.

Merci en fin à tous les collègues et le personnel du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Biologiques et les membres des différents services de l'Institut Pasteur d'Algérie.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION

Liste des abréviations

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Les venins de *Viperidae* et leurs constituants

I.1.1. Protéinases

I.1.1.1. Les sérine protéinases

I.1.1.2. Les métalloprotéinases

I.1.2. Les phospholipases A2

I.1.3. Hyaluronidases

I.1.4. L-Amino-Acide-Oxydases

I.1.5. Les myotoxines

I.2. Pathophysiologie de l'envenimation vipérine

I.3. Les constituants des venins de *Viperidae* et leur action sur l'hémostase et l'inflammation

I.3.1. Hémostase et coagulation sanguine

I.3.1.1. Facteurs plasmatiques

I.3.1.1.1. Thrombine et prothrombine

I.3.1.1.2. Fibrinogène et fibrine

I.3.1.1.3. Plasminogène et plasmine

I.3.1.2. Les plaquettes sanguines

I.3.1.3. Processus de l'hémostase

I.3.1.3.1. L'hémostase primaire

I.3.1.3.2. La coagulation

I.3.1.3.3. La fibrinolyse

I.3.1.4. Régulation de l'hémostase

I.3.2. Action des biomolécules de venins sur l'hémostase

I.3.2.1. Les constituants activateurs de la coagulation sanguine

I.3.2.1.1. Action sur le facteur FX

I.3.2.1.2. Action sur la prothrombine

I.3.2.1.3. Action sur le fibrinogène et le plasminogène

I.3.2.1.4. Action sur les plaquettes sanguines

I.3.2.2. Les constituants inhibiteurs de la coagulation sanguine (anticoagulants)

I.3.2.2.1. Facteurs hémorragiques (métalloprotéinases SVMPS) et fibrinogénases

I.3.2.2.2. Facteurs lipolytiques (sPLA2)

- I.3.2.2.2. Désintégrines
- I.3.3. Utilisation des biomolécules des venins (SVSPs) comme outil en hémostase
- I.3.4. Action des biomolécules de venins sur l'inflammation
 - I.3.4.1. Action des protéases de venins sur les médiateurs enzymatiques de l'inflammation
 - I.3.4.2. Action des sPLA2 des venins et libération des médiateurs lipidiques de l'inflammation
 - I.3.4.3. Action des biomolécules des venins sur la libération des cytokines pro et/ou anti-inflammatoires
- I.4. Venin de *Cerastes cerastes* et ses molécules purifiées
- I.5. Traitements des envenimations vipérines
 - I.5.1. Traitement symptomatique
 - I.5.2. Traitements spécifiques
 - I.5.2.1. Immunothérapie antivenimeuse
 - I.5.2.2. Vaccinothérapie

II. MATERIEL ET METHODES

- II.1. Matériel
 - II.1.1. Matériel biologique
 - II.1.2. Matériel non biologique
- II.2. Méthodes
 - II.2.1. Purification de biomolécules à partir du venin de *Cerastes cerastes*
 - II.2.1.1. Chromatographies
 - II.2.1.1.1. Filtration moléculaire du venin sur Sephadex G-75
 - II.2.1.1.2. Chromatographies échangeuses d'ions
 - II.2.1.1.2.1. Chromatographies échangeuses d'anions
 - II.2.1.1.2.2. Chromatographies échangeuses de cations
 - II.2.1.1.2.3. Chromatographie d'affinité
 - II.2.1.1.2.4. Chromatographies liquides à haute pression en phase inversée (RP-HPLC)
 - II.2.1.2. Caractérisation physico-chimique et protéomique des molécules purifiées
 - II.2.1.2.1. Détermination de la masse moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide
 - II.2.1.2.2. Analyse protéomique des molécules purifiées à partir du venin de *Cerastes cerastes*
 - II.2.1.2.2.1. Hydrolyse enzymatique des molécules
 - II.2.1.2.2.2. Nano-chromatographies liquides sur colonne C18 des peptides issus de la digestion enzymatique des molécules
 - II.2.1.2.2.3. Analyses MS et MS/MS par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF/TOF couplé à la chromatographie liquide de type off-line
 - II.2.1.2.2.4. Identification des protéines
 - II.2.1.3. Caractérisation enzymatique et biologique des molécules purifiées du venin
 - II.2.1.3.1. Détermination des activités enzymatiques des molécules purifiées
 - II.2.1.3.1.1. Détermination de l'activité caséinolytique des molécules purifiées
 - II.2.1.3.1.2. Détermination de l'activité arginine ester hydrolase des molécules purifiées

- II.2.1.3.1.3. Détermination de l'activité amidolytique des molécules purifiées
- II.2.1.3.1.4. Détermination de l'activité phospholipasique des molécules purifiées
- II.2.1.3.1.5. Effets d'inhibiteurs sur les différentes activités enzymatiques
- II.2.1.3.2. Détermination des activités biologiques
 - II.2.1.3.2.1. Détermination de l'activité coagulante
 - II.2.1.3.2.2. Détermination de l'activité fibrinogénolytique
 - II.2.1.3.2.3. Détermination de l'activité hémorragique
 - II.2.1.3.2.4. Détermination de l'activité agrégante des plaquettes sanguines
 - II.2.1.3.2.5. Détermination de l'activité anti-agrégante des plaquettes
- II.2.2. Effets inflammatoires et métaboliques induits par les molécules purifiées
 - II.2.2.1. Effets inflammatoires du venin et des molécules purifiées
 - II.2.2.1.1. Effet du venin et des molécules purifiées sur les cellules inflammatoires dans le liquide péritonéale et le sang périphérique
 - II.2.2.1.2. Effect du venin et des molécules purifiées sur le taux des cytokines IL6 et IL10
 - II.2.2.1.3. Effect du venin et des molécules purifiées sur le taux de la peroxydase éosinophilique
 - II.2.2.1.4. Effect du venin et des molécules purifiées sur l'activité hémolytique du complément
 - II.2.2.1.5. Détermination du taux du fibrinogène plasmatique après envenimation ou administration des molécules purifiées
 - II.2.2.2. Effets métaboliques
- II.2.3. Biodistribution du venin et des molécules purifiées
 - II.2.3.1. Préparation et purification des anticorps de type Fab et F(ab')₂ antivenin
 - II.2.3.1.1. Couplage du venin de *Cerastes cerastes* au gel de Sepharose CL4B activé par le BrCN
 - II.2.3.1.2. Purification des anticorps par chromatographie d'affinité
 - II.2.3.2. Séroneutralisation et nouvelles DL50 du venin avec les anticorps purifiés
 - II.2.3.3. Détermination des titres des anticorps purifiés par ELISA simple
 - II.2.3.4. Préparation d'un conjugué
 - II.2.3.5. Biodistribution du venin et des molécules purifiées
 - II.2.3.5.1. Immuno-réactivité des molécules purifiées avec l'anticorps F(ab')₂ antivenin par ELISA et DOT-ELISA
 - II.2.3.5.2. Distribution du venin et des molécules par ELISA sandwich
- II.2.4. Action de l'immunothérapie sur les effets inflammatoires, métaboliques et sur la biodistribution du venin

III. RESULTAS ET DISCUSSION

- III.1. Purification de molécules ayant des activités serine protéase, métalloprotéinase et phospholipase A₂ à partir du venin de *Cerastes cerastes*
- III.2. Caractérisation structurale et biochimique des molécules purifiées
 - III.2.1. Caractérisation enzymatique des biomolécules purifiées

III.2.1.1. Détermination des activités enzymatiques

- Détermination des activités caséolytique, amide-hydrolase et arginine ester-hydrolase
- Détermination de l'activité phospholipasique de CC2-PLA₂

III.2.1.2. Effets des inhibiteurs sur les activités enzymatiques des molécules

III.2.2. Caractérisation biologique des molécules purifiées

III.2.2.1. Activités coagulante et fibrinogénolytique de CC3-SPase et CCSV-MPase

III.2.2.1.1. Activité coagulante

III.2.2.1.2. Activité fibrinogénolytique

III.2.2.1.3. Test de l'activité coagulante de CC3-SPase avec les plasmas déficients

III.2.2.1.3. Activité hémorragique de la molécule CCSV-MPase

III.2.2.1.4. Activités agrégante et anti-agrégante de CC3-SPase et CC2-PLA₂

III.2.2. Analyses MS et MS/MS par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF/TOF couplée à la chromatographie liquide de type off-line

III.3. Effets inflammatoires et métaboliques induits par les molécules purifiées

III.3.1. Effets inflammatoires induits par le venin et les molécules purifiées

III.3.1.1. Identification des cellules inflammatoires au niveau du liquide péritonéale et du sang périphérique après action du venin et les molécules purifiées

a- Inflammation observée au niveau du sang périphérique

b- Inflammation observée au niveau du liquide péritonéal

III.3.1.2. Effets du venin et des molécules purifiées sur la libération de quelques marqueurs de l'inflammation

III.3.1.2.1. Détermination de l'activité de la peroxydase éosinophile

III.3.1.2.2. Détermination de l'activité hémolytique du complément

III.3.1.2.3. Détermination de concentrations des cytokines IL6 et IL10

III.3.1.2.4. Détermination de la concentration du fibrinogène plasmatique après action des molécules CC3-SPase et CCSV-MPase

III.3.1. Effets métaboliques induits par le venin et les molécules purifiées

III.3.1.1. Effet du venin et les molécules sur la glycémie

III.3.1.2. Effet du venin et les molécules sur la cholestérolémie et la triglycéridémie

III.3.1.2. Effet du venin et les molécules sur l'urémie et la créatinémie

III.4. Etude de la cinétique de distribution du venin et des molécules purifiées

III.4.1. Préparation, purification et caractérisation des anticorps de type Fab et F(ab')₂ spécifiques au venin

III.4.2. Etude de l'antigénicité du venin et des molécules purifiées

III.4.3. Cinétique de distribution du venin et des molécules purifiées

III.4.3.1. Préparation d'un immuno-conjugué spécifique au venin de *Cerastes cerastes* et son utilisation en ELISA sandwich

III.4.3.2. Quantification du venin de *Cerastes cerastes* et des molécules purifiées par ELISA Sandwich

III.5. Effet de l'immunothérapie sur la distribution, les perturbations métaboliques et inflammatoires du venin

IV-DISCUSSION GENERALE

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

RESUMES

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les venins de *Viperidae* sont considérés une des bio-resources les plus importantes en molécules pharmacologiquement actives dont les protéinases (métalloprotéinases et sérine-protéinases) et les phospholipases A₂ (Franceschi *et al.*, 2000; Zouari-Kassentini *et al.*, 2009). Toutes ces molécules présentent un intérêt en biothérapie en tant que biomédicaments ou peuvent être utilisées comme outils pour le diagnostic.

Les sérine-protéases et les PLA₂ agissent sur le système hémostatique comme effecteur procoagulant, anticoagulant, pro- ou anti-agrégants des plaquettes sanguines. Certaines de ces molécules isolées principalement à partir des venins de *Viperidae* sont utilisées dans le diagnostic et le traitement de maladies thrombotiques et cardiaques.

Les métalloprotéinases sont capables d'induire des hémorragies locales ou systémiques après une inoculation du venin par voie intradermique ou sous-cutanée. Les métalloprotéinases sont responsables d'un syndrome hémorragique souvent accompagné par un œdème et une nécrose tissulaire lors d'une envenimation par les *Viperidae* (Mebs, 1986; Nelson, 1989; Smith et Figge, 1991; Warrel, 1993; Sellahawa *et al.*, 1995; Jia *et al.*, 1997; Anai *et al.*, 2002; Kamiguti, 2005; Ramos et Selistre-De-Araujo, 2006). Certaines de ces métalloprotéinases dites fibrino(géno)lytiques sont directement impliquées dans la coagulation du sang et peuvent agir sur le fibrinogène et/ou la fibrine (Chérifi *et al.*, 2010). De ce fait, elles sont considérées comme de puissants inhibiteurs de la coagulation sanguine.

Selon leurs activités, les métalloprotéinases pourraient être cliniquement utiles dans le cas des maladies thrombotiques (Swenson et Markland, 2005) et aussi dans le diagnostic et le traitement des troubles de l'hémostase (Kamiguti *et al.*, 1996).

L'activité anti-coagulante des PLA₂ est due à leur capacité à inhiber l'agrégation plaquettaire en raison de leur grande affinité pour le facteur de Stewart activé (FXa), (Faure *et al.*, 2000 et 2007; Faure et Saul, 2008; Saul *et al.*, 2008). L'implication directe de ces molécules dans la cascade hémostatique permet de les considérer comme des outils potentiels dans la compréhension de certaines pathologies hématologiques.

Outre leurs effets bénéfiques, les molécules de venins sont à l'origine des problèmes de santé dues aux envenimations ophidiennes. Plus de 100 000 de cas de décès sont enregistrés dans le monde dont 20 000 sont sur le continent africain, 400 000 des victimes envenimées gardent des séquelles fonctionnelles graves et permanentes (Bon *et al.*, 2000; Bellefleur et Le Dantec, 2005; Oussedik-Oumehdi, 2007). Les données épidémiologiques

estiment les cas d'envenimations à plus de 5 millions par an, avec un taux de mortalité de 2,5 %. En Afrique tropicale, les morsures de *Viperidae* sont responsables de 90 % des envenimations (Chippaux *et al.*, 1999).

En Algérie, deux espèces de vipères sévissent dans les zones désertiques et dans les hauts plateaux : *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*. La vipère à cornes *Cerastes cerastes* est considérée comme étant l'un des serpents les plus redoutables. Sa morsure est toujours grave et souvent mortelle. Les composants toxiques de ce venin ont plusieurs cibles, les muscles cardiaque et squelettique (Abib, 2002; Abib et Laraba-Djebari, 2003; Boukhalifa-Abib *et al.*, 2009) et les organes des fonctions vitales (foie, reins, cœur, poumon et pancréas) (Chérifi, 2004; Chérifi *et al.*, 2005).

Le venin de *Cerastes cerastes*, est un mélange contenant de nombreuses molécules bioactives, certaines d'entre elles ont été déjà isolées et caractérisées. La plupart de ces protéines agissent sur la coagulation sanguine, c'est le cas de la PLA₂ (Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1990), des enzymes de type thrombine, RP34 et Afaâcytine (Laraba-Djebari *et al.*, 1992, 1995), la fraction protéolytique anticoagulante (Chérifi et Laraba-Djebari, 2007), une sérine protéase agrégante (Chérifi et Laraba-Djebari, 2008) ainsi qu'une métalloprotéinase hémorragique (Cch1)(Boukhalifa-Abib *et al.*, 2009).

Actuellement, le seul traitement spécifique disponible contre les envenimations vipérines est l'immunothérapie. Les indications de cette thérapie, son mode d'administration et le type de préparation des anticorps sous forme de fragments F(ab')₂ ou Fab demandent encore à être mieux élucidés. L'amélioration de ce traitement nécessite la connaissance de la cinétique de distribution du venin dans les compartiments vasculaires et tissulaires.

Afin de mieux comprendre la diversité des actions biologiques du venin de *Cerastes cerastes* et de proposer de nouveaux schémas thérapeutiques efficaces autres que l'immunothérapie antivenimeuse, nous nous sommes intéressés dans ce travail à isoler et purifier à partir de ce venin de nouvelles molécules impliquées dans le processus hémostatique. La caractérisation et l'établissement de certaines propriétés biologiques de ces molécules, pourraient aboutir à leur éventuelle utilisation à des fins thérapeutiques.

La caractérisation des molécules du venin de *Cerastes cerastes* agissant sur la coagulation sanguine a été initiée dès les années 90. Deux molécules RP34 et Afaâcytine ont été déjà isolées et bien caractérisées respectivement en 1992 et 1995 (Laraba-Djebari *et al.*, 1992 et Laraba-Djebari *et al.*, 1995).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes proposés de:

- Purifier et caractériser d'autres molécules pharmacologiquement actives sur l'hémostase à partir du même venin de *Cerastes cerastes*.
- Elucider leur mécanisme d'action dans la coagulation sanguine et l'agrégation plaquettaire.
- Etudier l'action du venin de *Cerastes cerastes* dans les étapes hémostatiques.
- Etudier l'action des molécules d'intérêt et du venin sur le processus inflammatoire souvent lié à l'hémostase et aux perturbations métaboliques.
- Déterminer la biodistribution du venin ainsi que celle des molécules purifiées.
- Etudier l'action de l'immunothérapie sous forme de fragments Fab ou F(ab')₂ anti-venin, seuls ou en association sur la biodistribution, le processus inflammatoire et sur les perturbations métaboliques induites par le venin.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les venins de serpents sont composés de substances ayant des propriétés de plus en plus utilisées en recherche biomédicale et à des fins diagnostiques et/ou thérapeutiques. En effet, la nature spécifique des propriétés coagulantes ou anticoagulantes des venins les rend utiles pour l'étude des mécanismes hémostatiques. De même, la connaissance des effets combinés des différents constituants d'un venin permet de mieux comprendre les symptômes observés dans le cas de morsures par une espèce de serpent (Laraba-Djebari 1984; 1996).

I.1. Les venins de *Viperidae* et leurs constituants

La famille de *Viperidae* comprend les espèces nocturnes hautement venimeuses qui les rendent très dangereuses pour l'homme (Gruber, 1992; Ernest et Zug, 1999).

Les *Viperidae* sont très répandus dans les régions du Maghreb et s'étalent sur toute l'Afrique. Les espèces les plus dangereuses sont *Cerastes cerastes*, *Vipera lebetina*, *Echis carinatus*, *Echis colorata* et *Vipera xanthia* (Laraba-Djebari, 1996).

Les venins sont sécrétés par les glandes venimeuses. La quantité de venin retrouvée dans chaque glande varie entre 15 et 800 mg de produit sec.

La composition des venins de *Viperidae* est très complexe, ce sont des mélanges biologiques contenant essentiellement des protéines (90 %) ayant des activités biologiques diverses: des peptides, des bioamines, des flavines, des nucléotides et de faibles quantités de zinc, de cuivre et de fer (Laraba-Djebari, 1984; Menez, 1993; Bon *et al.*, 2000).

I.1.1. Protéinases

Les protéinases des venins de *Viperidae* représentent un groupe hétérogène de protéines enzymatiques de masse moléculaire variant entre 15 et 100 kDa (Laraba-Djebari *et al.*, 1992 et 1995; Wisner et Bon, 2002). Ces enzymes protéolytiques sont particulièrement impliquées dans la pathogénèse de la nécrose des tissus, de l'hémorragie et des troubles de la coagulation (Ramirez *at al.*, 1990; Thireau, 1995). Certaines de ces protéinases agissent sur les facteurs de coagulation sanguine et peuvent être pro-coagulantes ou anti-coagulantes selon qu'elles exercent des effets activateurs ou inhibiteurs des facteurs plasmatiques. Ces protéinases sont douées d'activités fibrino(geno)lytiques de type thrombine ou plasmine (Laraba-Djebari *et al.*, 1992; 1995; Laraba-Djebari, 1996; Chérifi et Laraba-Djebari, 2007; 2008). Les protéases de venins sont réparties en deux grandes classes d'enzymes: Les sérine protéinases et les métalloprotéinases (Maruyama *et al.*, 1992; Laraba-Djebari, 1996; Jin *et al.*, 2001; Bortoleo *et al.*, 2002; Samel *et al.*, 2002).

I.1.1.1. Les sérine protéinases

Les sérine protéinases présentent des propriétés structurales et biologiques communes, particulièrement avec la conservation de la triade catalytique Ser(195), His (57), Asp(102). La sous-famille des sérine protéinases de type thrombine présentent une homologie de séquence

allant de 60 à 66 % (Braud *et al.*, 2000a), (Figure 1). La structure de ces enzymes est stabilisée par des ponts disulfures (Maruyama *et al.*, 1992; Jin *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2001; Bortoleo *et al.*, 2002).

Ces enzymes sont capables d'hydrolyser des substrats naturels tels que la caséine, l'hémoglobine et le fibrinogène ainsi que des substrats synthétiques (Laraba-Djebari *et al.*, 1992). Chez l'homme, elles ont pour cible principale la cascade de coagulation et agissent comme de puissantes molécules agrégantes des plaquettes sanguines et tous les facteurs plasmatiques (Wisner et Bon, 1992; Braud *et al.*, 2000b) (Figure 2).

I.1.1.2. Les métalloprotéinases (MMPs et SVMPs)

- Les MMPs

Les métalloprotéinases comme leur nom l'indique, n'exercent leur action catalytique qu'en présence d'un ion métallique, le plus souvent l'ion de zinc (Markland, 1997; 1998), ce sont des enzymes Zn^{2+} dépendantes (Bjarnason et Fox, 1994; Hati *et al.*, 1999) ou Ca^{2+} ou Zn^{2+}/Ca^{2+} dépendantes. Les métalloprotéinases se caractérisent par une séquence de fixation de l'ion de zinc (HEXXHXXGXXH) qui correspond au motif essentiel responsable de l'activité protéolytique (Jia *et al.*, 1996; Gong *et al.*, 1998).

Les métalloprotéinases sont synthétisées en tant que protéines à multiples domaines comportant un peptide signal, un pro-domaine et un domaine de métalloprotéinase (Figure 3).

Le peptide signal est formé d'une séquence à dix-huit résidus d'acides aminés souvent hydrophobes. Le pro-domaine est composé d'une séquence d'environ 200 résidus d'acides aminés, il est responsable de l'activité enzymatique en interagissant avec le domaine catalytique.

Le domaine catalytique «métalloprotéase» (MP) formé d'environ 215 acides aminés est moins conservé que le pro-domaine (Paine *et al.*, 1992).

Le peptide "spacer" a été défini la première fois, comme segment d'interdomaine avec 13 à 15 résidus d'acides aminés, il est placé entre le domaine métalloprotéase et le domaine de désintégrine. Ce segment peut comporter des motifs disintégrines ou des domaines désintégrin-like. Dans ce cas, un résidu supplémentaire de cystéine de ce segment est impliqué dans la formation de liaison disulfure du domaine (tels que bitistatin-1 et catrocollastatin-C). Dans certaines SVMP, ce domaine pourrait être lié à la résistance à la protéolyse comme c'est le cas de la Jerdonitine (Fox et Serrano., 2005).

Dans le cas des désintégrines, le domaine disintégrin-like comprend 41 à 100 résidus d'acides aminés avec présence de ponts disulfures, c'est un puissant ligand d'intégrines (Gould *et al.*, 1990; Scarborough *et al.*, 1993; Morris *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2000; Mariano-Oliveira *et al.*, 2003; Cominetti *et al.*, 2003 et 2004).

<u>1</u>	<u>10</u>	<u>20</u>	Nom	Référence
VIGGAECNINEHRSLVLLYYSSRLFGGG			Cerstotine	(Marrakchi <i>et al.</i> , 1997)
MVLISVLA SLLVLQLSYAQKSELVIGG			Cerastocytine	(Dehkhil <i>et al.</i> , 2007)
VIGGDEXDINEHRSLALMYXSWSHRFX			RP34	(Laraba-Djebari <i>et al.</i> , 1992)
VIGGAEXNINEHRSLVLXYXSSSX			Afaâcytine	(Laraba-Djebari <i>et al.</i> , 1995)
VIGGAECNINEHRSLVLLYYSSRLFGHTLI			Cerastobine	(Farid <i>et al.</i> , 1989)
VIGGDECNINEHWLVUYEGTNWTFICGG			Ancrod	(Burkhat <i>et al.</i> , 1992)
VIGGRPCNINQHRSLALLY			α f-genase	(Samel <i>et al.</i> , 2002)
VVGGDECDINEHPFLVALY			VLFVA	(Siigur <i>et al.</i> , 1999)
VVGGRPCKINVHRSLVLLY			PA-BJ	(Serrano <i>et al.</i> , 1995)
VVGGRPCDINEHRSLAVLVKY			KN-BJ	(Serrano <i>et al.</i> , 1998)

Figure 1: Homologie des séquences N-terminales de certaines sérine protéinases de venins comparées à celle de la thrombine.

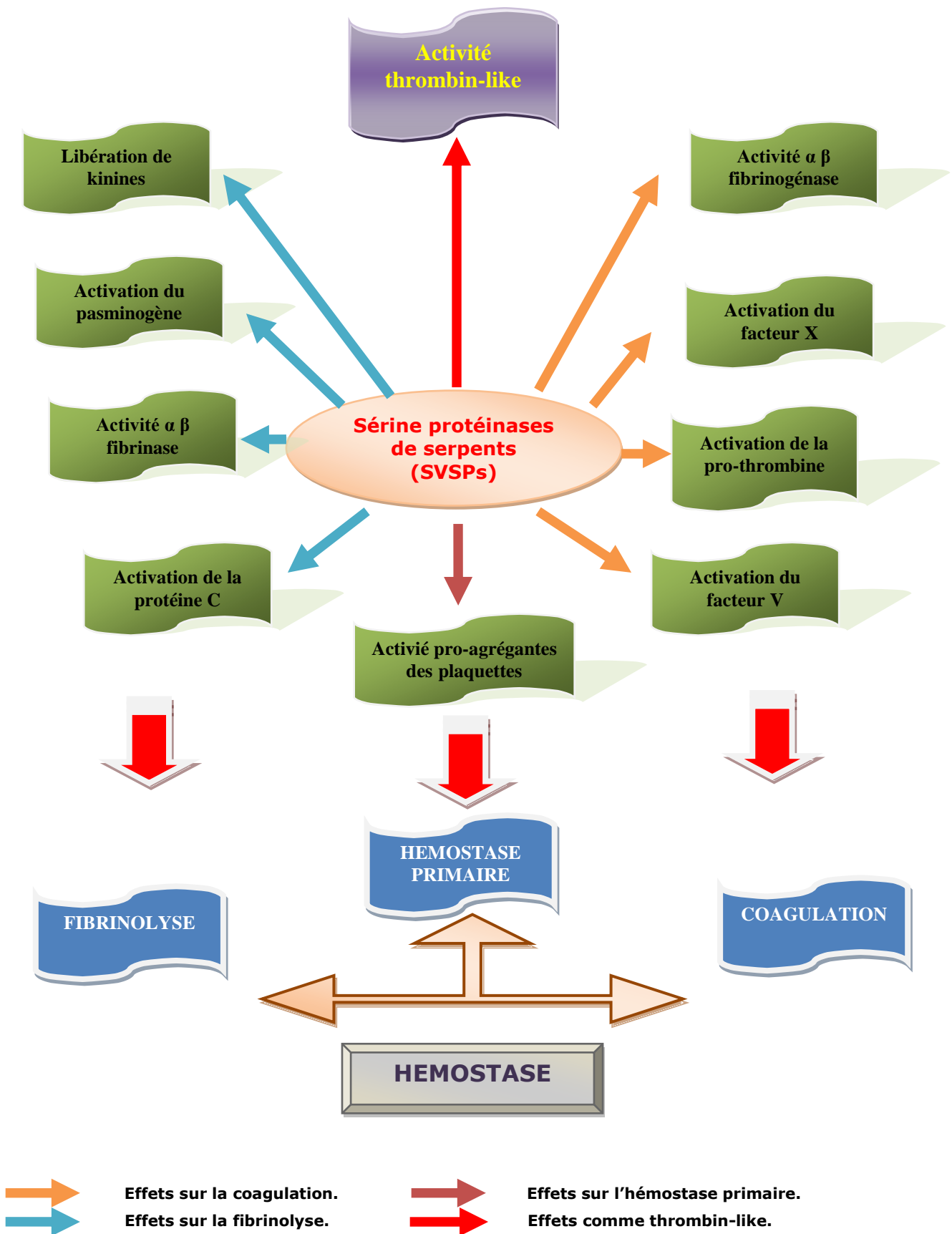
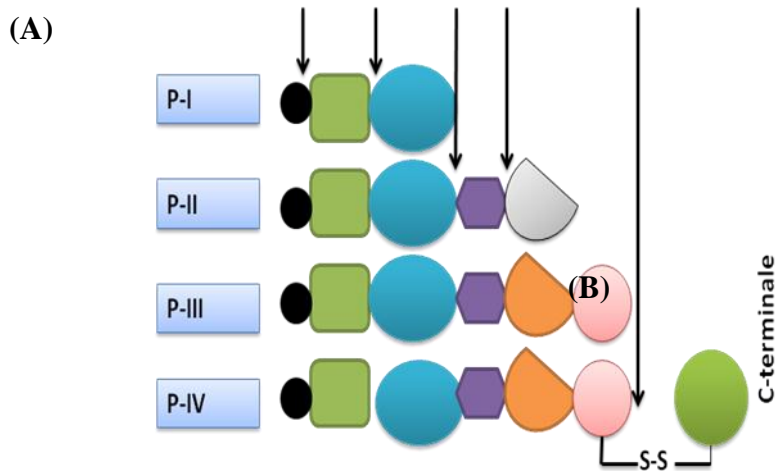
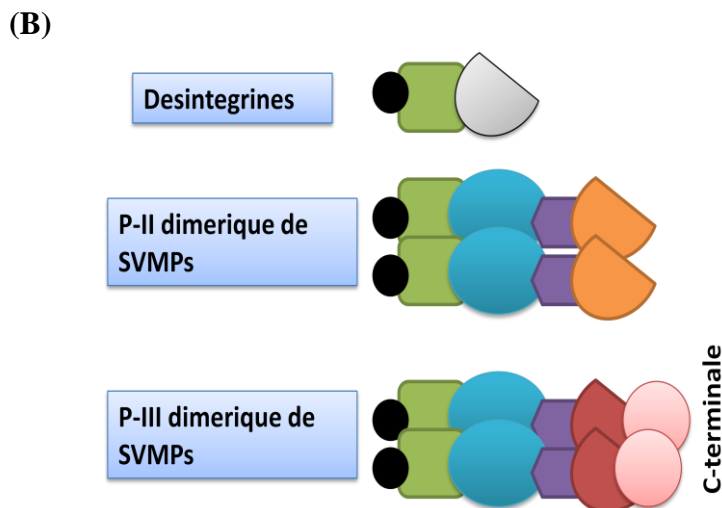


Figure 2: Implication des sérine protéinases de venins de serpents dans les perturbations hémostatiques (Kornalik, 1985; Maruyama *et al.*, 1992; Laraba-Djebari *et al.*, 1992 et 1995; Siigur *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2001; Bortoleo *et al.*, 2002).



(A) Classification proposant une origine commune pour des métalloprotéases et des désintégrines (Bjarnason et Fox, 1994).



(B) Précurseurs alternatifs des molécules dimères (Okuda *et al.*, 2002; Francischetti *et al.*, 2004). Peu d'études décrivant le PII dimère (Nikai *et al.*, 2000) et le PIII des SVMPs (Masuda *et al.*, 1998 et 2001; Cominetti *et al.*, 2003).

Figure 3: Représentation schématique des différents domaines des métalloprotéinases SVMPs des venin de *Viperidae*.

- Des points de traitement protéolytiques connus d'interdomaine sont indiqués par les flèches.

Les métalloprotéinases à zinc ont pour principale cible les composants de la membrane basale de l'endothélium cellulaire (le collagène, les protéoglycannes, la fibrinectine et la laminine) (Gutiérrez et Rucavado, 2000; Mebs, 2001). Ces enzymes sont impliquées dans la pathogénèse de la nécrose tissulaire (Rucavado *et al.*, 2001).

- **Les SVMPs (Snake Venom Metalloproteinases)**

Les métalloprotéinases isolées à partir des venins de serpents sont capables de perturber le système hémostatique car elles sont douées d'une activité α et/ou β fibrino(geno)lytique, mais la plupart de ces enzymes sont fibrinolytiques (Markland, 1997; 1998). Certaines de ces enzymes présentent une activité inhibitrice de l'agrégation plaquettaire potentialisant ainsi leur effet hémorragique (Lomonte *et al.*, 1994; Kamiguti *et al.*, 1998).

Les métalloprotéinases hémorragiques sont également connues sous le nom d'hémorragines et sont classées selon leurs structures et leurs masses moléculaires en 4 classes (Zhang *et al.*, 1994; Bjarnason et Fox, 1994; Lomonte *et al.*, 1996; Hati *et al.*, 1999; Franceschi *et al.*, 2000)(Figure 3).

- Les SVMPs de la classe I (P-I), sont des hémorragines présentant une masse moléculaire comprise entre 20 et 30 kDa. Du point de vue structural, ces enzymes possèdent uniquement un domaine "métalloprotéinase" constitué de 200 résidus d'acides aminés avec trois résidus histidine indispensables pour l'activité protéolytique (Jia *et al.*, 1996; Rucavado *et al.*, 1999; Omori-satoh *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002).
- Les SVMPs de la classe II (P-II), renferment les métalloprotéinases de masse moléculaire comprise entre 30 et 60 kDa. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine supplémentaire par rapport à la première classe. En effet, la classe P-II est formée d'un peptide signal, d'une pro-séquence et d'un domaine désintégrine associé au domaine "protéinase". Du point de vue fonctionnel, le domaine désintégrine pourrait avoir plusieurs rôles, il permettrait l'amplification de l'action des hémorragines en affectant l'agrégation des plaquettes (Kamiguti *et al.*, 1998; Franceschi *et al.*, 2000), mais également la fixation des protéinases hémorragiques sur des sites d'action particuliers présents sur les cellules endothéliales et les plaquettes sanguines.
- Les SVMPs de classe III (P- III) diffèrent structurellement de la classe précédente par l'existence d'un domaine supplémentaire riche en Cystéine (Jia *et al.*, 1996; Kini et Evans, 1992; Franceschi *et al.*, 2000). Elles regroupent les protéinases de masse moléculaire élevée (60-90 kDa). Ce sont des hémorragines très toxiques, leur activité hémorragique est 25 fois plus importante que celle des hémorragines de la classe P-I (Bjarnason et Fox, 1994; Jia *et al.*, 1997; Shimokaira *et al.*, 1997; 1998; Nikai *et al.*, 2000).

- Les SVMPs de classe IV (P-IV) présentent une masse moléculaire supérieure à 90 kDa. Leur particularité structurale réside dans l'existence d'un domaine de type lectine lié aux deux chaînes polypeptidiques des métalloprotéinases par des ponts disulfures (Zhang *et al.*, 1994; Lomonte *et al.*, 1996; Gutiérrez et Rucavado, 2000; Nikai *et al.*, 2000)(Figure 4).

Cette classification des SVMPs a été réactualisée par Fox et Serrano (2009). En effet, la classe II des SVMPs est subdivisée en deux sous-classes; les précurseurs PIIa de PII dont la forme mature ne libère pas le domaine de désintégrine et les précurseurs PIIb dont la forme mature comporte les SVMPs sous forme de dimère. La classe III des SVMPs est aussi subdivisée en précurseurs PIIIa qui libèrent leurs désintégrines, des domaines riches en cystéine et les précurseurs PIIIb de PIII qui forment des SVMPs sous forme de dimère.

L'existence d'une importante homologie de séquences a été établie grâce à la comparaison des séquences partielles en acides aminés du domaine "protéinase" de certaines métalloprotéinases appartenant aux quatre classes d'hémorragines (Tableau I).

Tableau I: Comparaison des homologies de séquences partielles du domaine protéinase (14 acides aminés) de certaines métalloprotéinases SVMPs.

Protéine	Séquence en acides aminés	PM (kDa)	% d'homologie	Nom de l'espèce	Références Bibliographiques
Acurhagine	VTKYNGDLDKTKTK	51	100	<i>Agkistrodon acutus</i>	Wang <i>et al.</i> , 2002
Catrocollastatine	VTK ^N NGDLDKTKT ^R	50	86	<i>Crotalus atrox</i>	Zhou <i>et al.</i> , 1996.
Brevily sine H6	VTK ^N NGDLDKTKT ^R	60	86	<i>Gloydus halys brevicaudus</i>	Fujimura <i>et al.</i> , 2000.
Jararhagine	VTK ^N NGDLDKTK ^{AR}	52	79	<i>Bothrops jararaca</i>	Paine <i>et al.</i> , 1992
Ht-e	^Y TKYNGSDSKT ^{RQR}	60	64	<i>Crotalus atrox</i>	Hite <i>et al.</i> , 1992
Acutolysine A	V ^K KYNGDSNST ^{KAW}	22	57	<i>Agkistrodon acutus</i>	Gong <i>et al.</i> , 1996
HR1B	VTK ^{HH} G ^N L ^{KKT} ^{RKW}	24	50	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	Takeya <i>et al.</i> , 1990

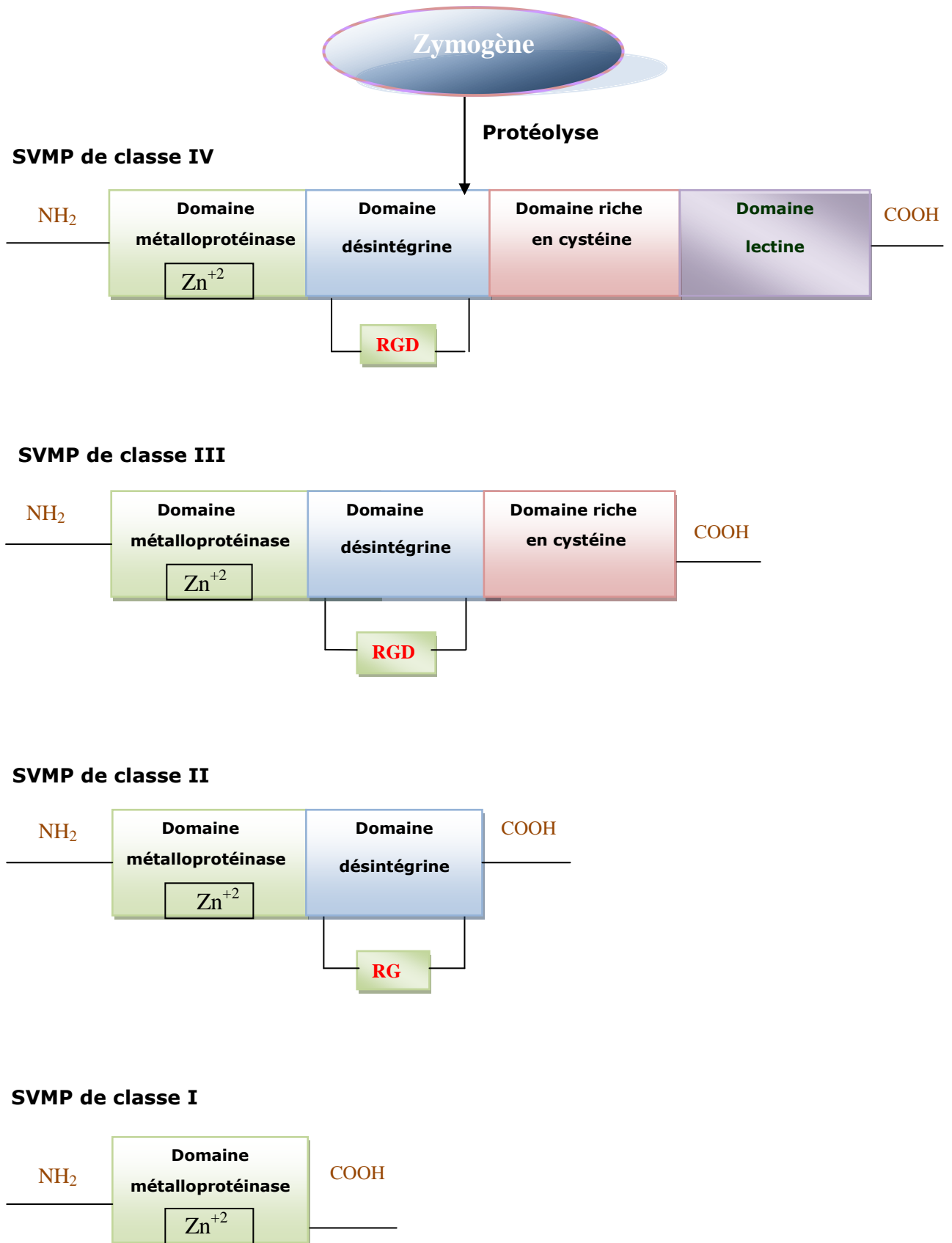


Figure 4: Organisation structurale des différentes classes de métalloprotéinases de serpents (SVMPs) (Kini et Evans, 1992)

I.1.2. Les phospholipases A₂

Les PLA₂ sont largement retrouvées dans les venins de *Viperidae* et d'abeilles (Laraba-Djebari, 1984). Ces PLA₂ sont impliquées directement dans la régulation de la biosynthèse des médiateurs lipidiques notamment les prostaglandines et les leucotriènes. Ces enzymes hydrolysent les phospholipides en position sn-2 libérant des acides gras et des lysophospholipides (Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1990; Dennis, 1994). Leur masse moléculaire varie entre 13 et 18 kDa. Leur activité catalytique dépend de la présence de l'ion Ca²⁺.

Plusieurs classifications des PLA₂ ont été proposées utilisant plusieurs critères. En effet, les sPLA₂ (snake PLA₂) ont été réparties en 11 groupes, sur la base de leur séquence, de la masse moléculaire, des homologies de séquences en acides aminés, du nombre de ponts disulfures et des effets physiopathologiques (Oussedik-Oumehdi, 2007). Les sPLA₂ appartiennent au groupe IA dans le cas d'*Elapidae* et d'*Hydrophidae* et au groupe IIA dans le cas des venins de *Viperidae* et de *Crotalidae* (Dufton et Hider, 1983).

Les sPLA₂ du groupe IIA sont subdivisées en deux sous groupes majeurs :

- Les sPLA₂ Asp49 (D49) possédant un résidu aspartate en position 49. Ce résidu contribue à l'activité catalytique des sPLA₂.
- Les sPLA₂ Lys49 (K49) ayant un résidu lysine en position 49. Ces sPLA₂ révèlent une faible activité catalytique.

L'activité catalytique importante des sPLA₂ D49 est attribuée à leur capacité de fixer le Ca²⁺ (requis pour l'activité) dans le domaine comportant les résidus 26-34 et le résidu 49. Les résidus Tyr 28, Gly30, Gly32 et Asp49 sont requis pour la fixation du Ca²⁺ avec perte d'un atome d'oxygène. Ces quatre sites sont conservés dans le cas des sPLA₂ D49. La substitution du résidu D49 par un autre résidu (cas des sPLA₂ K49) réduit de façon considérable l'activité catalytique de l'enzyme (Li *et al.*, 2001).

Selon la nature du résidu 49 des sPLA₂, d'autres sous groupes de sPLA₂ ont été identifiés:

- Les sPLA₂ N49 où le résidu aspartate est substitué par un résidu asparagine (Tsai *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2006).
- Les sPLA₂ Gln49 (Bao *et al.*, 2005).
- Les sPLA₂ Arg49 (Wei *et al.*, 2006).

Les sPLA₂ jouent également d'autres fonctions cellulaires et tissulaires (Figure 5).

Elles peuvent être hémolytiques, anticoagulantes, inhibitrices de l'agrégation plaquettaire (Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1990; Soares *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2002 a et 2002 b; Fuly *et al.*, 2004; Faure *et al.*, 2000 et 2007; Faure et Saul, 2008; Saul *et al.*, 2008; Zouari-Kessentini *et al.*, 2009). L'effet inhibiteur de la coagulation sanguine a permis de classer les sPLA₂ en trois groupes selon les séquences en acides aminés impliquées dans cette activité inhibitrice.

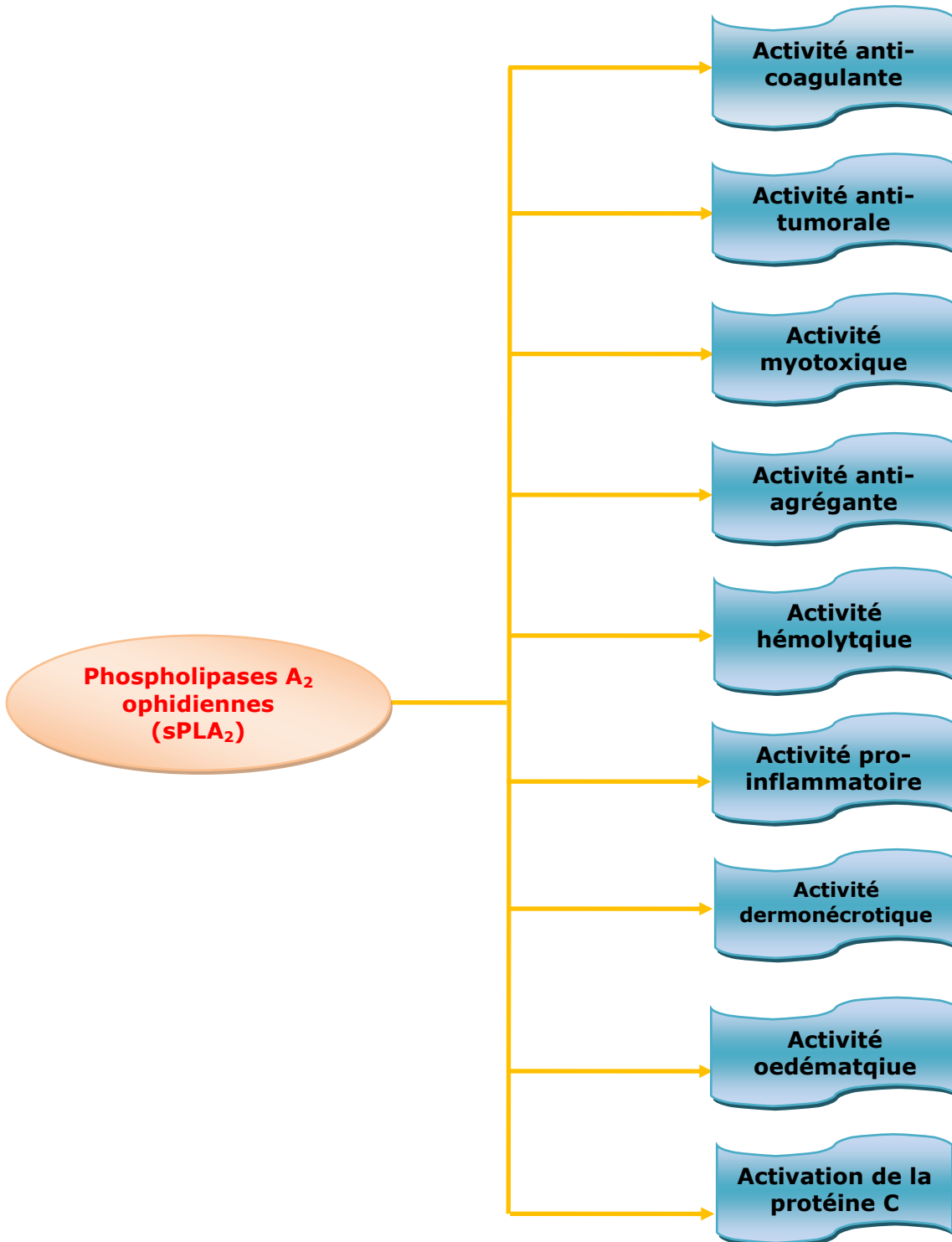


Figure 5 : Différentes activités des sPLA₂ de serpents (Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1990; Soares *et al.*, 2000; Faure, 2000; Lu *et al.*, 2002a et 2002b; Kanashiro *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2006; Faure *et al.*, 2000 et 2007; Oussedik-Oumehdi et Laraba-Djebari, 2007; Faure et Saul, 2008; Saul *et al.*, 2008; Zouari-Kessentini *et al.*, 2009 et 2010).

Plusieurs sPLA₂ ont été purifiées à partir des venins de serpents et caractérisées par leur activités anti-agrégantes des plaquettes sanguines. Dans le venin de *Cerastes cerastes*, trois PLA₂ ont été déjà purifiées et caractérisées (Tableau II).

Certaines sPLA₂ présentent une action sur les monocytes (Lioret et Monero, 1993; Landucci *et al.*, 1998; Zuliani *et al.*, 2005). Elles induisent également la migration des cellules cancéreuses (activité anti-tumorale)(Zouari-Kessentini *et al.*, 2009). Ces enzymes présentent également une activité pro-inflammatoire que nous développerons ultérieurement.

Tableau II: Quelques sPLA₂ précédemment isolées à partir du venin de *Cerastes cerastes*

Enzyme	Caractérisation biochimique	Caractérisation biologiques	Référence bibliographique
PLA ₂	PM = 14,5 kDa, pI de 5,4	hémolytique	Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1990
CC-PLA ₂ -1	13,737 kDa par spectrométrie de masse	anti-agrégante et anti-tumorale	Zouari-Kessentini <i>et al.</i> , 2009
CC-PLA ₂ -2	13,705 kDa par spectrométrie de masse	Isoforme de CC-PLA ₂ -2	Zouari-Kessentini <i>et al.</i> , 2009

L'implication du Ca²⁺ ainsi que la liaison de la PLA₂ à son récepteur ont été élucidées par Valentin et Lambeau (2000), (Figure 5). Le récepteur des sPLA₂ de type M est transmembranaire. Il est constitué de cinq domaines dont un domaine CRD-like comportant huit sous-domaines de carbohydrates, la reconnaissance des PLA₂ est attribuée à ces différents sous-domaines CRD, ces derniers ne présentent que 30 % d'homologie entre eux.

Des études de structure-fonction ont montré que le domaine CRD5 est impliqué dans la fixation des sPLA₂ par le biais du Ca²⁺, ce qui entraîne la perte de l'activité catalytique de l'enzyme après sa liaison à son récepteur.

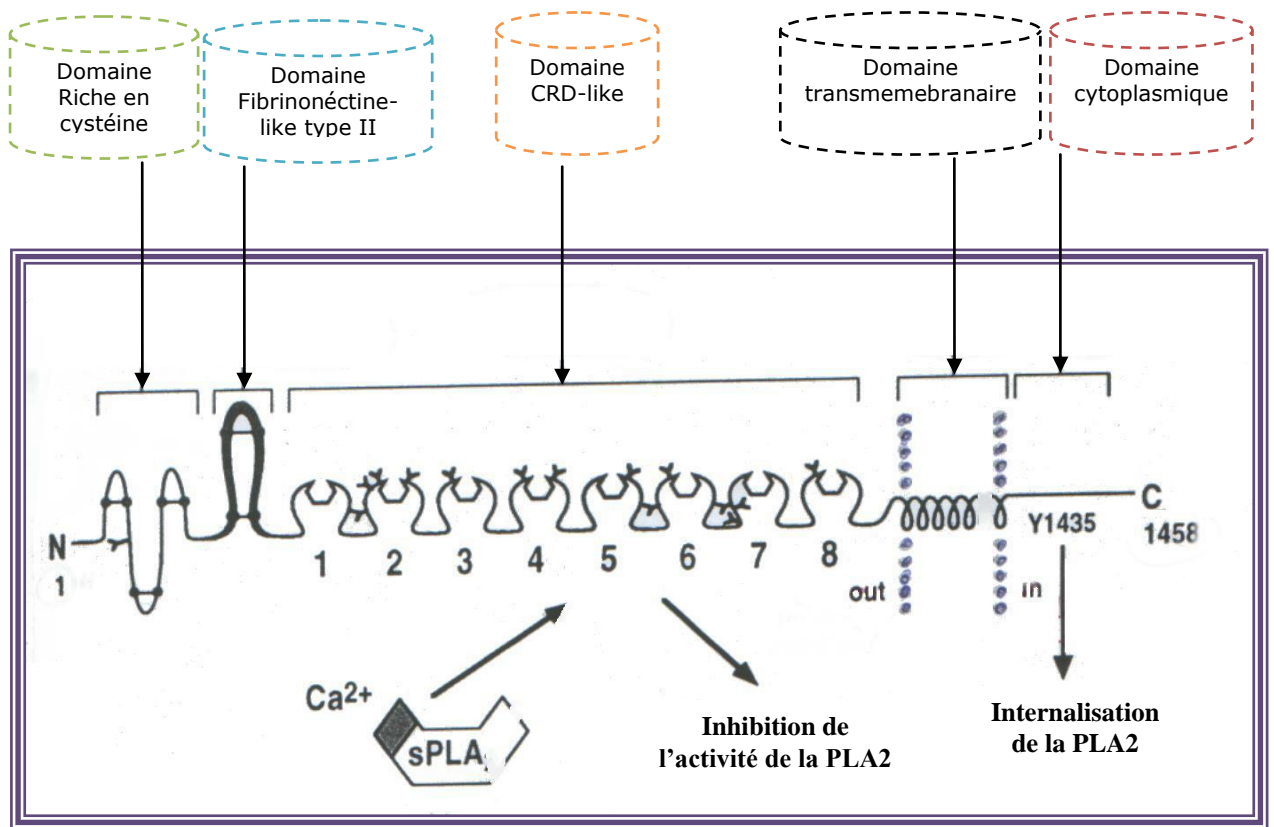


Figure 6 : Représentation schématique du récepteur des sPLA₂ (Valentin et Lambeau, 2000)

I.1.3. Hyaluronidases

Les hyaluronidases hydrolysent les liaisons glycosidiques des mucopolysaccharides des tissus conjonctifs. Ces enzymes induisent la perméabilité des tissus facilitant ainsi la diffusion des constituants du venin et entraînent une destruction des capillaires et une nécrose tissulaire (Bellairs, 1976; Audbert, 1993; Laraba-Djebari, 1996; Ernest et Zug, 1999). Une hyaluronidase a été purifiée ayant une masse de 75 kDa à partir du venin de *Cerastes cerastes* (Labib *et al.*, 1979).

I.1.4. L-Amino-Acide-Oxydases (LAAO)

Les L-Amino-Acide-Oxydases sont des glycoprotéines qui hydrolysent les acides aminés de la série L en α -céto-acides, ion ammonium et eau oxygénée. Dans les venins de serpents, plusieurs LAAO anti-bactériennes ont été purifiées et caractérisées (Stiles *et al.*, 1991; Suhr et Kim, 1996; Ali *et al.*, 2000; Takatsuka *et al.*, 2001; Tempone *et al.*, 2001; Du et Clemetson, 2002; Sun *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Stabeli *et al.*, 2004; Toyama *et al.*, 2006).

Les LAAO agissent également sur les plaquettes sanguines et les cellules tumorales, une LAAO isolée à partir du venin de Cobra *Ophiophagus hannah* présentant une masse moléculaire de 135 kDa et de pI 4,5 est douée d'une activité agrégante des plaquettes (Li *et al.*, 1994). Une autre LAAO ayant une masse moléculaire de 140 kDa a été aussi isolée à partir du venin de *Vipera lebetina* (Tönismagi *et al.*, 2006). Cette enzyme induit l'agrégation plaquettaire et présente un effet bactericide sur *E.coli*, cet effet est aboli par la catalase indiquant l'implication directe de l' H_2O_2 dans le processus antibactérien mis en jeu.

I.1.5. Les myotoxines

Les myotoxines sont présentes dans les venins de *Viperidae* et de *Crotalidae*. Elles sont responsables des nécroses tissulaires et des œdèmes, au niveau des sites de morsures. Certaines de ces myotoxines présentent une activité phospholipasique. Celles-ci sont considérées comme les principaux composants des venins responsables de la myotoxicité (Kini et Iwanaga, 1986; Jonhson et Ownby, 1993; Fuly *et al.*, 2000). Les myotoxines dépourvues d'activité enzymatique présentent deux séquences peptidiques proches de l'extrémité C-terminal (Kini et Iwanaga, 1986; Lomonte *et al.*, 1999; Angulo *et al.*, 2001), une séquence riche en acides aminés cationiques alors que la seconde séquence est riche en acides aminés hydrophobes. Ces deux séquences sont reliées par trois à quatre ponts disulfures (Figure 7) (Kini et Iwanaga, 1986; Lomonte *et al.*, 1999; Angulo *et al.*, 2001).

Les myotoxines se lient à leur récepteur grâce à la séquence cationique puis pénètrent dans la bicouche lipidique par le biais de leur séquence hydrophobe (Lambeau *et al.*, 1994). Il en résulte une déstabilisation de la membrane cellulaire se traduisant par une perturbation de la perméabilité aux ions et aux macromolécules (Gutiérrez et Lomonte, 1995).

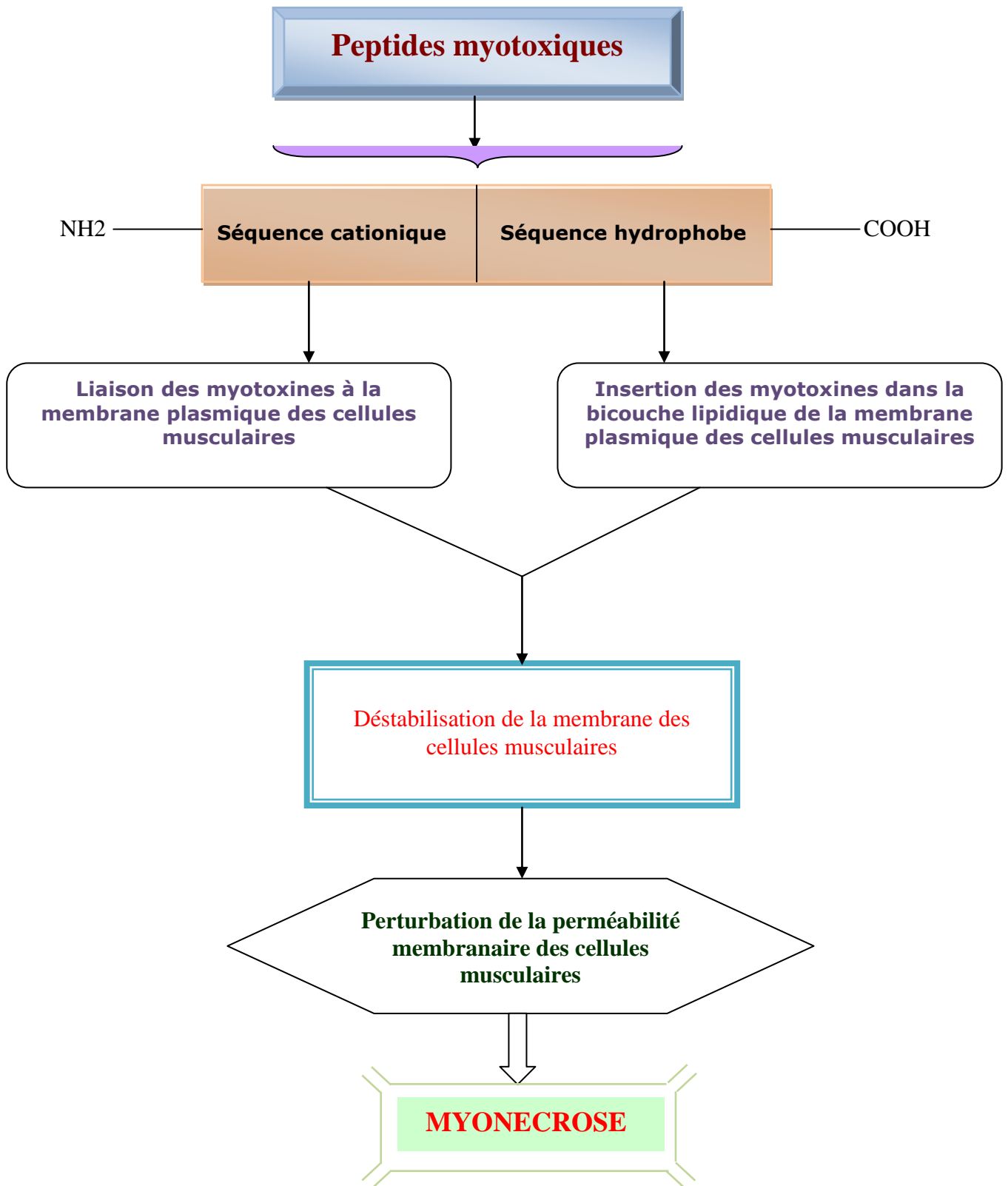


Figure 7: Mécanisme d'action des myotoxines des venins de serpents (Gutiérrez et Lomonte, 1995; Angulo *et al.*, 1997; Boer-Lima *et al.*, 1999; Harris *et al.*, 2000)

I.2. Pathophysiologie de l'envenimation vipérine

Les envenimations vipérines sont caractérisées par des hémorragies, des nécroses cellulaires et tissulaires, un œdème ainsi que des effets systémiques tels que le néphrotoxicité et les coagulopathies (Warrel, 1995; 1996). Ces différentes altérations chez l'homme dépendent de la quantité de venin injecté, du site de morsure, de l'âge et du poids de la victime ainsi que de la réaction de chaque individu. Les venins de *Viperidae* induisent des effets pathophysiologiques très diversifiés. Les principales cibles des venins sont le système cardio-vasculaire, la perméabilité vasculaire, la fonction rénale ainsi que l'hémostase.

Le syndrome hémorragique qui caractérise les envenimations vipérines, est un symptôme qui apparaît très rapidement dès les premières minutes qui suivent une morsure (Gutiérrez *et al.*, 1994; Rucavado *et al.*, 1995). La pathogénèse de l'hémorragie vipérine implique une altération directe des vaisseaux sanguins par les hémorragines dont l'action pourrait être amplifiée par la participation d'autres composants du venin. Cependant, l'hémorragie peut se faire en absence de perturbations hémostatiques (Kamiguti *et al.*, 1992).

Lors d'une envenimation vipérine, le syndrome hémorragique est souvent accompagné d'un œdème associé à un syndrome inflammatoire local et systémique. Cet œdème est probablement dû à l'augmentation de la perméabilité capillaire suite à l'action combinée des PLA₂, des myotoxines, des hémorragines et des protéases du venin (De Araujo *et al.*, 2000).

L'envenimation vipérine est également caractérisée par une nécrose tissulaire accompagnée par une réponse inflammatoire. La PLA₂ et les métalloprotéinases pourraient être à l'origine de ces réactions inflammatoires. Les sérine protéinases, quant à elles, perturbent le système hémostatique de la victime envenimée, conduisant souvent au décès suite à une coagulation intra-vasculaire pulmonaire (Laraba-Djebari, 1996).

La toxicité du venin de *Cerastes cerastes* a été estimée par son pouvoir létal déterminé à 2,5 mg/Kg d'animaux (Laraba-Djebari, 1996). Cette toxicité résulte de l'action conjuguée ou synergique des différentes enzymes du venin.

I.3. Les constituants des venins de *Viperidae* et leur action sur l'hémostase et l'inflammation

Les mécanismes impliqués dans le processus de l'hémostase sont très complexes, de ce fait nous avons jugé utile de rappeler les bases de ce processus avant de considérer les effets des différents constituants des venins sur ce processus. La relation entre l'hémostase et la réaction inflammatoire sera abordée ultérieurement.

I.3.1. Hémostase et coagulation sanguine

Le terme hémostase, du grec haima (sang) et stasis (arrêt), correspond au processus physiologique qui regroupe l'ensemble des phénomènes (réactions activées successivement)

destinés à limiter les pertes sanguines au niveau d'une brèche vasculaire spontanée ou provoquée (Lévy, 2001). Il se forme alors un thrombus plaquettaire, qui colmate la lésion vasculaire. Ce processus s'effectue en trois étapes successives (Abgrall, 1999):

- L'hémostase primaire.
- La coagulation plasmatique.
- La fibrinolyse.

L'hémostase primaire dite également agrégation plaquettaire irréversible et la coagulation plasmatique, conduisent à la formation d'un caillot ou thrombus plaquettaire. La fibrinolyse, est la dissolution de ce caillot une fois la réparation du vaisseau est achevée (Abgrall, 1999).

Ces trois étapes de l'hémostase font impliquer un ensemble de réactions d'activations successives plasmatiques (Figure 8).

I.3.1.1. Facteurs plasmatiques

Les facteurs plasmatiques de la coagulation sanguine sont tous de nature protéique, glycosylés ou non, ils sont soit des pro-enzymes ou des cofacteurs qui sont activés de manière séquentielle (Marieb, 2004).

I.3.1.1.1. Thrombine et prothrombine

Une des principales réactions de la coagulation du sang est l'activation de la prothrombine (FII) en sérine protéinase activée; la thrombine (FIIa) (Figure 9). La prothrombine est un zymogène circulant de nature glycoprotéique synthétisé par la cellule hépatique. Elle est formée d'une seule chaîne polypeptidique de 582 résidus d'acide aminé, dont nous distinguons deux parties :

- Une partie pro enzyme, divisée elle-même en deux structures de fonctions distinctes : le fragment 1 responsable de la liaison avec les couches phospholipidiques par l'intermédiaire du Ca^{2+} ; et le fragment 2, qui interagit avec le facteur Va (ButkowskI. et Elion., 1977).
- Une partie enzyme porteuse du site actif (Pommereuil, 1999).

Le mécanisme de l'activation de la prothrombine en thrombine se produit à l'interface des phospholipides de la membrane plaquettaire activée (le facteur III plaquettaire) et nécessite la présence d'un cofacteur le FVa et de Ca^{2+} qui servent du récepteur au Xa. La prothrombine se fixe par l'intermédiaire du Ca^{2+} et sous l'action du FXa, elle subit deux clivages successifs aboutissant à la thrombine (Pommereuil.,1999).

La combinaison du facteur Xa, du facteur Va, des ions Ca^{2+} et d'une surface phospholipidique anionique compose le complexe prothrombinase.

La thrombine libérée (FIIa) est un hétéro dimère constitué d'une chaîne légère (A) et d'une chaîne lourde (B)(Dawie *et al.*,1986). Le résidu sérine du site actif a été identifié au niveau de la chaîne lourde (Dreyfus, 1992)(Figure 9).

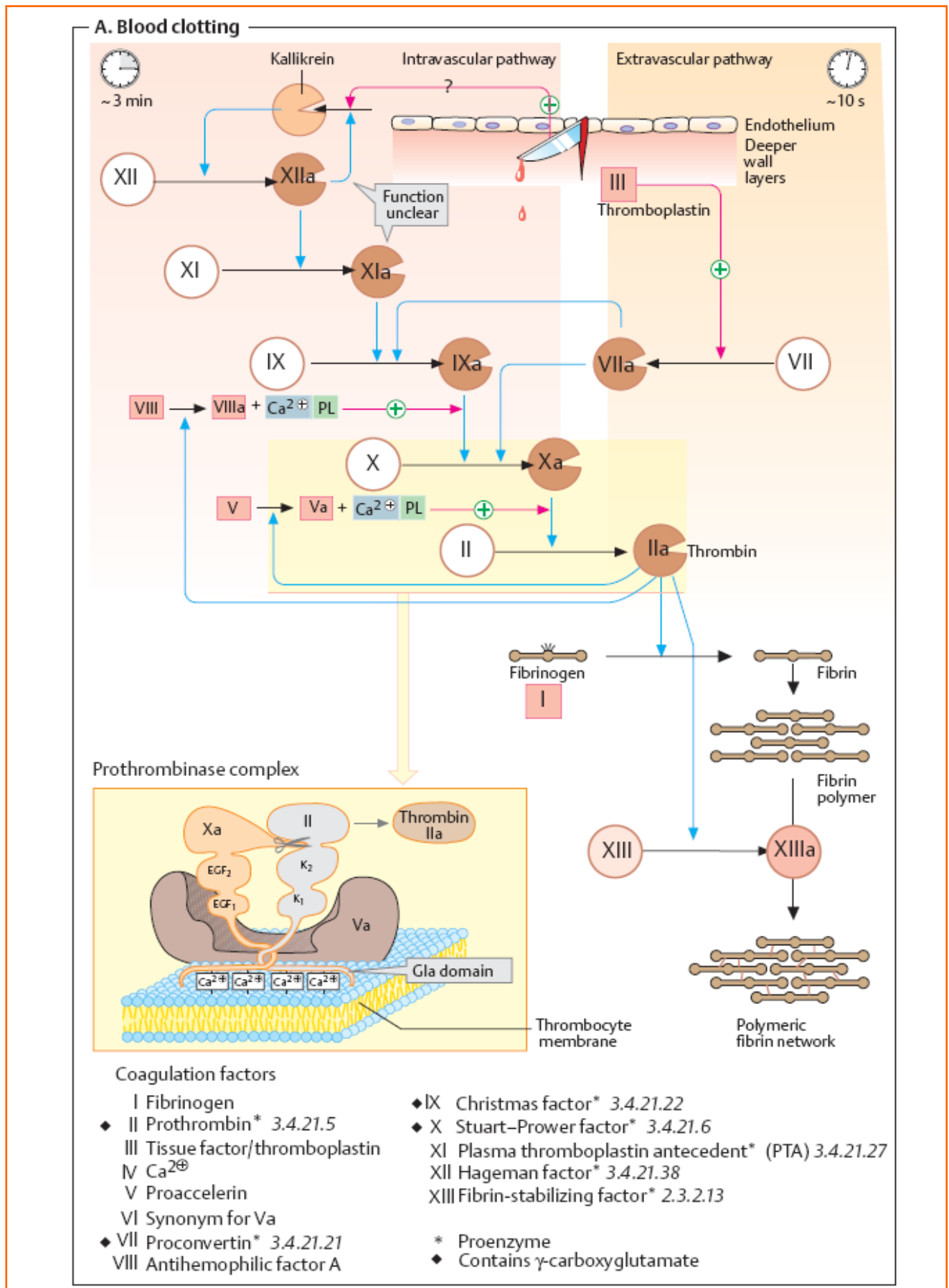
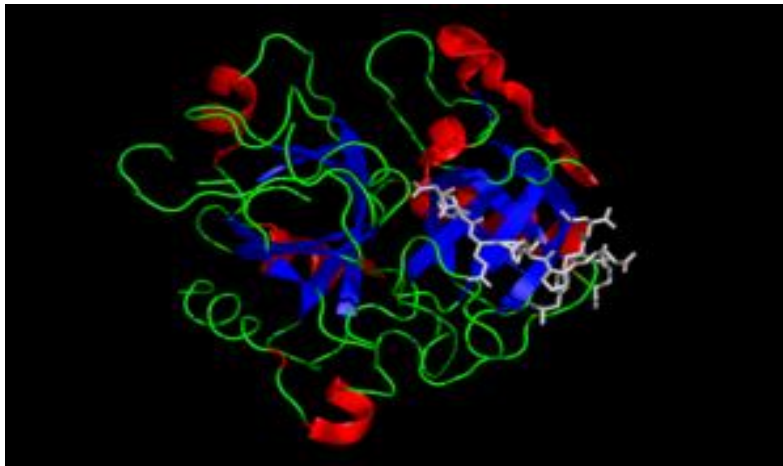


Figure 8: Schéma de la coagulation sanguine (Koolman et Roehm, 2005)

A



B

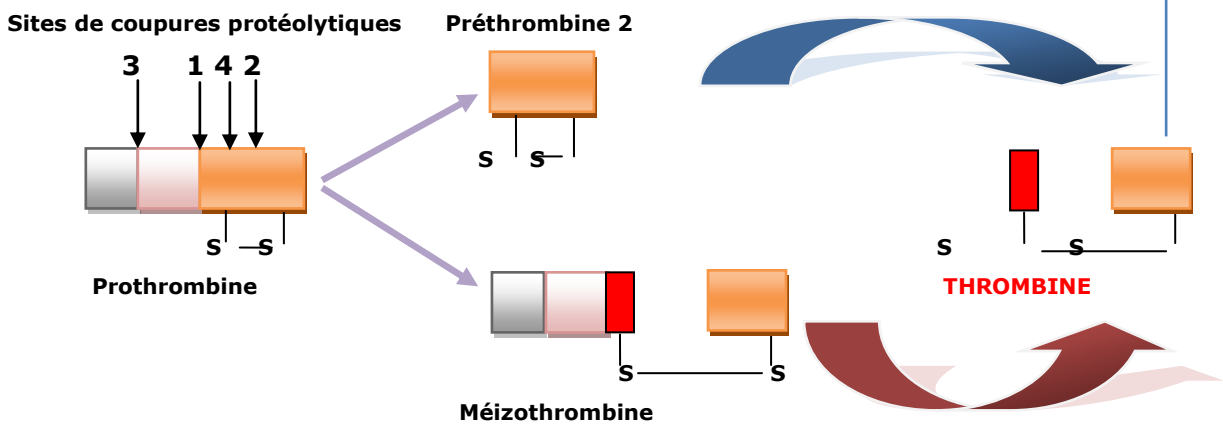
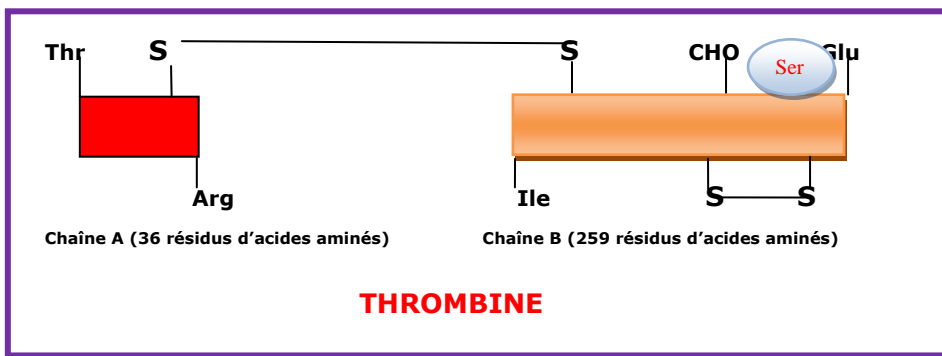


Figure 9: Structure tridimensionnelle de la thrombine (A) et représentation schématique de la molécule de thrombine (B) (Laraba-Djebari, 1996)

La thrombine joue un certain nombre de rôles clés dans le processus de la coagulation sanguine:

- 1- *Elle convertit le fibrinogène plasmatique en fibrine*: Dans une première étape, la thrombine hydrolyse la liaison Arg16-Gly17 de la chaîne A α du fibrinogène, il y a formation de monomères de fibrine (fibrine Des-A) et libération du fibrinopeptide A. Dans une deuxième étape, la liaison Arg14-Gly15 de la chaîne B β du fibrinogène est hydrolysée et il y a libération du fibrinopeptide B et de monomères de fibrine (fibrine Des-AB). Ces monomères se lient entre eux par des liaisons hydrogène pour former des polymères fragiles (Laraba-Djebari, 1996).
- 2- *Elle active le F XIII en F XIII* : Après activation du facteur XIII par la thrombine, ce facteur stabilise le caillot de fibrine par formation de liaisons covalentes (Sultan. in Dreyfus., 1992).
- 3- *La thrombine est un agoniste idéal de la fonction des plaquettes* : La thrombine provoque l'agrégation des plaquettes sanguines et induit la sécrétion de leur contenu intragranulaire notamment la sérotonine. La réaction de sécrétion de la sérotonine est très rapide, elle est complète en 1 min, à faible concentration de thrombine 1 mM (0,1 U/mL)(Laraba-Djebari., 1996). Cette agrégation se fait par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques de la thrombine localisés à la surface de la membrane plaquettaire (Simons *et al.*, 1992). L'interaction de la thrombine avec son récepteur possède à la fois les propriétés d'une réaction enzymatique et d'un équilibre agoniste-récepteur (Tapparelli *et al.*, 1993). La thrombine clive son récepteur après le résidu Arg 41 de son extrémité N-terminale, libérant ainsi une nouvelle séquence N-terminale (Vu *et al.*, 1991a). Cette nouvelle séquence fonctionne comme un agoniste pour le récepteur, en se fixant sur un site indéfini dans le corps de ce récepteur qui a subi un réarrangement stérique (Hawiger, 1992)(Figure 10 A)
- 4- *Elle active les FXI, FVIII et FV* : La thrombine active le facteur XI et entraîne une augmentation de la production de FIXa, par le biais de son action directe sur la facteur VIII en le séparant de sa molécule porteuse FvW pour l'activer. Le facteur VIIIa lui-même en présence du Ca⁺² et de phospholipides activera le facteur X en FXa. La thrombine active également le facteur V en FVa (Hoffbrand. 2003).
- 5- *Elle active la protéine C*: La thrombine se fixe à la thrombomoduline à la surface de la cellule endothéliale pour former un complexe qui active la protéine C qui est impliquée dans la régulation de la coagulation (Moulin, 1998).

I.3.1.1.2. Fibrinogène et fibrine

Le fibrinogène est une glycoprotéine synthétisée par la cellule hépatique, de 340 kDa de masse moléculaire et constituée de trois paires de chaînes polypeptidiques, réunies entre elles par des ponts disulfures (Pommereuil, 1999), obéissant à la formule générale 2(A α , B β , γ) (Laraba-Djebari, 1996)(Figure 10B). Le fibrinogène circule dans le plasma à la concentration de 2 à 4 g/L (Sultan. in Dreyfus, 1992), cette concentration augmente dans le sang considérablement après infection, traumatisme et états post-opératoires (Blombak, 1978). Le fibrinogène joue un rôle physiologique important dans le mécanisme de l'hémostase, en formant une structure

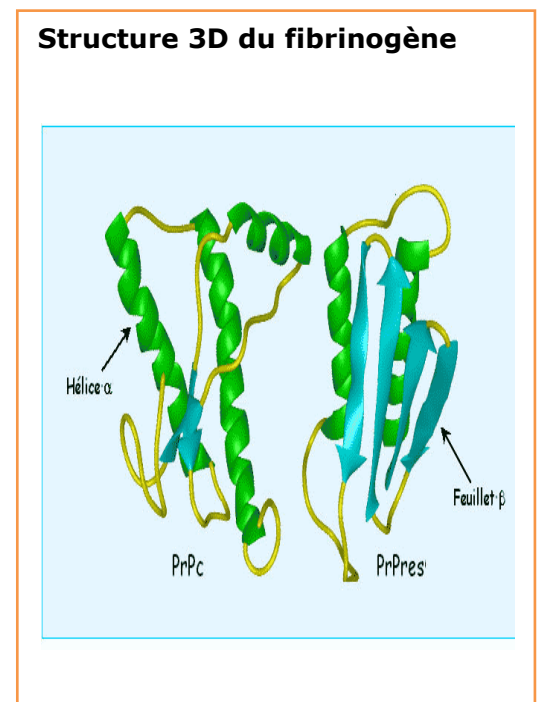
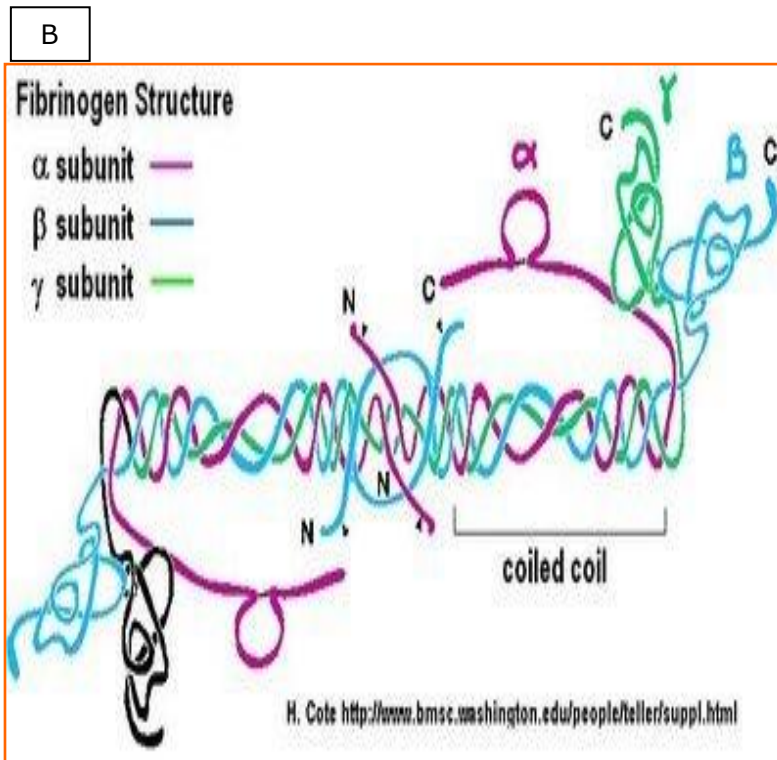
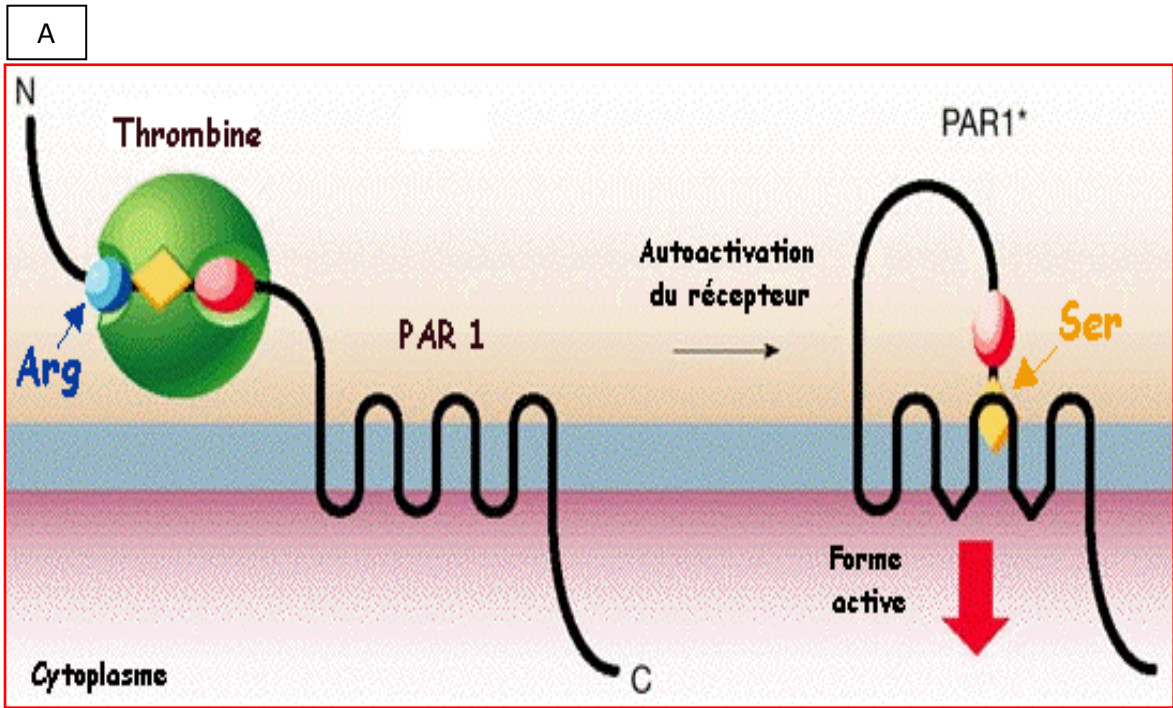


Figure 10 : Action de la thrombine sur son récepteur (A) (Couhlin, 2000) et structure tridimensionnelle du fibrinogène (B) (Stein, 2004).

dense de fibrine autour des plaquettes sanguines agrégées, il joue également un rôle très important dans l'agrégation plaquettaire permettant ainsi l'interaction des plaquettes entre elles.

I.3.1.1.3. Plasminogène et plasmine

La plasmine résulte de l'activation de son précurseur ; le plasminogène. Ce dernier est une glycoprotéine monomérique synthétisée par l'hépatocyte (Dreyfus, 1992). La molécule apparaît constituée de différents domaines dont cinq structures en boucles sur lesquelles sont localisés les sites de fixation pour la lysine encore appelés L.B.S. (Lysine Binding Sites), ces sites sont responsables de la liaison du plasminogène à la fibrine et jouent un rôle dans la modulation de la thrombolyse (Pommereuil, 1999).

Il existe deux activateurs du plasminogène: l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'urokinase (Koolman et Roehm, 2005) (Figure 11). Le plasminogène et son activateur qui possèdent une haute affinité pour la fibrine et se fixent à la surface du caillot pour former un complexe ternaire (Collen, 1980). La transformation du plasminogène en plasmine a lieu par scission de la liaison Arg 560-Val 561 du plasminogène, inaugurant la structure en deux chaînes de la plasmine (Hollaer, 1982):

- une chaîne légère porteuse du site actif sérine protéinase.
- une chaîne lourde ayant conservé les sites LBS du plasminogène (Pommereuil, 1999).

La plasmine est une enzyme protéolytique dont le substrat naturel est la fibrine, qu'elle dégrade en fragments solubles ou produits de dégradation de la fibrine (P.D.F de tailles variables) suite à des protéolyses successives (Francis et Marder, 1982).

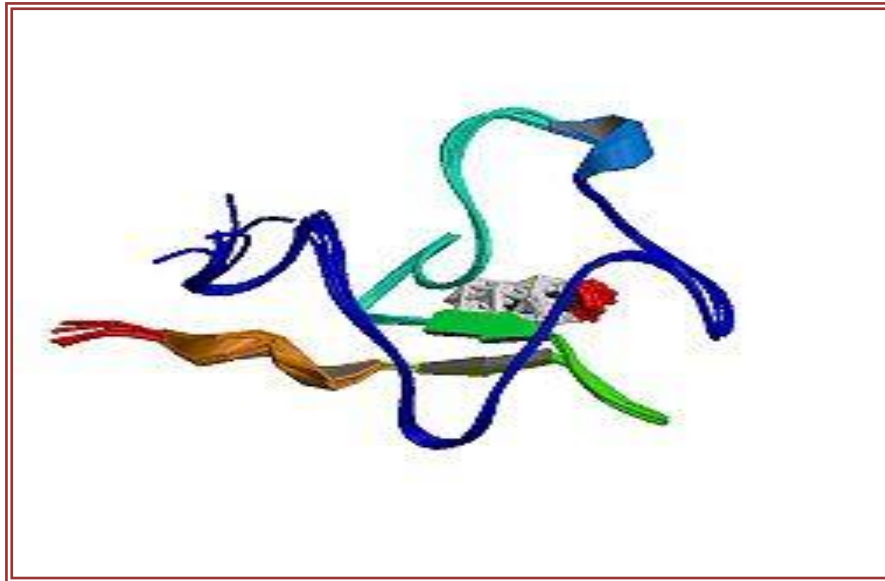
I.3.1.2. Les plaquettes sanguines

Le rôle des plaquettes dans l'hémostase est capital, il consiste à former un bouchon qui obture temporairement l'ouverture dans le vaisseau sanguin. En outre, les plaquettes interviennent dans la coordination des phases de la formation du caillot (Hoffbrand, 2003).

Les plaquettes, les plus petites cellules circulantes du sang, sont des fragments du cytoplasme de la cellule mère le mégacaryocyte, elles sont annucléées et se présentent sous forme discoïdale lisse, pourvues de membrane et contenant des granules, des systèmes canaliculaires et des protéines contractiles:

1- La membrane plaquettaire est constituée d'une bicouche de phospholipides dans laquelle sont insérées des glycoprotéines transmembranaires participant aux fonctions de la plaquette (Pommereuil, 1999). Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés à une protéine G, à la PLC, à la PLA₂ et à l'adénylate cyclase (Hawiger, 1992).

A



B

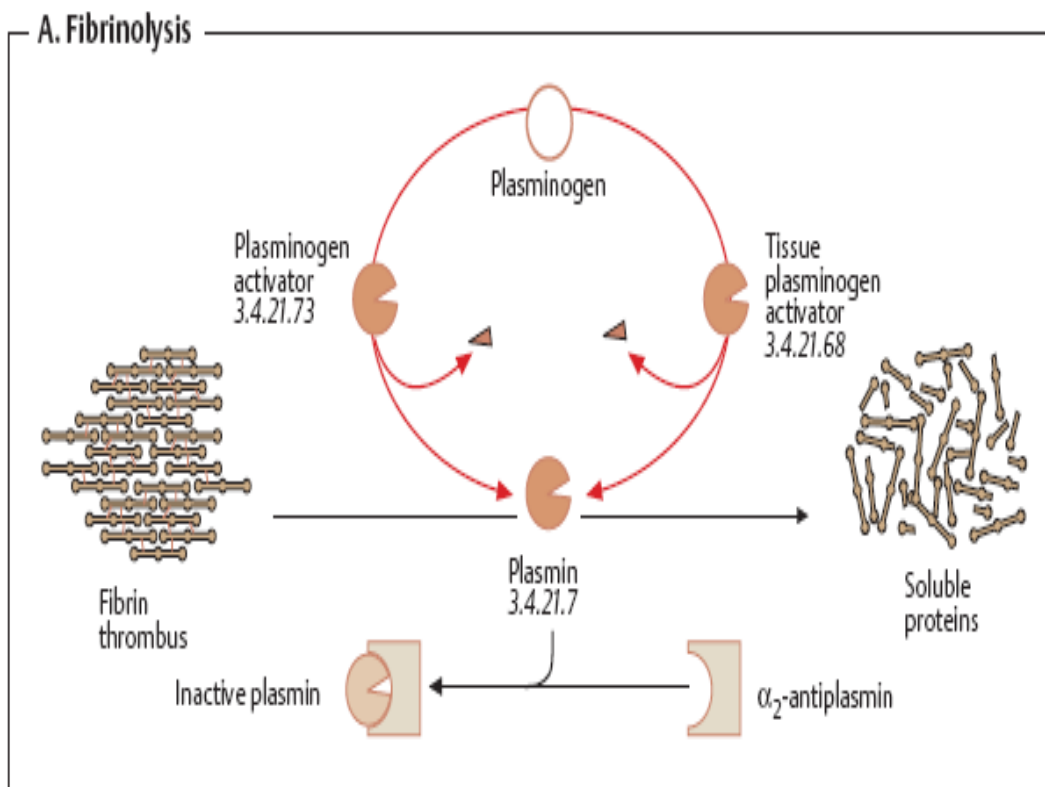


Figure 11: Structure 3D du plasminogène (A) et schéma de la fibrinolyse et voies d'activation du plasminogène (B) (Koolman et Roehm, 2005)

- La GPIb est le récepteur du FvW, elle est impliquée dans l'adhésion plaquettaire au sous-endothélium.
 - La GPIIb/IIIa est le récepteur du fibrinogène et du FvW, impliquée dans l'agrégation des plaquettes entre-elles.
 - Les phospholipides de la membrane plaquettaire sont répartis de façon asymétrique, les plus anioniques étant situés dans le feuillet interne (phosphatidyl-éthanolamine et phosphatidyl-sérine), tournés vers l'intérieur de la cellule et se retrouvent au niveau du feuillet externe après activation des plaquettes, formant le facteur III plaquettaire qui servira de récepteur au FVa.
- 2- Les granules plaquettaires sont de deux types:
- Les granules denses qui contiennent du calcium, de l'ADP, de la sérotonine et de l'adrénaline.
 - Les granules alpha contenant plusieurs protéines dont le FV, le FvW, le fibrinogène, des facteurs de croissance pour les cellules endothéliales et les fibres musculaires lisses.
- 3- Des structures tubulaires denses contenant du calcium et assurant la synthèse des prostaglandines (thromboxane A₂) et un système de canaux ouverts sur l'extérieur où sécrètent les granules.
- 4- Les protéines contractiles sont représentées par des filaments d'actines et sont responsables de la contractilité des plaquettes (Abgrall, 1999).

I.3.1.3. Processus de l'hémostase

I.3.1.3.1. L'hémostase primaire

L'hémostase primaire débute lors de l'apparition d'une brèche vasculaire (Lévy, 2001). La première étape consiste en une vasoconstriction réflexe du vaisseau endommagé (Braud *et al.*, 1991). Ce phénomène contribue à localiser les plaquettes et les protéines coagulantes au site de la lésion vasculaire (Abgrall, 1999), le sous endothélium est mis à nu et est devenu une surface thrombogène (Laraba-Djebari, 1996), c'est-à-dire, qu'il va permettre l'adhésion préférentielle des plaquettes sanguines et leur activation (Dreyfus, 1992).

L'adhésion plaquettaire: est déclenchée dans certaines conditions de force de cisaillement élevée, les plaquettes interagissent avec les protéines adhésives de la matrice sous endothéliale, essentiellement le FvW et le collagène (Hawiger, 1990; Nurden, 1987).

L'activation plaquettaire: ces interactions déclenchent des signaux intracellulaires qui aboutissent à une série de réponses (Lévy, 2001), les plaquettes sont activées aussi par l'action d'agonistes solubles qui se lient à la membrane plaquettaire par des récepteurs (Abgrall, 1999) présents sur la membrane native ou exposés sur la membrane des cellules activées (Dupuy et Molho-Sabatier, in Dreyfus, 1992). La liaison agoniste récepteur active à travers le système de protéines G la PLA₂, qui libère l'acide arachidonique de la membrane plaquettaire. Ce dernier est alors transformé en thromboxane A₂ (TXA₂) qui amplifie l'activation en diffusant hors de la plaquette et en se fixant sur leur récepteur membranaire (Abgrall, 1999)(Figure 12).

D'autres agonistes comme la thrombine et le TXA₂ activent la PLC qui hydrolyse le phosphatidyl inositol diphosphate (PIP₂) membranaire en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP₃)(Lévy *et al.*, 1985). L'IP₃ mobilise le Ca⁺² du système tubulaire dense vers le cytoplasme. L'augmentation du Ca⁺² intracytoplasmique en présence de la calmoduline active la phosphorylation de la myosine, ce qui permet son interaction avec l'actine. Le complexe actine-myosine joue un rôle dans les phénomènes de contraction et de la centralisation des granules (Dreyfus, 1992).

Le DAG est impliqué dans deux mécanismes:

- Il active la protéine kinase C (PKC) qui pourrait activer le phénomène de fusion des granules.
- Grâce à une DAG lipase, le DAG peut mobiliser l'acide arachidonique qui va secondairement être métabolisé en TXA₂ (Lévy *et al.*, 1985).

Cette activation entraîne une réorganisation des protéines du cytosquelette (Abgrall,1999), de la forme discoïde, la plaquette devient sphérique avec formation des pseudopodes (étalement)(Dreyfus., 1992) et une modification de la structure du complexe des GPIIb/IIIa qui devient capable de lier les protéines adhésives (le FvW et le fibrinogène) ainsi le nombre de récepteurs du fibrinogène augmente (Figure12).

La sécrétion des granules: Ces modifications morphologiques entraînent également une réorganisation des granules denses qui vont fuser avec la membrane plasmique et sécrètent le contenu intragranulaire (Dreyfus., 1992).

L'agrégation plaquettaire: L'ADP entraîne l'activation et le recrutement *in situ* des plaquettes circulantes, qui vont s'accoler aux premières (Laraba-Djebari, 1996) par l'intermédiaire du récepteur GPIIb/IIIa, c'est l'agrégation plaquettaire (Abgrall, 1999). Le mécanisme de l'agrégation plaquettaire est médié par la liaison du fibrinogène à son récepteur GPIIb/IIIa. Le fibrinogène sert de véritable pont entre les complexes récepteur des différentes plaquettes (Nachman et Leung, 1982).

I.3.1.3.2. La coagulation

La coagulation est indissociable de l'hémostase primaire et de la fibrinolyse. En effet, dès que les plaquettes adhèrent au sous-endothélium, des traces des protéines de la cascade de coagulation peuvent être détectées (Dreyfus, 1992). Ces protéines sont des pro-enzymes et des pro-facteurs qui sont activés de manière séquentielle (Marieb, 2004). Le plus souvent trois étapes successives décrivent le processus de la coagulation:

1- L'activation du facteur X aboutissant à la formation du complexe prothrombinase:

Il existe deux voies de cette activation:

- La voie extrinsèque dite aussi voie locale ou voie tissulaire, assure l'urgence par sa rapidité d'action et sa simplicité improprie mais elle est limitée par l'épuisement rapide du facteur tissulaire et de son absence de renouvellement.

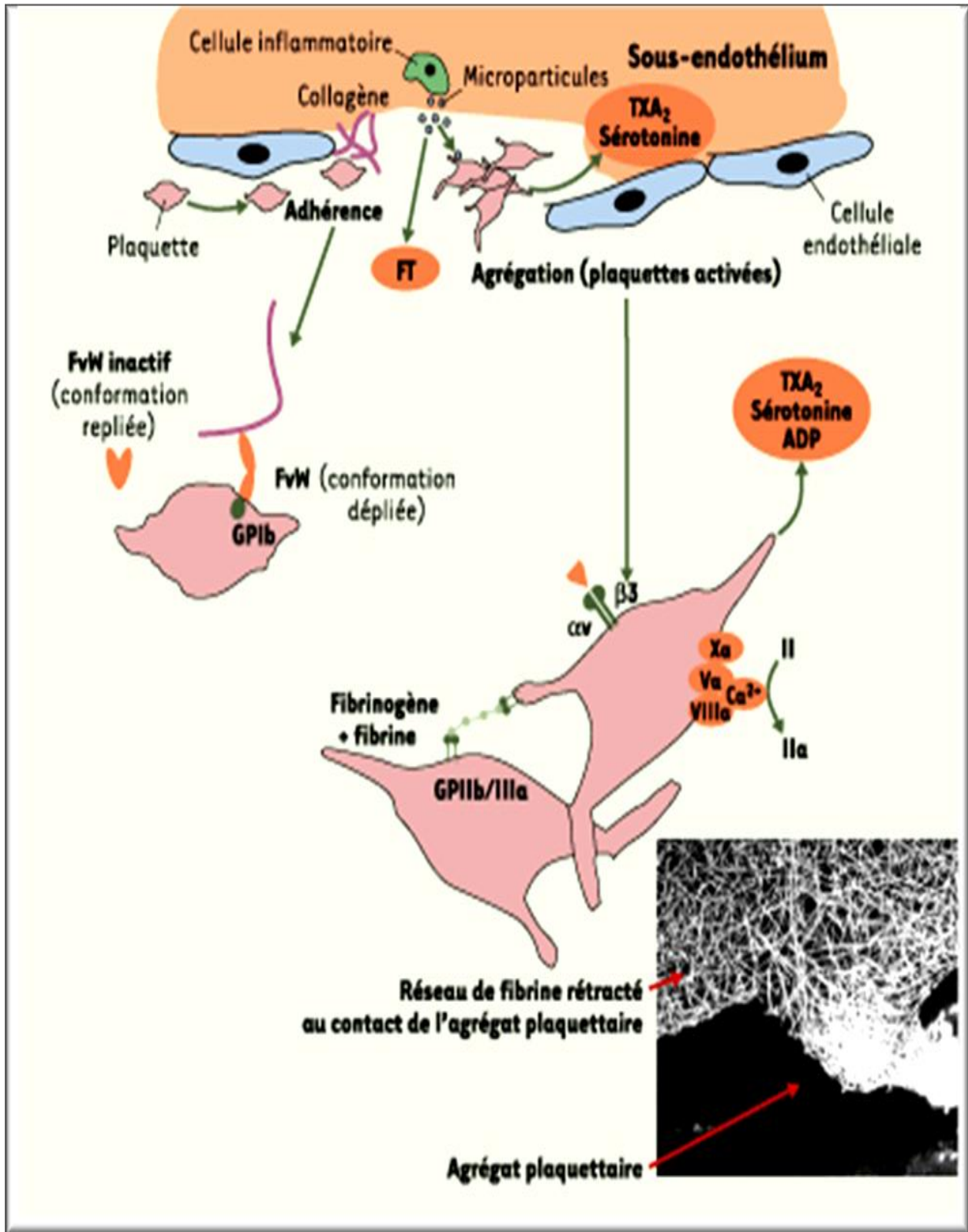


Figure 12: Schéma mécanique des différentes étapes de l'hémostase primaire
 (Collet *et al.*, 2004)

L'initiation est déclenchée par l'exposition du facteur tissulaire immédiatement disponible en cas de lésion vasculaire (Pommereuil, 1999), le facteur tissulaire comporte des phospholipides et la composante protéique qui va jouer vis-à-vis du FVII le rôle de cofacteur (Dreyfus, 1992). Le développement de l'activité protéase du FVII en FVIIa assure l'activation du FX en FXa (Hoffbrand, 2003).

- La voie intrinsèque par laquelle les facteurs du système intrinsèque sont apportés par le sang de façon continue et inépuisable, assure le relais de la phase tissulaire d'urgence. Cette voie débute par une activation des facteurs du système contact lorsque le sang entre en contact avec une surface chargée négativement, le FXII s'étale sur cette surface et révèle son site enzymatique, il induit la protéolyse de la prékallikréine en kallikréine, cette dernière en présence d'un cofacteur le kininogène, coupe le FXII et libère un fragment qui active très rapidement le FXI en FXIa, ce dernier active à son tour le FIX et FIXa qui se fixe sur les phospholipides anioniques en présence de Ca^{+2} et FVIIIa forme le complexe activateur du FX (lui-même fixé sur les plaquettes)(Dreyfus, 1992).
- 2- L'activation de la prothrombine en thrombine sous l'effet du facteur Xa.
- 3- La fibrino-formation qui se déroule en trois étapes:
 - Action protéolytique de la thrombine sur le fibrinogène. La thrombine hydrolyse sélectivement certains peptides de la molécule de fibrinogène et les transforme en monomères de fibrine.
 - Polymérisation des monomères de fibrines par des liaisons hydrogènes aboutissant à la formation de fibrine soluble.
 - La stabilisation de la fibrine par des liaisons covalentes établies en présence de Ca^{2+} et de FXIII activé par la thrombine.

I.3.1.3.3. La fibrinolyse

Le caillot est une solution temporaire aux lésions des vaisseaux sanguins. Un processus appelé fibrinolyse élimine ce caillot formé dès que la cicatrisation est achevée. La fibrinolyse résulte de l'action d'une sérine protéase appelée la plasmine, formée par l'activation du plasminogène, tout les deux décrits précédemment (Hoffbrand, 2003)(Figure 11).

I.3.1.4. Régulation de l'hémostase

L'hémostase est modulée par différents mécanismes de contrôle nécessaires au maintien de l'équilibre de la balance hémostatique. Ces mécanismes de contrôle implique la participation active de l'endothélium, il est essentiellement représentés par des inhibiteurs physiologiques des différentes enzymes et des cofacteurs activés du système coagulant .

En effet, l'endothélium vasculaire est une surface non-thrombogène, les mécanismes de cette non-thrombogénicité sont multiples :

- a- Sécrétion par la cellule endothéliale
 - d'une substance anti-agrégante puissante (la prostacycline).
 - d'inhibiteurs de la coagulation (antithrombine III).

- de substances fibrinolytiques (t-PA)
- b- La présence à la surface de la cellule endothéliale d'héparines sulfatées qui ont une action anticoagulante (Pommereuil, 1999).

Ces inhibiteurs physiologiques sont classés selon leur mode d'action en :

- Inhibiteurs des sérines protéinases (SERPINS) qui neutralisent la plupart des enzymes de la coagulation, ils sont essentiellement représentés par l'antithrombine III.
- Inhibiteurs de la voie exogène (TFPI) qui régulent la voie exogène par l'inhibition du FVIIa et du système de la protéine C assurant l'inactivation des cofacteurs activés (Va, VIIIa)(Longstaff *et al.*, 1991; Coffman *et al.* Lansbury, 1992).

I.3.2. Action des biomolécules de venins sur l'hémostase

Les composants de venins de *Viperidae* et de *Crotalidae* agissent à différentes étapes hémostatiques (plaquettes, facteurs de coagulation et facteurs fibrinolytiques). Certains composants accélèrent le processus de coagulation, d'autres par contre le retardent (Kini *et al.*, 1990; Kornalik, 1985; Marsh, 1994). Les venins sont divisés en deux catégories: coagulants et/ou anticoagulants. Un même venin peut contenir les deux types de molécules à effets antagonistes (Tableau III).

Tableau III: Principaux composants hémostatiques trouvés dans les venins de serpents (Laraba-Djebari *et al.*, 1992 et 1995; Hutton *et al.* Warrell, 1993, White 2005)

Type d'activité	Cible hémostatique
Procoagulants	<ul style="list-style-type: none"> - Coagulation du fibrinogène - Activation de la prothrombine - Activation du facteur X - Activation du facteur V
Anticoagulants	<ul style="list-style-type: none"> - Activation de la protéine C - Activation de l'antithrombine III - Dénaturation du facteur V
Fibrinolyse	<ul style="list-style-type: none"> - Digestion du fibrinolyse - Activation du plasminogène
Fonction des plaquettes	<ul style="list-style-type: none"> - Agrégation des plaquettes - Inhibition de l'agrégation des plaquettes
Paroi vasculaire	<ul style="list-style-type: none"> - Hémorragines

I.3.2.1. Les constituants activateurs de la coagulation sanguine

Les composants des venins de serpents ayant des activités coagulantes et anticoagulantes agissent généralement au niveau des dernières étapes de la coagulation. Les principales cibles de ces composants sont généralement le fibrinogène, la prothrombine, le facteur X et les plaquettes sanguines (Laraba-Djebari *et al.*, 1992; Hutton et Warrell, 1993; Laraba, 1996).

I.3.2.1.1. Activateurs du facteur FX

Plusieurs molécules ont été purifiées à partir des venins de *Viperidae* et de *Crotalidae* et caractérisées comme étant des activateurs du facteur FX. Le RVV-X isolé à partir du venin de *Vipera russelli* est une sérine protéinase qui hydrolyse la liaison Arg52-Ile53 du FX. Cet activateur de masse moléculaire 60 kDa mais existe également sous forme de dimère de 124 kDa.

A partir du venin de *Cerastes cerastes*, un activateur du FX a été purifié et caractérisé comme étant une sérine protéinase α et β fibrinogénase (Laraba-Djebari *et al.*, 1995). Un activateur du FX a été également isolé à partir du venin de *Cerastes vipera* (Farid *et al.*, 1993). Cette molécule permet de raccourcir le temps de coagulation des plasmas déficients en facteurs V, VII, VIII, IX, XI ou XIII, mais n'a aucun effet sur le temps de coagulation des plasmas déficients en facteurs X ou II (prothrombine)(Farid *et al.*, 1993).

I.3.2.1.2. Activateurs de la prothrombine

Deux types d'activateurs de la prothrombine ont été identifiés dans les venins de serpents:

- Des activateurs dont l'action dépend fortement du FV, des phospholipides chargés négativement et de l'ion calcium.
- Des activateurs fortement stimulés par la présence des charges négatives des phospholipides et d'ions calcium, mais pas par le FVa (Rosing et Tans, 1992).

Les activateurs de la prothrombine n'exigeant aucun cofacteur pour leur activité, sont généralement des métalloprotéinases formées par une seule chaîne polypeptidique. Deux activateurs ont été isolés à partir des venins d'*Echis carinatus* (PM 56 kDa) et de *Bothrops atrox* (PM 70 kDa)(Hoffman et Bon, 1987).

L'ecarine, l'oscutarine et la notecarine isolés respectivement à partir des venins d'*Echis carinatus*, *Oxyuranus scutellatus* (famille d'*Elapidae*) et *Notechis scutatus* sont les activateurs de la prothrombine les plus connus (Walker *et al.*, 1980; Rosing et Trans, 1992).

I.3.2.1.3. Action sur le fibrinogène et le plasminogène

Trois groupes d'enzymes agissant sur le fibrinogène ont été identifiés (Kornalick, 1991).

- 1- Les SVPSs de type thrombine qui catalysent la libération des fibrinopeptides A ou B, ou les deux.

- 2- Les fibrinogénases qui agissent sur des régions C-terminales des chaînes α , β et γ du fibrinogène et aboutissant à un sang incoagulable.
- 3- Les activateurs du plasminogène ayant une activité de type plasmine. Ces molécules agissent sur les chaînes α , β ou γ de la fibrine.

Une enzyme de type thrombine agissant sur le fibrinogène et sur le FXIII, la gabonase a été isolée à partir du venin de *Bitis gabonica* (Pikle *et al.*, 1986). L'activité coagulante de cette enzyme n'est pas inhibée par les inhibiteurs de la thrombine (hirudine, héparine et anti-thrombine III) (Laraba-Djebari, 1996).

Afaâcytine et RP34 sont deux sérine protéinases de type thrombine isolées à partir du venin de *Cerastes cerastes*. La RP34 est une α fibrinogénase alors qu'afaâcytine est une α et β fibrinogénase qui active le FX. La RP34 active aussi le récepteur de la thrombine par une protéolyse dirigée au même site que la thrombine. Ces enzymes de type thrombine sont dépourvues des propriétés d'activation du FXIII. Elles ne sont pas inhibées par les inhibiteurs de la thrombine (ATIII, héparine et hirudine)(Laraba-Djebari *et al.*, 1992 et 1995; Laraba-Djebari, 1996).

I.3.2.1.4. Activateurs de l'agrégation plaquettaire

Les activateurs de l'agrégation plaquettaire présentent un grand intérêt clinique (Hutton *et* Warrell, 1993). Le tableau IV résume certaines protéases isolées à partir des venins de serpents ayant une action activatrices des plaquettes sanguines.

Tableau IV: Exemples de serine protéinases de serpents pro-agrégantes des plaquettes

Molécule et espèce	Caractéristiques	Référence bibliographique
Thromocytine (<i>Bothrops atrox</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - 5,6 % de carbohydate - Monomère de 36 kDa. - Active les facteurs XIII, V et VIII 	Niewiarowski <i>et al.</i> , 1979
Crotalocytine (<i>Crotalus horridus horridus</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - PM de 55 kDa - Monomère non glycosylé. - Induit la sécrétion de l'ADP et de la sérotonine des plaquettes sanguines 	Schmaier <i>et al.</i> , 1980
Convulxine (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - 5 % de carbohydate. - Activité agrégante potentialisée par l'addition du fibrinogène. 	Brinkous <i>et al.</i> , 1988

I.3.2.2. Les constituants inhibiteurs de la coagulation sanguine (anticoagulants)

I.3.2.2.1. Facteurs hémorragiques (métalloprotéinases SVMPs) et fibrinogénases

Certaines SVMPs présentent une capacité inhibitrice de l'agrégation plaquettaire (Lomonte *et al.*, 1994; Kamiguti *et al.*, 1998). Elles sont également fibrino(gène)lytiques. L'hydrolyse du fibrinogène par les protéinases des venin (les SVMPs et les SVSPs) empêche sa fixation sur son récepteur GPIIb/IIIa situé à la membrane plaquettaire d'où l'inhibition de l'agrégation.

I.3.2.2.2. Les sPLA₂ (Facteurs lipolytiques)

L'action des sPLA₂ des venins de *Viperidae* et de *Crotalidae* a été déjà décrite précédemment (Figure 6; Tableau II). Plusieurs sPLA₂ ont été purifiées et caractérisées par leur activité anti-agrégantes des plaquettes sanguines (Tableau V). Récemment deux PLA₂ anti-agrégantes des plaquettes ont été isolées à partir du venin de *Cerastes cersates* (Zouari-Kessentini *et al.*, 2009 et 2010).

I.3.2.2.2. Désintégrines

Cette classe de protéines présentent deux domaines structuraux; un domaine de métalloprotéinases et un autre de disintegrin-like. Cependant certaines désintégrines ont perdu le site catalytique et ne sont plus protéolytiques. Celles ayant gardé l'activité peuvent se lier aux intégrines par le domaine disintegrin-like et à l'héparane sulfatée (protéoglycane) par le domaine riche en cystéine (White, 2003; Wolfsberg et White, 2004). Ce sont donc des antagonistes des récepteurs du fibrinogène.

La séquence de ces peptides renferme un segment Arg-Gly-Asp (RGD) qui leur permet de se fixer au complexe GPIIb/IIIa inhibant ainsi les fonctions adhésives d'une variété d'intégrines (notamment le fibrinogène) sur les surfaces cellulaires, ceci se traduit par l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Scarborough *et al.*, 1993).

L'intérêt des désintégrines est du au fait qu'elles bloquent avec sélectivité les récepteurs impliqués dans plusieurs pathologies ($\alpha_{IIb}\beta_3$ dans les thromboses, $\alpha_v\beta_3$ dans les tumeurs métastatiques, ostéoporose et arthrite rhumatoïde, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$ dans l'inflammation et les maladies auto-immunes), (Niewiarowski *et al.*, 2002).

Trois désintégrines ont été purifiées à partir des venins de serpents, la CC8 isolée du venin de *Cerastes cersates*, inhibe les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$ (Calvet *et al.*, 2002). la triflavine et la gabonine, l'une isolée du venin de *Trimeresurus flaviridis* et l'autre à partir du venin de *Bitis gabonica*) ayant un poids moléculaire de 21 kDa (Huang *et al.*, 1991 et 2002).

Tableau V: Caractéristiques de certaines PLA₂ des venins de serpents ayant une action sur les plaquettes sanguines.

Espèce de serpents	Propriétés physico-chimiques	Mode d'action	Références Bibliographiques
<i>Agkistrodon acutus</i>	PM = 16,4kDa. pI = 4,9.	Elle libère l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires des plaquettes sanguines, cet acide arachidonique forme par la suite le thromboxane A ₂ .	Herzig <i>et al.</i> , 1970
<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	Monomère de PM de 14,0 kDa.	Elle lyse la membrane des plaquettes sanguines sans libérer l'acide arachidonique.	Schmaier <i>et al.</i> , 1980a
<i>A. mellifera.</i>	glycoprotéine (134 acides aminés)	Son action sur les phospholipides membranaires des plaquettes sanguines entraîne la libération de l'acide arachidonique qui est directement biotransformé en thromboxane A ₂ , suite à l'action de la cyclooxygénase.	Niewiarawski <i>et al.</i> , 1977b
<i>Crotalus durissus terrificus.</i>	Dimère PLA ₂ basique faiblement toxique et dépourvue d'activité catalytique,	La membrane des cellules plaquettaires est une des cibles de cette PLA ₂ , dans ce cas cette enzyme agit sur les phospholipides en libérant d'autres acides gras que l'acide arachidonique.	Li <i>et al.</i> , 1988
<i>Crotalus terrificus terrificus</i>	_____	Cette PLA ₂ exerce son effet au niveau de la membrane des plaquettes en libérant l'acide arachidonique, ce dernier est catabolisé en prostaglandine et thromboxane A ₂ .	Schmaier <i>et al.</i> , 1980 b
<i>Naja naja atra</i>	Monomère de 119 acides aminés.	Elle dégrade la membrane des plaquettes et libère l'acide arachidonique, ce dernier donne les prostaglandines et la thromboxane A ₂ .	Niewiarawski <i>et al.</i> , 1977a; Kirby <i>et al.</i> , 1979
<i>Naja mossambica mossambica.</i>	Monomère de 118 acides aminés.	La thromboxane A ₂ provient de l'acide arachidonique après action de cette PLA ₂ .	Ouyang et Teng, 1979
<i>Vipera russel</i>	Glycoprotéine constituée d'une seule chaîne polypeptidique.	Elle libère l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires des plaquettes sanguines et donne la thromboxane A ₂ .	Niewiarawski <i>et al.</i> , 1979a; Kubisz <i>et al.</i> , 1984
<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	Un polypeptide avec une chaîne d'acides aminés.	Elle donne l'acide arachidonique qui se transforme en thromboxane A ₂ après action de la cyclooxygénase.	Niewiarawski <i>et al.</i> , 1979b

I.3.3. Utilisation des biomolécules des venins (SVSPs) comme outil en hémostase

La réduction de la viscosité du sang est souvent requise dans le traitement de certaines maladies thrombotiques et des ischémies cardiaques (Laraba-Djebari, 1996). La défibrinogénéation plasmatique par certaines enzymes de venins de serpents présente un intérêt. Ancrod ou Arvin, molécule d'intérêt, isolée à partir du venin d'*Agkistrodon rhodostoma*, est l'une des molécules les utilisées chez les patients sous anti-coagulants. Elle est aussi utilisée pour baisser le taux de fibrinogène dans les traitements des désordres vasculaires périphériques (Cook et Ubben, 1990).

La Batroxobine, une autre molécule isolée à partir du venin de *Bothrops atrox* et de *Bothrops moojeni*, convertit le fibrinogène en fibrine en libérant uniquement le fibrinopeptide A (Stocker, 1976; 1978; Itoh *et al.*, 1987). Elle est utilisée pour son effet défibrinogénant dans le traitement des maladies thrombotiques (Stocker, 1978).

Les propriétés coagulantes d'Afaâctine (*Cerastes cerastes*) insensible aux inhibiteurs plasmatiques spécifiques de la thrombine seraient utiles en tant qu'agent hémostatique dans certains cas d'hémorragie; telles que la thrombopénie observée dans des situations post-opératoires (Laraba-Djebari, 1996).

La fibrinogénase RP34 pourrait servir comme agent défibrinogénant dans le cas de certaines pathologies (Laraba-Djebari, 1996).

Toutes, ces biomolécules de part leurs propriétés défibrinogénantes, pourraient être utilisés comme outils dans des applications cliniques ou dans les recherches fondamentales. Des études plus approfondies en pharmacologie, toxicologie sont à entreprendre pour déterminer leur mode d'action in vivo.

I.3.4. Rôle des biomolécules de venins dans le processus inflammatoire

En altérant les tissus après une envenimation, les biomolécules de venins des serpents constituent la première cause de la nécrose qui se développe à partir de la morsure. Ces molécules interviennent aussi dans plusieurs systèmes biologiques (systèmes de coagulation, du complément, de kinine et fibrinolytique) permettant ainsi la libération des médiateurs inflammatoires en activant ou en inhibant une ou plusieurs étape(s) de la réponse inflammatoire selon la nature de biomolécules. L'action des biomolécules des venins ophidiens sur les systèmes de coagulation, de kinine, du complément et le système fibrinolytique et leur impact sur la réponse inflammatoire est illustrée dans la figure 13.

Figure 13: Impact des protéases ophidiennes sur les médiateurs enzymatiques de la réponse inflammatoires.

I.3.4.1. Action des protéases de venins sur les médiateurs enzymatiques de l'inflammation

Le plasma contient quatre systèmes interconnectés producteurs de médiateurs inflammatoires: le système de la coagulation sanguine, de la fibrinolyse, du complément et de la kinine (Richard *et al.*, 2003). Les molécules des venins des *Viperidae* agissent sur les quatre systèmes (Figure 13).

a- Le système de la coagulation sanguine

Ce système précédemment décrit aboutit à la formation du clou plaquettaire après action de la thrombine sur le fibrinogène et libération des fibrinopeptides A et B. Ces derniers agissent comme médiateurs de l'inflammation et induisent une perméabilité vasculaire et une chimiotaxie accrue des neutrophiles (Richard *et al.*, 2003; Bernard *et al.*, 2003). Le thrombus est également considéré comme un puissant agent chimiotactique des neutrophiles et intervient dans la perméabilité vasculaire en agissant sur le système de kinine (Figure 13).

Plusieurs molécules de type thrombine isolées à partir des venins de serpents libèrent les fibrinopeptides A ou B ou les deux à la fois; elles agissent sur les médiateurs enzymatiques de l'inflammation (thrombine et les facteurs de coagulation). La lebetase est une zinc-métalloprotéinase qui dégrade le fibrinogène et libère ces fibrinopeptides pro-inflammatoires (Mion *et al.*, 2002).

b- Le système fibrinolytique

Les produits de dégradation de la fibrine (PDF) par la plasmine sont doués d'un pouvoir chimiotactique des neutrophiles. Certains venins de *Viperidae* et de *Crotalidae* peuvent provoquer une fibrinolyse primitive distincte de la fibrinolyse secondaire biologique. Les produits de dégradation de la fibrine sont de nature différente de ceux physiologiquement rencontrés dans la fibrinolyse (Chippaux, 2006).

Une sérine protéinase le TVS-PA purifiée du venin de *Trimeresurus stejnegeri*, joue un rôle activateur du plasminogène. Il partage environ 70 % d'homologie avec les autres sérine protéinases ophidiennes et possède d'importantes similarités structurales avec le t-PA, il transforme le plasminogène en plasmine de la même manière que celle-ci par clivage de la liaison Arg 561-Val 562 (Wisner *et al.*, 2000) (Figure 13).

c- Le système de kinine

Le système de kinine se présente sous forme de cascade enzymatique qui est initiée par l'activation du facteur de Hageman (FXII) suite à une lésion tissulaire, ce facteur activé, active à son tour la prékalikréine pour former la kalikréine qui hydrolyse le kininogène et donne de nombreux petits peptides vaso-actifs à l'origine de l'augmentation de la chaleur et la douleur. Ces peptides sont rapidement détruits sous l'effet des kininases. La bradykinine, principal produit de cette famille, est un nano-peptide qui augmente

puissamment la perméabilité vasculaire. Elle est responsable de la chaleur par interaction avec des récepteurs spécifiques sur les neurones sensoriels, et elle agit avec la plasmine en activant la voie alterne du complément ce qui amplifie la réaction inflammatoire (Bernard *et al.*, 2003). Le système de kinine peut être également activé directement par les venins de serpents ainsi que par leurs protéinases qui activent la libération de la bradykinine à partir du kininogène (Serano *et al.*, 1998).

La fibrolase est une zinc-métalloprotéinase purifiée à partir du venin d'*Agkistrodon contortrix contortrix*, qui possède une activité protéolytique sur les protéines impliquées dans la voie de biosynthèse de bradykinine. La fibrolase est aussi impliquée dans la production et la dégradation de la bradykinine (Burch *et al.*, 1990).

d- Le système du complément

Le système du complément comporte plus d'une trentaine de protéines dont la plupart sont des protéines de la phase aigue, synthétisées par le foie, à l'exception de la fraction C1, le facteur D et la properdine. Les fractions C1q, C1r et C1s sont probablement synthétisées par les macrophages car elles ont été trouvées dans leur surnageant en cultures (Rathenau, 1996). Le venin du Cobra stimule la voie alterne du complément (Alperet *et al.*, 1976). L'activation du système du complément se traduit par la formation de nombreux produits de dégradation du complément qui servent d'importants médiateurs de l'inflammation.

I.3.4.2. Action des sPLA₂ des venins et libération des médiateurs lipidiques de l'inflammation

Certaines enzymes de type SV-PLA₂ (Snake Venom PLA₂) hydrolysent les phospholipides chargés négativement, qui sont des cofacteurs du système prothrombinase. Ces enzymes présentent un rôle anti-coagulant, bien que d'autres SV-PLA₂ hydrolysent les phospholipides des membranes plaquettaires libérant les agonistes plaquettaire et/ou l'acide arachidonique. L'acide arachidonique est le précurseur de diverses substances fortement inflammatoires (Jonas *et al.*, 2005). Le métabolisme de l'acide arachidonique conduit à la synthèse des prostaglandines par la voie de cyclo-oxygénase et par la voie de la 5-lipo-oxygénase aux leucotriènes (Figure 14).

I.3.4.3. Action des biomolécules des venins sur la libération des cytokines pro et/ou anti-inflammatoires

L'induction du processus inflammatoire par les cytokines après action de molécules vipérines a fait l'objet de peu de travaux (Lomonte *et al.*, 1993; Vera *et al.*, 2000; Lomonte *et al.*, 2003; Chaves *et al.*, 2005; Chaou, 2005).

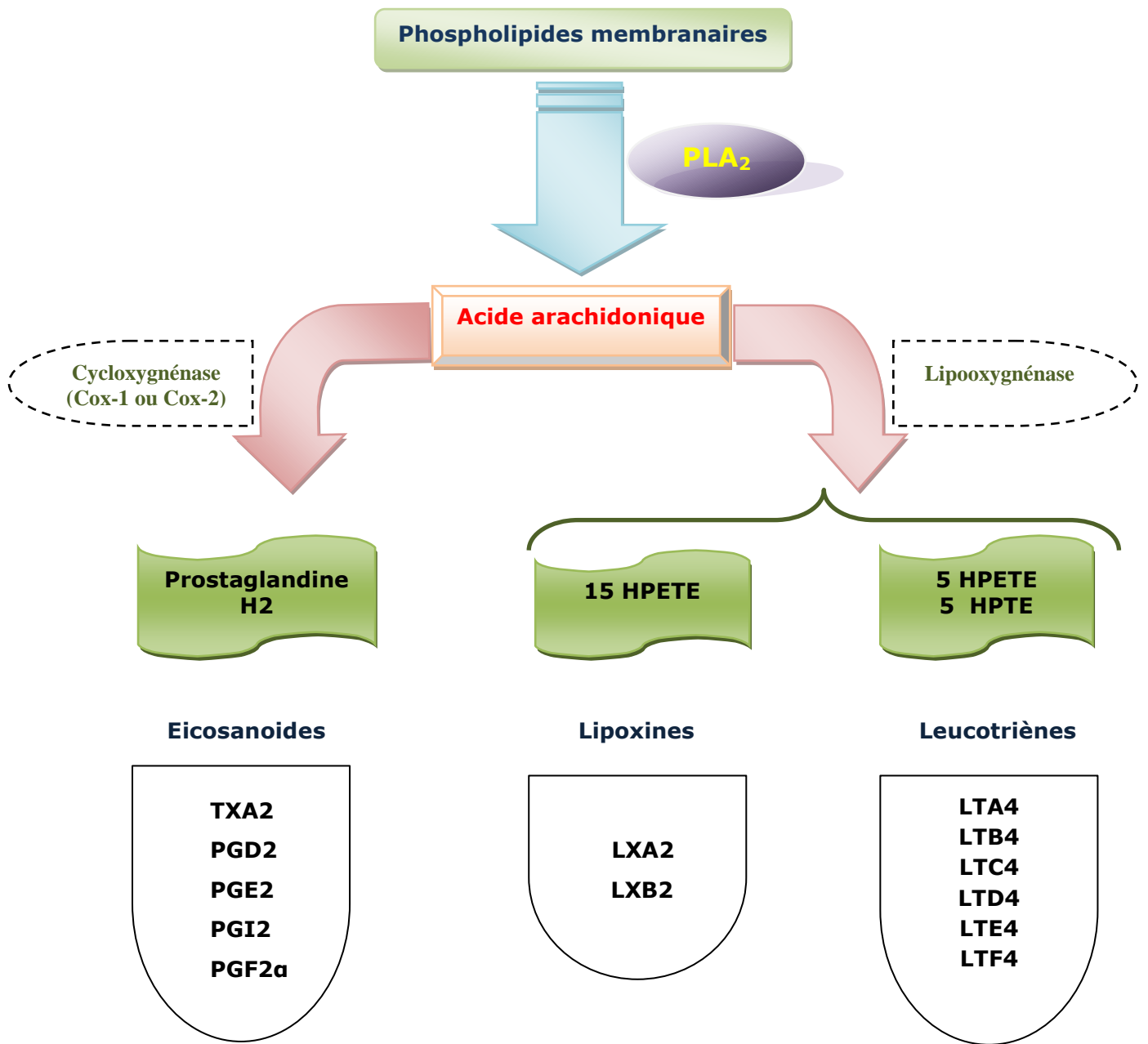


Figure 15: Médiateurs lipidiques issus du métabolisme de l'acide arachidonique par les voies de la cyclo-oxygénase et de la lipoxygénase (Genetet, 1993; Parham, 2003).
 cox: cyclo-oxygénase; HPETE: acide hydroperoxy-eicosatétraénoïque; HETE: acide hydroxy-eicosatétraénoïque; TX: thromboxanes; PG: prostaglandines; LX: lipoxines; LT: leucotriènes.

Une élévation du taux sérique de l'IL6 et l'IL1 β au niveau du muscle a été observée après action du venin de *Bothrops asper* (Chaves *et al.*, 2005). Cependant, une augmentation rapide de l'IL6 contre une apparition plus tardive de l'IL1 et du TNF α ont été observée après injection s.c. du venin de *Bothrops asper* (Lomonte *et al.*, 2003).

La promutxine (sPLA₂ R49) isolée à partir du venin de *Probothrops muscrosquamatus*, induit la libération des cytokines IL12, TNF α , IL6 et IL1 β à partir d'une culture de monocytes humains et les cytokines IL2, TNF α et IL6 à partir des lymphocytes T humains (Wei *et al.*, 2006). Cette enzyme est dépourvue d'activité catalytique à cause de la présence d'un résidu Arginine à la place de l'Aspartate en position 49.

I.4. Venin de *Cerastes cerastes* et ses molécules purifiées

Le venin de *Cerastes cerastes* induit de fortes activités hémorragique, oedématisante et nécrosante accompagnées par des effets myotoxiques touchant les muscles squelettique et cardiaque. Il est caractérisé également par d'importantes altérations du système hémostatique vue sa composition en molécules hémorragiques, hémolytiques, coagulantes, anticoagulantes, agrégantes, anti-agrégantes, fibrinogénolytiques et/ou fibrinolytiques. Plusieurs de ces composants ont été isolés et caractérisés mais d'autres reste à identifier.

Parmi les composants du venin de *Cerastes cerastes* déjà purifiés et caractérisés, une hyaluronidase présentant une masse moléculaire de 75 kDa (Labib *et al.*, 1979). Trois PLA₂ différentes, une de masse moléculaire de 14,5 kDa et de pI de 5,4 hydrolysant la lécithine en lyso-lécithine hémolytique (Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1990). Les deux autres PLA₂ présentent des poids moléculaires très voisins (isoformes) de 13,737 et de 13,705 kDa obtenus par spectrométrie de masse de type ESI, ces deux PLA₂ sont douées d'activités anti-agrégantes et anti-tumorales (Zouari-Kessentini *et al.*, 2009 et 2010).

Une désintégrine appelée CC8 ne présentant aucune activité enzymatique a aussi été isolée à partir du venin de *Cerastes cerastes*. Elle inhibe l'interaction avec les intégrines $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$ (Calvet *et al.*, 2002).

Plusieurs sérine protéinases ont été isolées et bien caractérisées à partir du venin de *Cerastes cerastes*, la fraction coagulante est la première protéase purifiée à partir de ce venin, elle est légèrement hémorragique et ayant poids moléculaire de 14 kDa et de pI 3,2. Elle n'est pas thrombinique mais présente une activité caséinolytique et ne possède ni activité sur les plaquettes ni activité fibrinogénolytique. Cependant, elle diminue le temps de coagulation des plasmas déficients en facteur VIII et X (El-Asmar *et al.*, 1986). Cerastase F4, est un puissant composé anti-coagulant ayant une activité $\alpha\beta$ fibrinogénase, c'est une protéase de 22 kDa (Daoud *et al.*, 1987).

RP34, est une thrombin-like constituée de deux chaînes α et β et possédant une activité α fibrinogénase avec un poids moléculaire de 48,5 kDa et pI de 3,75 (Laraba-Djebari *et al.*, 1992).

Afaâcytine; est une sérine protéinase possédant les activités de la thrombine mais non sensible aux inhibiteurs de la thrombine. Elle est $\alpha \beta$ fibrinogénase à activités caséinolytique, arginine ester-hydrolase et amidase et est constituée de deux chaînes de 40 kDa chacune. Elle active le facteur FX, induit l'agrégation plaquettaire et libère la sérotonine (Laraba-Djebari *et al.*, 1995).

Fraction IVa; est un dimère avec pI>9. Elle active l'agrégation plaquettaire selon le même mécanisme que la thrombine (Basheer *et al.*, 1995).

Cerastotine; C'est une sérine protéinase de type thrombine ayant une activité protéolytique de poids moléculaire de 40 kDa. Elle induit l'activation des plaquettes sanguines en présence du fibrinogène (El-Ayeb *et al.*, 1997).

Cerastocytin; est une thrombin-like à activité amidolytique ayant une masse moléculaire de 38 kDa. Elle est pro-agrégante des plaquettes et active le facteur XIII (Marrakchi *et al.*, 1997).

RCC-PPP; est une α fibrolase à 96 % d'analogie structurale avec la cerastocytine (isoforme). Elle est activatrice des plaquettes sanguines (Dekhil *et al.*, 2003).

I.5. Traitements des envenimations vipérines

Deux approches complémentaires de traitements des envenimations vipérines sont préconisés; un traitement symptomatique visant à atténuer les manifestations physiopathologiques cliniques de l'envenimation. La deuxième approche est un traitement spécifique en utilisant des sérums spécifiques et consiste à neutraliser la toxicité du venin. Ce traitement est capable d'éliminer les composants circulants du venin.

I.5.1. Traitement symptomatique

Le traitement symptomatique est souvent pour traiter les envenimations bénignes ou modérés (grade 0 et 1). Il consiste à administrer des antalgiques et des analgésiques. La prescription des corticoïdes est souvent systématique bien que leur effet bénéfique ne soit pas prouvé (Aubert, 1993).

I.5.2. Traitements spécifiques

I.5.2.1. Immunothérapie antivenimeuse

L'immunothérapie reste un traitement efficace pour lutter contre les effets physiopathologiques induits lors d'une envenimation. Elle s'impose dans le cas d'envenimations sévères et consiste en l'administration d'immun-sérums polyvalents dans le cas où l'espèce de vipère responsable de l'envenimation n'est pas identifiée (Bon, 2000).

L'efficacité de l'immunothérapie dépend de plusieurs paramètres. Parmi ces paramètres, il y a le délai entre la morsure et l'administration du sérum, plus ce délai est court plus la neutralisation est meilleure (Schermann, 2000). La dose de l'antivenin injectée est aussi un paramètre à prendre en considération car une dose optimale est nécessaire à la neutralisation des composants toxiques du venin et conditionne l'efficacité de l'immunothérapie. L'efficacité de l'immunothérapie dépend également de la voie de l'administration du sérum. En effet, la voie d'administration de l'immunothérapie se fait généralement par voie intradermique ou intramusculaire. Lorsque l'envenimation est grave, il est recommandé dans ce cas d'utiliser la voie intraveineuse et le clinicien est tenu de surveiller toutes réactions secondaires de type anaphylactique.

La voie d'administration de l'immunothérapie se fait généralement par voie intradermique ou intramusculaire. Lorsque l'envenimation est grave, il est recommandé dans ce cas d'utiliser la voie intraveineuse et le clinicien est tenu de surveiller toutes réactions secondaires de type anaphylactique.

En Algérie, l'immun-sérum préparé après une hyper-immunisation de chevaux administré lors des envenimations vipérines est constitué de fragments de type F(ab')₂ bivalents dirigés contre les venins de *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*.

I.5.2.2. Vaccinothérapie

Les venins détoxifiés par les rayons gamma (dont la source est le cobalt ⁶⁰Co) ont montré leur effet protecteur contre les envenimations vipérines (Abib et Laraba-Djebari, 2003; Bennacef-Heffar et Laraba-Djebari, 2003; Oussedik-Oumehdi, 2007; Oussedik-Oumehdi et Laraba-Djebari, 2008). L'utilisation des venins modifiés par irradiation gamma provoque une détoxification et protégerait les animaux producteurs d'anti-venins de subir les effets létaux des composants toxiques du venin; en effet ces animaux pourraient développer à long terme des pathologies chroniques. Ces pathologies réduisent l'efficacité du système immunitaire et les anticorps produits perdent leur efficacité à neutraliser le venin (Oussedik-Oumehdi, 2007).

MATERIEL
ET
METHODES

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

Les venins:

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

Les autres venins de *Vipera lebetina* et d'*Androctonus australis hector* utilisés ont été utilisés pour contrôler la spécificité du conjugué constitué de fragments $F(ab')_2$ anti-venin de *Cerastes cerastes* couplé à la peroxydase, nous ont été fournis également par le Laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA).

Les animaux:

Les rats: Des rats Wistar (150 ± 20 g) nous ont été livrés par les animaleries de la FSB-USTHB et de l'IPA (Annexe de Kouba).

Les souris: Les souris que nous avons utilisées dans cette étude proviennent d'un élevage de l'animalerie de l'IPA (Annexe de Kouba), il s'agit de souris blanches mâles NMRI (18 ± 2 g).

Les lapins : Les six lapins utilisés dans le protocole d'immunisation (2 et 2,5 kg) nous ont été fournis par l'animalerie de la FSB-USTHB.

Les globules rouges: Les globules rouges ont été prélevés à partir de sang de mouton dans un tampon Alsever pH 7,6.

Les plasmas humains riches en facteurs de coagulation nous ont été fournis par le CHU Mustapha Bacha, Alger, Algérie

Les plasmas humains déficients en facteurs de coagulation: Ces plasmas proviennent soit de SIGMA soit fournis gracieusement par des patients.

Les plasmas humains riches en plaquettes (PRP): Les PRP nous ont été fournis par le CHU de Bab El-Oued, Alger, Algérie.

II.1.2. Matériel non biologique

- Produits chimiques

Les produits chimiques nous ont été fournis par le Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire (FSB-USTHB) et par le Laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie. Ces produits proviennent de différentes firmes :

Calbiochem: Tween₂₀.

Merck: Bicarbonate de sodium (HNaCO_3) Carbonate de sodium ($\text{Na}_2 \text{CO}_3, 10 \text{H}_2\text{O}$), Soude.

Pharmacia Biotech: Acrylamide.

Panreac: Acide chlorhydrique (HCl), Acide sulfurique (H₂SO₄), Chlorure de sodium (NaCl), Eau oxygénée (H₂O₂), 4 α -Chloro-1-Naphtol, Phosphate monopotassique (KH₂PO₄), Phosphate bipotassique (K₂HPO₄), PMSF, Serum albumine bovine (BSA).

ProLab: Ethanol ((CH₂)₂OH).

Sigma: Acétone, Acetonitrile, Acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), Acide sinapinique (CHCA), Acide trichloroacétique, Acide Tri Fluoro acétique (TFA), Adjuvant complet de Freund, Adjuvant incomplet de Freund, Aprotinine issue des poumons bovins, Antithrombine III issue de plasma humain, Bleu de bromophenol, Chlorure de Calcium (CaCl₂), Chlorure de potassium (KCl), Chlorure de sodium (NaCl), Conjugué anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase, Fibrinogène issu de plasma humain, Glu-1-fibrinopeptide B, N α -CBZ-L-Arginine-p-Nitroanilide Hydrochloride (CBZ), IAM, Lysine-C endopeptidase (1 μ g/ μ L, P-3428), Polyéthylène glycol (PEG), 1,10-Phenanthroline, Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), O-Phénylène diamine dihydrochloride (OPD), TCEP, Thrombine (15 NIH) issue de plasma humain, Trypsine (1 μ g/ μ L, trypsin or grade MS, V5280).

II.2. Méthodes

II.2.1. Purification de biomolécules à partir du venin de *Cerastes cerastes*

La purification des molécules à partir du venin de *Cerastes cerastes* a nécessité la combinaison de plusieurs techniques chromatographiques (Filtration moléculaire, chromatographies échangeuses d'ions, chromatographie d'affinité et chromatographies liquides à haute performance en phase inversée: RP-HPLC), ainsi que par des méthodes électrophorétiques.

II.2.1.1. Chromatographies

II.2.1.1.1. Fractionnement du venin par filtration moléculaire sur Sephadex G-75

Cette étape de filtration moléculaire est utilisée pour fractionner le venin de *Cerastes cerastes* selon la masse moléculaire. Le Sephadex G-75 a été choisi car il permet le fractionnement d'un mélange hétérogène de protéines ayant une masse moléculaire allant de 3 à 70 kDa. L'échantillon de venin (1 g équivalent à 760 Unités d'absorbance) a été dissout dans du tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH 8,5 et soumis à une colonne (2,5 x 100 cm) contenant un gel préalablement équilibré avec le tampon d'élution. Le débit est maintenu constant à 18 mL/h.

II.2.1.1.2. Chromatographies échangeuses d'ions

II.2.1.1.2.1. Chromatographies échangeuses d'anions

La fraction GF1 (43 Unités d'absorbance) douée d'activité protéasique, issue de la filtration moléculaire et présentant des activités fibrinogénolytique et coagulante a été soumise à une chromatographie DEAE-Cellulose A-50 équilibrée avec un tampon phosphate 0,1 M, pH 7,2. L'élution est effectuée à l'aide d'un gradient de force ionique discontinu (NaCl 0,1-0,5 M) suivie

par une élution à l'aide d'une solution de NaCl 1 M. Le débit est maintenu constant à 18 mL/h à raison de 3 mL/tube et l'absorbance des échantillons collectés est lue à 280 nm.

II.2.1.1.2.2. Chromatographies échangeuses de cations

La fraction GF2 (190,5 Unités d'absorbance) présentant une activité phospholipasique et coagulante, issue de la filtration moléculaire a été déposée sur une colonne échangeuse de cations sur CM-Sephadex C-50 préalablement équilibrée avec un tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH 8,5. L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient de force ionique continu (tampon acétate d'ammonium 0,1-0,5 M) suivie par une élution avec le même tampon à 2 M, pH 8,5. Le débit est maintenu constant à 18 mL/h et la lecture de l'absorbance des éluats est effectuée à 280 nm.

II.2.1.1.2.3. Chromatographie d'affinité

La fraction douée d'activité fibrinogénolytique issue des étapes de séparation chromatographiques précédentes de la fraction GF1 a été rechromatographiée sur une colonne d'affinité (1,5 x 10 cm), contenant un gel de Benzamidine-Sepharose 6B. Le gel de Sepharose 6B est lié à la P-amino-benzamidine (inhibiteur des arginine ester hydrolases). Ce gel est préalablement équilibré avec le tampon Tris-HCl 0,05 M-KCl 0,5 M, pH 8. Une première élution est réalisée dans les conditions d'équilibre, elle est suivie par une élution avec le tampon Tris-HCl 0,05 M-KCl 0,5 M, pH 8 contenant le substrat Benzoyl-L-Arginine-Ethyl-Ester (BAEE) à 10^{-2} M afin d'éluer les protéines douées d'activité arginine estérase.

II.2.1.1.2.4. Chromatographies liquides à haute pression en phase inversée (RP-HPLC)

Les différentes chromatographies par RP-HPLC ont été réalisées afin de purifier les trois molécules ayant des activités sérine protéinase, métalloprotéinase et PLA₂. Des colonnes de type Vydac® C4 (214TP)(5 µm: 4,6 x 250 mm) et de type Beckman C8 (5 µm: 4,6 x 250 mm) ont été utilisées. Le débit est de 1 mL/min et les absorbances ont été effectuées à 280 nm. Les détails expérimentaux de la purification de chaque molécule par RP-HPLC seront rapportés dans la partie résultats sous forme de légendes des figures correspondant à chacune des molécules.

II.2.1.2. Caractérisation physico-chimique et protéomique des molécules purifiées

L'homogénéité des molécules purifiées a été vérifiée par électrophorèse dans les conditions dénaturantes et non dénaturantes. La caractérisation de ces molécules est effectuée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight).

II.2.1.2.1. Détermination de la masse moléculaire par SDS-PAGE des molécules purifiées

Les échantillons (venin, fractions chromatographiques et molécules) sont analysés par électrophorèse sur un gel d'acrylamide (20 %) en présence de SDS selon la méthode de Laemmli (1970). Les échantillons à analyser (0,06 Unités d'absorbance) sont dénaturés à 100° C pendant 10 min en présence de SDS à 10 %. Après migration, les bandes protéiques sont colorées au bleu de Coomassie R250 dissout dans l'isopropanol 25 % (v/v) et l'acide acétique. La révélation est effectuée après décoloration du gel par l'acide acétique à 10 % (v/v).

Les marqueurs de poids moléculaire utilisés sont: α lactalbumine 14,4 kDa, Soybean trypsin inhibitor 20,1 kDa, l'anhydrase carbonique 30 kDa, l'ovalbumine 43 kDa, la BSA 67 kDa et la phosphorylase b 94 kDa (Pharmacia Co, Uppsala, Sweden).

II.2.1.2.2. Analyse protéomique des molécules purifiées à partir du venin de *Cerastes cerastes*

La spectrométrie de masse est une technique qui permet de caractériser les molécules purifiées ou présentes en très faible quantité de l'ordre de femtomoles (soit 10^{-15} M) dans un mélange. Cette technique nécessite que les molécules soient volatiles et ionisées pour être analysées. Ces différentes étapes sont réalisées dans le spectromètre de masse. En protéomique, seuls les MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) et l'ESI (ElectroSpray Ionization) sont utilisés (Escoubas *et al.*, 1990; Biemann, 1992)

Trois molécules purifiées ont été soumises à l'analyse protéomique après avoir subi différentes préparations.

II.2.1.2.2.1. Hydrolyse enzymatique des molécules

Un volume de 30 μ L des molécules purifiées (environ 150 μ g de protéine) a soumis à un tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8,5 contenant 8 M d'urée. Les protéines sont précipitées pendant une nuit à -20 °C à l'aide de l'acétone froid (6 volumes). Les pastilles qui en résultent ont été diluées dans 30 μ L du même tampon. Les protéines ont été ensuite réduites et alkylées à l'aide de 5 mM de Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) et 10 mM d'Iodoacetamide, puis hydrolysés par la Lysine-C endopeptidase (1 μ g/ μ L, P-3428, Sigma) pendant 6 h à 37° C. Les échantillons hydrolysés ont été ensuite dilués 4 fois avec le tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8,5 et incubés une nuit à 37° C avec la trypsine (1 μ g/ μ L, grade MS, V5280 Sigma) en présence de 2 mM de CaCl₂. L'hydrolyse complète des protéines est effectuée après une deuxième incubation avec la trypsine (5 h à 37° C). Les échantillons hydrolysés sont centrifugés 10 min à 5 000 g et les surnageants sont lyophilisés et conservés à -70° C jusqu'à leur utilisation.

II.2.1.2.2.2. Nano-chromatographies liquides sur colonne C18 des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des molécules

Une colonne C18 PepMap (15 cm x 75 μ m x 3 μ m, 100 Å) (Dionex LC-Emballages, Sunnyvale, CA, USA) a été utilisée pour la séparation des peptides et la chromatographie a été réalisée à

40° C. La colonne est munie d'un pré-colonne (PepMap C18, 5 mm x 300 µm x 5 microns, 100 Å)(Dionex LC-Emballages, Sunnyvale, CA, USA) pour éliminer les sels. La séparation des peptides (20 µL) est effectuée à l'aide d'une chaîne d'HPLC (Ultimate 3000, Dionex LC Packing) équipée d'un dispositif de fractionnement Probot (Dionex LC-Emballages, Sunnyvale, CA, Etats-Unis). Le solvant A est composé de 5 % d'ACN et de 0,1 % de TFA et le solvant B est constitué de 80 % d'ACN avec 0,1 % de TFA. Après une étape de lavage de 5 minutes, la séparation des peptides est réalisée à l'aide d'un gradient linéaire de solvant B (0 à 50 % B) pendant 45 minutes, suivie par une étape de lavage de 5 minutes à 95 % du solvant B. Les fractions sont collectées, 10 minutes après l'injection (312 fractions de 10 secondes ont été collectées). Ces fractions sont identifiées sur une plaque de MALDI après mélange avec une matrice composée de CHCA (acide sinapinique)(2 mg/mL, 0,8 µL/min) en utilisant le dispositif de Probot. La calibration interne du spectromètre de masse est assurée par la matrice CHCA contenant également 10 femtomoles de Glu-1-fibrinopeptide B (Sigma).

II.2.1.2.2.3. Analyses MS et MS/MS par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF/TOF couplé à la chromatographie liquide de type off-line

L'analyse des échantillons a été effectuée à l'aide d'un spectromètre de masse (4800 MALDI TOF/TOF Analyzer, Applied Biosystems/MDS SCIEX, Framingham, MA, USA) doté d'une source d'ionisation de type MALDI. 3000 lasers/spot ont été utilisés pour assurer un bon S/N (signal/noise). L'étalonnage interne des spectres est automatiquement effectué avec le Glu-1-fibrinopeptide B ($[M+H]^+ = 1570.670$). L'analyse MS/MS est effectuée par la méthode CID ON positive avec 2 kV. Les ions non-redondants avec un $S/N > 30$ ont été sélectionnés en tant que précurseurs et soumis à la fragmentation CID (4000 lasers/précurseurs jusqu'à 15 précurseurs/spot). Une calibration par défaut est automatiquement appliquée pour l'étalonnage des spectres MS/MS.

II.2.1.2.2.4. Identification des protéines

Les recherches MS/MS des protéines, ont été effectuées en utilisant une copie locale du moteur de recherche MASCOT 2,1 (Matrix Science Ltd, UK), intégrée dans le GPS-Explorer Software 3,5 (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Framingham, MA, Etats-Unis) sur la base de données NCBI nr (7 135 729 séquences).

La définition des paramètres de recherche est adoptée en 50 ppm de précision en masse pour le précurseur et 0,3 Da pour les fragments MS/MS. Le clivage des protéines avec la trypsine (K/P) est validé avec un clivage manqué autorisé. La carbamidométhylation des cystéines (modification fixe) et l'oxydation des méthionines (modification variable) ont été autorisées. Les protéines recherchées ont été pris en considération par MASCOT avec un score ≥ 53 et un indice de confiance ≥ 95 % seulement.

La validation de l'identification de la protéine a été réalisée à l'aide du logiciel Scaffold 2,01 (Proteome Software, Portland, Oregon, USA). Les fichiers MASCOT des protéines identifiées ont été ré-analysés de nouveau avec le logiciel Scaffold qui utilise indépendamment deux moteurs de recherche (MASCOT et Tandem) rassemblés en PeptideProphet (filtrage de peptides) et ProteinProphet (filtrage de l'identification de protéines). Les résultats obtenus sont ensuite automatiquement combinés. Seules les protéines identifiées avec un minimum de deux peptides (indice de confiance des peptides $\geq 95\%$) et un indice de confiance des protéines $\geq 95\%$ sont prises en considération.

II.2.1.3. Caractérisation enzymatique et biologique des molécules purifiées du venin

II.2.1.3.1. Détermination des activités enzymatiques

II.2.1.3.1.1. Détermination de l'activité caséinolytique des molécules purifiées

L'activité caséinolytique est testée selon la méthode de Kunitz (1947) et modifiée par Van Der Walt et Joubert (1971). L'échantillon (venin, fractions chromatographiques ou molécules purifiées) à tester (0,05 Unités d'absorbance) est incubé en présence de caséine 1 % (p/v) dans un volume de 1,9 mL de tampon 0,2 M Tris-HCl, pH 7,2 pendant 15 minutes à 37° C avant l'addition d'un volume de 3 mL d'acide trichloracétique à 5 % (p/v) afin d'arrêter la réaction enzymatique. Le mélange réactionnel est ensuite centrifugé à 1000 g pendant 20 minutes. L'absorbance du surnageant est effectuée à 280 nm.

II.2.1.3.1.2. Détermination de l'activité arginine ester hydrolase des molécules purifiées

L'activité arginine ester hydrolase est déterminée selon la méthode de Nishikata (1984) en utilisant un substrat synthétique le Benzoyl-L-Arginine-Ethyl-Ester (BAEE). La réaction d'hydrolyse de ce substrat ($6,6 \times 10^{-4}$ M) incubé à 37° C dans un tampon Tris HCl 0,04 M, pH 8 contenant 0,01 M de CaCl_2 est suivie à 253 nm après 30 minutes d'incubation.

II.2.1.3.1.3. Détermination de l'activité amidolytique des molécules purifiées

L'activité amidolytique du venin et des molécules purifiées est testée après hydrolyse d'un substrat synthétique spécifique à l'activité de type thrombine à 405 nm. Les échantillons à tester sont préalablement incubés pendant 10 minutes à 37° C dans du tampon Tris-HCl 0,01 M, pH 8,7 contenant du NaCl 0,1 M et du PEG 0,1 % (p/v). Après addition de 50 μL de substrat ($92,95 \times 10^{-2}$ mg/mL) et une incubation de 15 minutes à 37° C, la lecture de la densité optique du milieu réactionnel est effectuée à 405 nm.

II.2.1.3.1.4. Détermination de l'activité phospholipasique des molécules purifiées

Cette activité est mise en évidence selon la méthode de Cesari et Boquet (1935) modifiée par Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire (1990). Elle est basée sur l'hémolyse indirecte des globules rouges. Les échantillons (venin, fractions chromatographiques ou molécules purifiées),

(0,05 Unités d'absorbance) sont mis en présence de lécithine à 1 % (v/v) dans un tampon phosphate 0,13 M, pH 7,4. Après incubation pendant 1 heure à 37° C, un volume de 1 mL de globules rouges dilués à 1/20 est ajouté et incubé pendant 30 minutes à 40° C. L'hémolyse des globules rouges est observée après centrifugation du mélange à 1000 g pendant 15 minutes.

II.2.1.3.1.5. Effets d'inhibiteurs sur les différentes activités enzymatiques

Les inhibiteurs (5 mM) utilisés; Aprotinine, EDTA, EGTA, Héparine, 1,10-Phenanthroline, PMSF et Anti-thrombine III, sont incubés en présence de l'enzyme purifiée pendant 1 h à 37° C avant l'addition du substrat. L'activité enzymatique résiduelle est testée en suivant l'hydrolyse des substrats de la caséine à 280 nm, le BAEE à 253 nm et le CBZ à 405 nm.

II.2.1.3.2. Détermination des activités biologiques

Dans cette étude, les effets des enzymes purifiées ainsi que celui du venin et de la thrombine sur certaines activités biologiques sont déterminés.

II.2.1.3.2.1. Détermination de l'activité coagulante

L'activité coagulante des échantillons ou de la thrombine humaine utilisée comme témoin est mise en évidence en utilisant des plasmas humains (plasma normal et plasmas déficients en certains facteurs) ou de manière plus spécifique avec le fibrinogène purifié selon la méthode de Quick (1935, modifiée par Laraba-Djebari *et al.*, 1992). Le plasma humain (0,2 mL) préincubé à 37° C pendant 2 minutes, est mis en présence d'une quantité de 0,05 Unités d'absorbance de chaque échantillon ainsi que 0,2 mL de CaCl₂ 25 Mm. L'apparition du caillot est visualisé et le temps de coagulation est mesuré. Les résultats sont exprimés à l'aide d'une courbe standard exprimant la coagulation du fibrinogène en fonction de la quantité de thrombine additionnée.

II.2.1.3.2.2. Détermination de l'activité fibrinolytique

L'activité fibrinolytique est déterminée en utilisant le fibrinogène humain comme substrat à 0,3 % (p/v) dans un tampon phosphate 0,15 M, pH 7,4. Après addition des échantillons pendant 10 min à 37° C, le mélange est centrifugé à 3000 g pendant 20 min. Les surnageants récupérés sont analysés par RP-HPLC sur une colonne C18 avec un débit de 1 ml/min. L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient linéaire de 5 à 75 % d'acetonitrile contenant 0,05 % de TFA.

L'activité fibrinolytique du venin a été également déterminée par SDS-PAGE. Dans ce cas, 100 µL du surnageant obtenu au préalable est incubé dans une solution dénaturante contenant le SDS à 10 % (p/v) et du β mercaptoethanol à 4 % (v/v). Les produits de la réaction sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (7,5 %) dans les conditions réductrices. La révélation des bandes protéiques est effectuée au bleu de Coomassie R250.

II.2.1.3.2.3. Détermination de l'activité hémorragique

La détermination de l'activité hémorragique est réalisée selon la méthode de Kondo *et al.*, 1960. Les échantillons (venin et molécules) sont injectés à la souris à raison de deux doses de 50 et 100 µg/20 g de poids corporel par voie s.c. au niveau de la peau dorsale de l'animal. Les animaux sont sacrifiés après 2 heures d'injection, la peau est prélevée et les diamètres des spots hémorragiques sont mesurés. Les souris témoins reçoivent 100 µL d'une solution saline de NaCl à 0,9 %.

II.2.1.3.2.4. Détermination de l'activité agrégante des plaquettes sanguines

Le sang de volontaires sains est prélevé dans le citrate de sodium à 3,2 % (p/v) et centrifugé à température ambiante pendant 10 minutes à 1 000 g pour obtenir les plasmas riches en plaquettes (PRP). La détermination de l'activité agrégante des plaquettes induites par les échantillons (venin et molécules) ou de la thrombine est effectuée sur ces plasmas. Un volume de 270 µL de plasma est pré-incubé à 37° C pendant 1 minute puis l'échantillon à tester est ajouté. L'agrégation des plaquettes est mesurée selon la transmission de la lumière en utilisant un agrégomètre (Soderal-medical TA-8V).

II.2.1.3.2.5. Détermination de l'activité anti-agrégante des plaquettes

La détermination de l'action anti-agrégante de l'échantillon à tester est réalisée après induction de l'agrégation avec l'acide arachidonique, le fibrinogène ou la thrombine. Cette activité est mesurée à l'aide d'un agrégomètre (Soderal-medical TA-8V).

II.2.2. Effets inflammatoires et métaboliques induits par les molécules purifiées

Les effets inflammatoires et métaboliques induits par le venin ou les molécules purifiées ont été déterminés après injection par voie i.p. à des rats selon une cinétique allant de 30 minutes à 7 jours.

II.2.2.1. Effets inflammatoires du venin et des molécules purifiées

II.2.2.1.1. Effet du venin et des molécules purifiées sur les cellules inflammatoires dans le liquide péritonéal et le sang périphérique

Les animaux ont reçu une dose subléthale (1 mg/kg de masse corporelle) du venin ou des molécules purifiées par voie i.p. Les animaux ont été sacrifiés après 3, 6, 24 et 48 h après envenimation et 3 et 24 h après administration des molécules. Un lot témoin a reçu dans les mêmes conditions expérimentales, une solution saline composée du tampon PBS 0,1 M, pH 7,4. Dans le liquide péritonéal, la numération des différentes populations cellulaires a été réalisée sur une cellule de Malassez en utilisant le bleu de Trypan. Après dilution de 10 µL du liquide péritonéale dans 90 µL de la solution de bleu de Trypan, 10 à 20 µL sont prélevés et déposés sur la chambre de comptage de la cellule de Malassez.

II.2.2.1.2. Effet du venin et des molécules purifiées sur le taux des cytokines IL6 et IL10

La quantification du taux des cytokines (IL6 et IL10) a été effectuée par le test ELISA sandwich. Les microplaques sont préalablement sensibilisées avec un anticorps anti-cytokines à doser (IL6 ou IL10). Les standards ainsi que les sérums sont déposés en « duplicate » à raison de 50 µL par puits. La réaction est incubée à température ambiante pendant 1 heure. Après une série de lavages, 100 µL d'une solution contenant le conjugué (Streptavidine-HRP) est déposé dans chaque puits. La microplaque est incubée de nouveau à température ambiante pendant 30 minutes. L'activité enzymatique est effectuée après addition du substrat spécifique à l'enzyme: le TMB (3-3',5-5' Tétraméthyl Benzidine) à raison de 100 µL par puits. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, la réaction est arrêtée après addition d'une solution d'arrêt (H₂SO₄ 2 N) à raison de 100 µL/ puits. L'intensité de coloration est mesurée à 450 nm, elle est directement proportionnelle à la concentration de cytokines détectée dans les échantillons et les standards.

II.2.2.1.3 Effet du venin et des molécules purifiées sur le taux de la peroxydase éosinophilique

La peroxydase des éosinophiles est une hémoprotéine hétérodimérique fortement cationique de 71-77 kDa. Elle est libérée par les éosinophiles activés par les médiateurs de la cascade inflammatoire. Cette enzyme est dosée dans l'homogénat pulmonaire de rats envenimés ou ayant reçu les molécules purifiées. Les poumons récupérés après sacrifice des rats sont homogénéisés avec 2 mL de tampon Tris-HCl 0,06 M, pH 8 contenant le triton x₁₀₀ à 1% puis centrifugés à 3 000 g pendant 15 minutes. Le surnageant (50 µL) de chaque échantillon est déposé dans une microplaque (96 puits) en présence de 100 µL du même tampon, de 10 µL d'H₂O₂ (0,06 %) et de 20 mg du chromogène OPD (O- Phénylène Diamine Dihydrochloride). La lecture de l'absorbance est effectuée à 490 nm.

II.2.2.1.4. Effet du venin et des molécules purifiées sur l'activité hémolytique du complément

Le système du complément joue un rôle important dans la réponse inflammatoire. Ce système est habituellement mesuré en évaluant la capacité d'un sérum à lyser des globules rouges de moutons (GRM) recouverts d'anticorps de lapin anti-GRM.

Les GRM sont mis en contact avec le sérum hémolytique (anti-GRM) à une dilution de 1/30 pendant 30 minutes. Après une série de lavages, les GRM sensibilisés avec l'hémolysine (100 µL) sont additionnés à 900 µL de sérum dilué au 1/30 et mis à incuber pendant 1 h à 37° C. Après centrifugation à 3000 g pendant 5 minutes, la lecture de l'absorbance du surnageant est effectuée à 540 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité lytique du complément en comparaison avec un témoin positif (tampon PBS 0,1 M, pH 2) présentant 100 % de lyse.

II.2.2.1.5. Détermination du taux du fibrinogène plasmatique après envenimation ou administration des molécules purifiées

Le dosage du fibrinogène est utilisé dans l'exploration des processus inflammatoires et dans le cas des troubles de la coagulation sanguine. Le dosage chromométrique du fibrinogène représente une méthode indirecte qui permet de mesurer le temps d'apparition de fibrine après transformation de la totalité du fibrinogène. Un volume de 200 µL du plasma des rats ayant reçu l'échantillon (venin ou molécules purifiées) par voie s.c. est incubé avec un même volume en thrombine à 37° C pendant 2 minutes. Une fois le caillot de fibrine formé, le temps est déterminé, il est inversement proportionnel à la quantité du fibrinogène estimée par une courbe d'étalonnage.

II.2.2.2. Effets métaboliques

Les effets du venin et de ses molécules purifiées sur les paramètres métaboliques (glucose, cholestérol, triglycérides, urée et créatinine) sont déterminés chez les rats après injection s.c. d'une dose subléthale de chaque échantillon.

II.2.3. Biodistribution du venin et des molécules purifiées

L'étude de la biodistribution du venin et des molécules purifiées a nécessité la purification d'anticorps spécifiques et leur couplage à la peroxydase) pour la préparation d'un conjugué qui sera utilisé dans les tests d'ELISA sandwich.

II.2.3.1. Préparation et purification des anticorps de type Fab et F(ab')₂ antivenin

La production d'un immun-sérum a été entreprise après immunisation de six lapins avec le venin total. Le protocole d'immunisation a consisté à injecter chaque semaine des doses croissantes de venin (150, 200, 250, 300, 350 et 400 µg). L'adjuvant complet de Freund est utilisé lors de la première injection alors que l'adjuvant incomplet de Freund est utilisé à la deuxième et la troisième injection. Les lapins sont sacrifiés au bout de 45 jours d'immunisation. L'efficacité des anticorps est déterminée par ELISA simple.

Les immun-sérums ayant des titres élevés en anticorps sont rassemblés et précipités au sulfate d'ammonium à 40 et à 30 % afin d'obtenir des anticorps de la classe d'IgG. Ces immunoglobulines subissent une hydrolyse enzymatique par la papaïne ou par la pepsine pour obtenir respectivement des fragments de type Fab ou F(ab')₂.

II.2.3.1.1. Couplage du venin de *Cerastes cerastes* au gel de Sepharose CL4B activé par le BrCN

Le couplage du venin de *Cerastes cerastes* au gel de Sepharose CL4B activé par le BrCN est réalisé selon la méthode de Thernynck et Avrameas (1991). Le gel (7,5 g) est mis en contact avec 150 mL d'HCl 1 mM. Après une série de lavages (2 min à 3000 g), la solution du venin à coupler (15 mg) dissout dans un tampon carbonate de sodium 0,1 M, pH 8,3 contenant le NaCl 1 M, est ajoutée. Ce mélange est incubé sous agitation douce à 4° C pendant 1 nuit puis

centrifugé à 3000 g pendant 2 minutes. Le culot récupéré est repris dans le tampon de blocage (tampon glycine 0,2 M, pH 8) et incubé à 4° C pendant 16 h. L'excès du venin est éliminé par une nouvelle série de centrifugations à 3000 g pendant 2 minutes.

II.2.3.1.2. Purification des anticorps par chromatographie d'affinité

Le gel de Sepharose CL4B activé par le BrCN, couplé au venin est déposé sur une colonne de chromatographie (5 x 1 cm) et équilibré avec le tampon PBS 0,1 M, pH 7,4. Les fragments d'anticorps à purifier (100 Unités d'absorbance) sont déposés à la surface du gel, le débit est maintenu constant à 18 mL/h. L'élution des protéines non spécifiques est réalisée à l'aide d'un tampon PBS 0,1 M, pH 7,4. Les fragments Fab ou F(ab')₂ de moyenne et de haute affinité sont élués respectivement avec un tampon glycine 0,1 M, pH 3 et 0,1 M, pH 2.

L'homogénéité des anticorps purifiés est contrôlée par SDS-PAGE à 12 % d'acrylamide.

II.2.3.2. Séroneutralisation et nouvelles DL50 du venin avec les anticorps purifiés

Les fragments (Fab ou F(ab')₂) purifiés sont testés pour leur capacité à neutraliser la toxicité du venin

Le mélange "venin-anticorps" est constitué de doses croissantes de venin allant de 2 à 9 DL50 et d'un volume fixe de l'immun-sérum à raison de 150 µL par souris.

Après une incubation à 37° C, pendant 1 heure, le mélange "venin-anticorps" (500 µL) est administré par voie i.p. à des lots de 4 souris pour déterminer la létalité résiduelle du mélange.

Les souris utilisées comme témoins négatifs, reçoivent 500 µL de NaCl 9 ‰ par voie i.p. tandis que les souris témoins positifs reçoivent par la même voie une dose de 5 DL50 du venin. Le taux de mortalité ou de survie des souris est noté 24 et 48 heures après.

II.2.3.3. Détermination des titres des anticorps purifiés par ELISA simple

Une microplaque est sensibilisée avec le venin (5 µg/µL) dissout dans le tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M, pH 8,6 et incubée à +4° C pendant une nuit.

Après une série de 5 lavages et une saturation de la microplaque avec du lait écrémé 5 % (p/v) dans le tampon PBS 0,1 M, pH 7,4 contenant du Tween₂₀ 0,1 % (v/v), la plaque est incubée à 37° C pendant une heure et lavée 5 fois avec du tampon PBS (0,1 M, pH 7,4) Tween₂₀ 0,1 %. Des dilutions successives de 1/2 en 1/2 des anticorps (Fab et F(ab')₂) sont effectuées dans le même tampon suivie d'une incubation pendant 1 heure à 37° C. Un volume de 100 µL du conjugué (anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase) dilué à 1/2000 est déposé dans toutes les cupules, après une série de 5 lavages avec le tampon PBS (0,1 M, pH 7,4) contenant du Tween₂₀ 0,1 % puis une incubation de 1 heure à 37° C. La solution du substrat (10 µL d'H₂O₂ à 0,06 %, de 10 mg du chromogène O-Phénylène Diamine dihydrochloride) est déposée dans tout les puits à raison de 100 µL par puits. La réaction immuno-enzymatique se

développe à l'obscurité et à température ambiante pendant 15 minutes et est arrêtée avec une solution d' H_2SO_4 (2 N). La lecture de l'absorbance est déterminée à 490 nm.

II.2.3.4. Préparation d'un conjugué

Le couplage des fragments $F(ab')_2$ spécifiques à la peroxydase est réalisé selon la méthode de Thernynck et Avrameas (1991).

La peroxydase (100 mg) est dissoute dans un tampon PBS 0,1 M, pH 6,8 et mise en contact avec 405 μ L de glutaraldehyde à 25 % (v/v). Après incubation à l'obscurité pendant 24 heures à température ambiante, le mélange est déposé à la surface d'une colonne (10 cm) remplie avec un gel de Sephadex G-25. La peroxydase activée est ensuite récupérée. Cette dernière est mélangée aux anticorps à coupler (6 mg) en présence de 550 μ L de tampon carbonate-bicarbonate de sodium 1 M, pH 9,5. Ce mélange est incubé à l'obscurité pendant une nuit à 40° C. La réaction est arrêtée à l'aide d'un volume de 616 μ L de tampon glycine 1 M, pH 8,2 est ajouté pour bloquer la réaction. Le mélange est ensuite dialysé contre le tampon contre le tampon PBS (0,1 M, pH 6,8). L'excès de peroxydase non couplée est éliminé à l'aide d'une centrifugation à 2500 g pendant 10 minutes. Le surnageant récupéré est mélangé avec le même volume de glycérol. Le titre du conjugué est testé par ELISA simple et sa spécificité est contrôlée vis-à-vis les venins de vipères (*Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*) et du scorpion *Androctonus australis hector*.

II.2.3.5. Biodistribution du venin et des molécules purifiées

II.2.3.5.1. Immunoréactivité des molécules purifiées avec l'anticorps $F(ab')_2$ antivenin par ELISA et DOT-ELISA

Le conjugué composé de fragments de $F(ab')_2$ couplé à la peroxydase est utilisé dans le test de la biodistribution des molécules purifiées. L'immuno-détection de ces molécules par l'anticorps antivenin a été vérifiée par ELISA et DOT-ELISA.

Le Dot-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immuno-Sorbant Assay) est une technique immuno-enzymatique basée sur l'immuno-détection spécifique des antigènes préalablement immobilisés sur une membrane de nitrocellulose ayant la propriété de les absorber par liaisons non covalentes.

Une gamme de venin ou des molécules purifiées est déposée dans des puits tracés sur la feuille de nitrocellulose (5 μ L/puits). Cette gamme allant de 0,022 à 200 ng est réalisée dans du tampon TBS 0,1 M, pH 7,5) en effectuant des dilutions de $\frac{1}{2}$ en $\frac{1}{2}$ à partir d'une solution mère à 40 μ g/mL. Après saturation au lait écrémé 10 % (p/v) pendant une heure à température ambiante et une série de lavages dans le tampon TBS 0,1 M, pH 7,5, les feuilles de nitrocellulose sont incubées à température ambiante pendant une heure avec l'anticorps dilué au 1/100. Le conjugué anti-IgG de lapins couplé à la peroxydase (1/500) est incubé avec les feuilles lavées plusieurs fois avec le tampon TBS 0,1 M, pH 7,5. La révélation de la réaction d'immuno-réactivité est effectuée après 30 min d'incubation à température ambiante à l'obscurité avec un substrat chromogénique [50 mg de 4-a chloronaphtol dissout dans 1 mL de

méthanol et 100 mL de tampon PBS 0,1 M, pH 7,4 et 50 μL d' H_2O_2 à 0,06 %]. L'arrêt de la réaction est effectué par lavage des bandelettes de nitrocellulose à l'eau distillée. La réaction immuno-enzymatique est révélée après apparition d'une coloration bleu au niveau du dépôt de l'immun-complexe "Antigène-Anticorps".

L'immuno-réactivité des molécules avec l'anticorps est également testée par ELISA simple tel que décrit précédemment.

II.2.3.5.2. Distribution du venin et des molécules par ELISA sandwich

La distribution du venin et des molécules dans les différents compartiments sériques et tissulaires de l'animal a été réalisée sur des rats Wistar (150 ± 20 g). Des lots d'animaux ayant reçu une dose de 150 μg /masse corporelle d'animal (1 mg/kg d'animal). Le venin ou les molécules sont injectés par voie s.c. Des prélèvements du sang et d'organes (foie, poumon, reins, cœur, pancréas, rate, estomac, intestin et cerveau) sont effectués selon une cinétique allant de 30 minutes à 7 jours après injection du venin et de 3 et 24 heures après administration des molécules purifiées. Les homogénats de tissus ainsi que le sang sont centrifugés à 3000 g pendant 5 minutes. Les animaux témoins ont été traités de la même manière avec une solution de NaCl 0,9 %. La quantification du venin et des molécules dans les différents organes et dans le sérum des animaux est réalisée par ELISA sandwich selon le protocole décrit par Chérifi (2004).

II.2.4. Action de l'immunothérapie sur les effets inflammatoires, métaboliques et sur la biodistribution du venin

Le traitement avec les anticorps (Fab, F(ab')_2 ou le mélange des deux)(40 mg/kg) a été administré par voie i.p. 30 minutes après envenimation avec le venin à une dose de 1 mg/kg de poids d'animal. L'action des trois traitements a été évaluée sur les effets inflammatoires et altérations métaboliques du venin ainsi que sur sa redistribution 24 heures après l'administration de l'immunothérapie.

RESULTATS
ET
DISCUSSION

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Purification de molécules ayant des activités serine protéase,

métalloprotéinase et phospholipase A₂ à partir du venin de *Cerastes cerastes*

Trois molécules appartenant à la classe des hydrolases: (une serine protéinase CC3-SPase, une métalloprotéinase CCSV-MPase et une phospholipase A₂ CC2-PLA₂) ont été purifiées à partir du venin de *Cerastes cerastes*, en utilisant une série de techniques chromatographiques, Gel-Filtration sur Sephadex G-75, chromatographies échangeuses d'anions sur DEAE-Sephadex A-50, de cations sur CM-Sephadex C-50, chromatographie d'affinité et chromatographies liquides à haute pression en phase réverse (Figures 16A, 16B, 16C, 17A, 17B, 17C, 17D, 18A, 18B et 18C).

Les fractions correspondantes aux activités, serine protéinase (CC3-SPase) et métalloprotéinase (CCSV-MPase) sont douées également d'activités caséinolytique et amidase respectivement sur des substrats naturel et synthétique. La fraction CC3-SPase présente également une activité arginine-ester hydrolase.

La fraction correspondant à la phospholipase est dépourvue de toute activité protéolytique. Cette fraction vraisemblablement de type PLA₂ a été nommée CC₂-PLA₂.

L'homogénéité de chaque molécule purifiée a été confirmée par HPLC analytique sur des colonnes Beckman C8 pour CCSV-MPase et CC₂-PLA₂ et Vydac® C4 pour la serine protéase CC3-SPase ainsi que par électrophorèse sur SDS-PAGE à 15% (Figures 16C, 17D 18C et 17E).

Les résultats obtenus révèlent des masses moléculaires apparentes de 14, 40 et 70 kDa respectivement pour les molécules dénommées, CC₂-PLA₂, CC3-SPase et CCSV-MPase.

III.2. Caractérisation structurale et biochimique des molécules purifiées

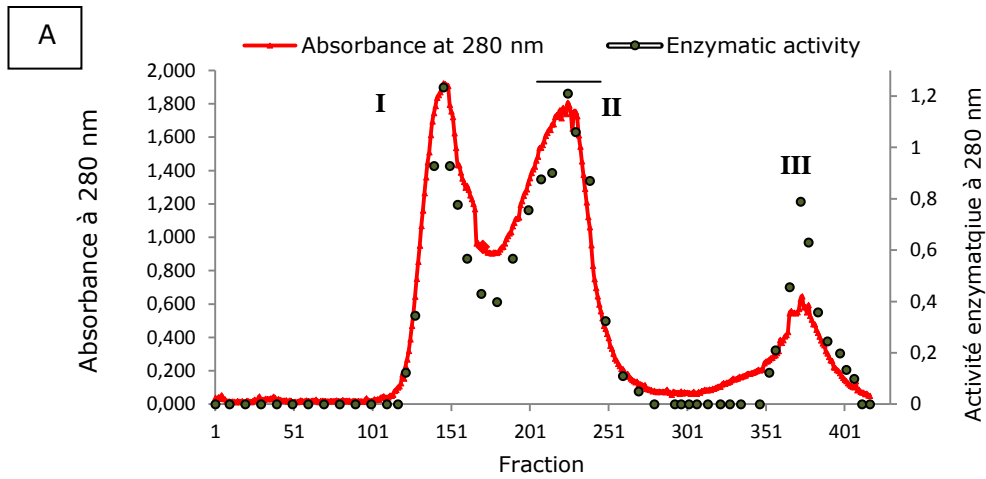
III.2.1. Caractérisation enzymatique des biomolécules purifiées

III.2.1.1. Détermination des activités enzymatiques

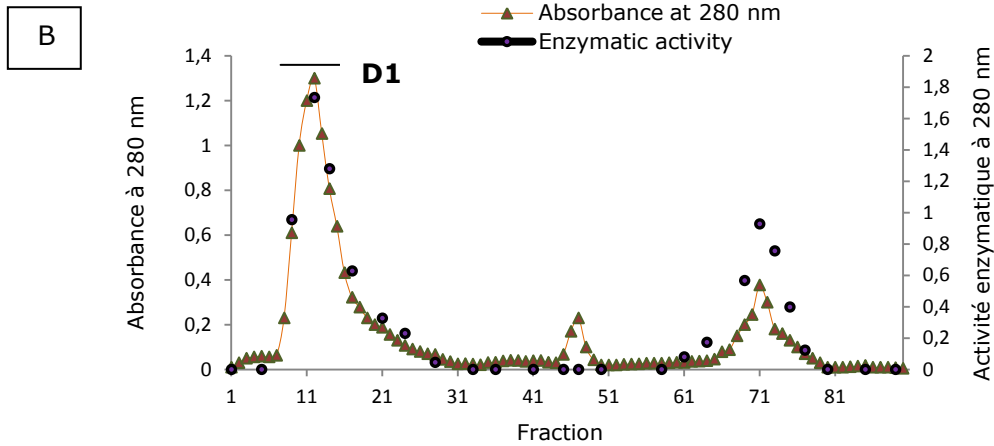
- Détermination des activités caséinolytique, amide-hydrolase et arginine ester-hydrolase

L'activité caséinolytique mise en évidence dans le venin a été retrouvée dans les deux molécules CC3-SPase et CCSV-MPase.

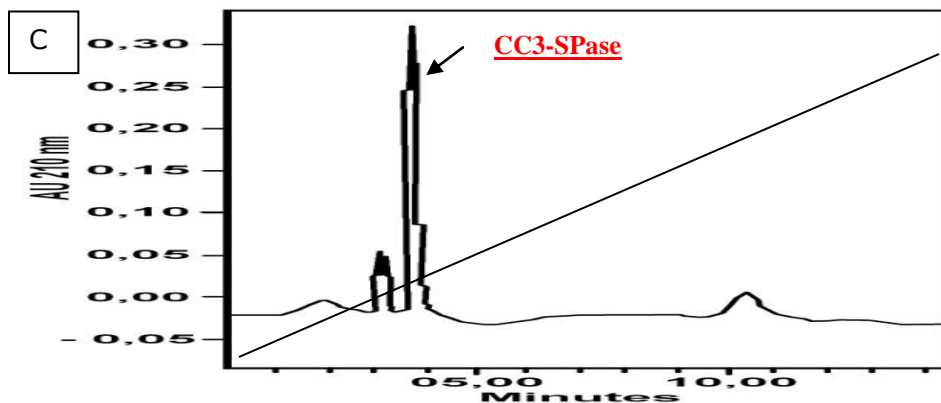
Les résultats montrent que les molécules CC3-SPase et CCSV-MPase présentent une activité protéolytique comparable à celle du venin et à celle de la thrombine utilisée comme témoin d'activité (Tableau VI).



Filtration moléculaire sur Sephadex-G75, dans 0,1 M d'acétate d'ammonium, pH 8,5. L'échantillon (1 g de venin) dissout dans ce tampon a été soumis sur une colonne de (2,5 x 100 cm) préalablement équilibrée avec le tampon d'élution. Le débit est maintenu constant à 18 mL/h. La fraction II possède une activité protéolytique maximale.

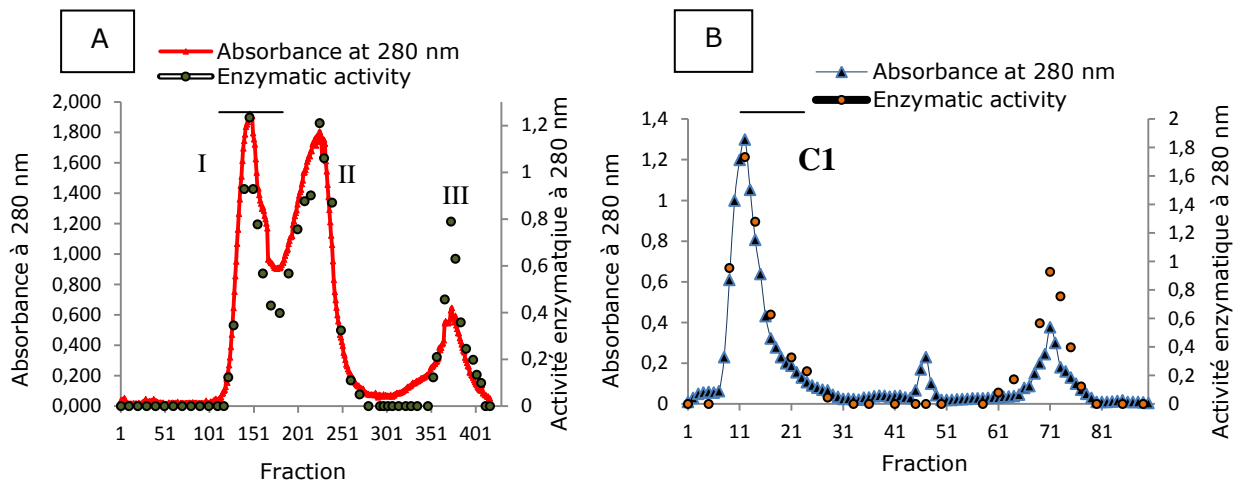


Chromatographie sur DEAE-Cellulose A-50 de la fraction II. La fraction II a été soumise sur DEAE-Cellulose A-50 équilibrée avec du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,2. L'élution est faite par un gradient discontinu de force ionique (NaCl 0,1-0,5 M) suivie d'une élution avec une solution de NaCl 1 M. Le débit est maintenu constant à 18 mL/h et l'absorbance des échantillons collectés est lue à 280 nm. L'activité serine-protéase est retrouvée dans la fraction minoritaire D2.

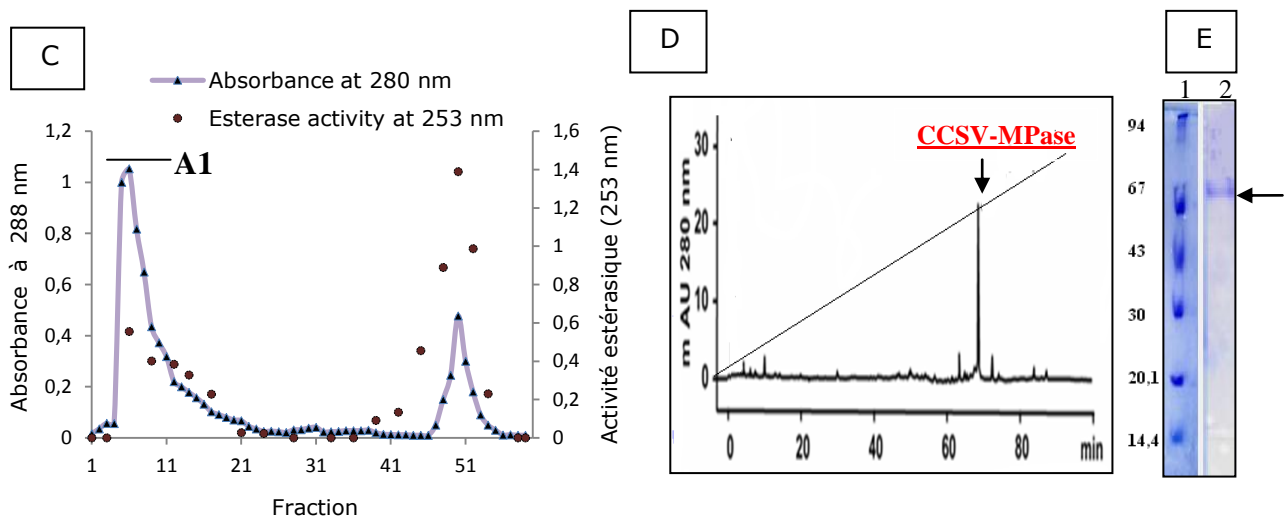


RP-HPLC de la fraction D1 sur une colonne Vydac® C4 (214TP) (5 µm: 4,6x250 mm), débit 1ml/min, détection UV (280 nm), Gradient d'élution linéaire de 15 minutes allant de 0% de Solvant A: 1% TFA dans l'eau à 50% dans Solvant B: 1% TFA/CH₃CN ,50/50. Les activités enzymatiques sont retrouvées dans CC3-SPase.

Figure 16 : Profils chromatographiques obtenus lors de la purification de CC3-SPase à partir du venin de *Cerastes cerastes*.

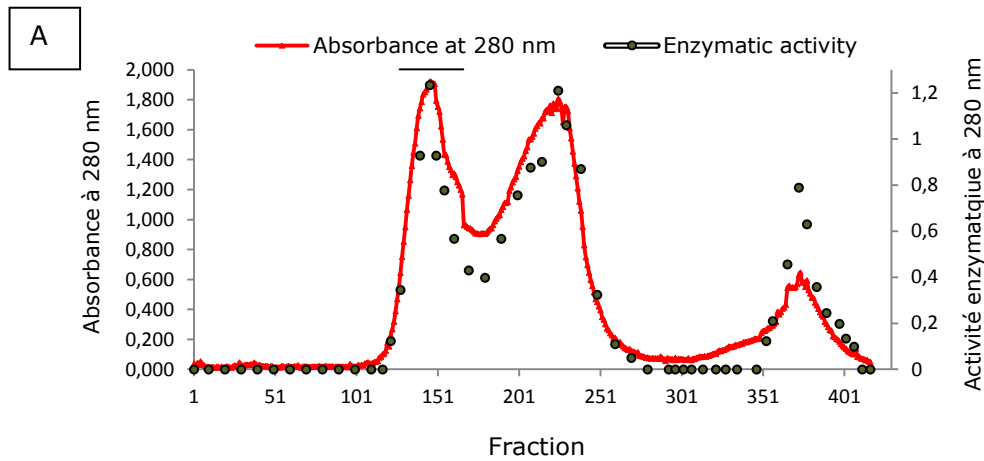


- (A) Filtration moléculaire sur Sephadex-G75, dans 0,1 M d'acétate d'ammonium, pH 8,5. L'échantillon (1 g de venin équivalent de 760 Unités d'absorbance) dissout dans ce tampon a été soumis sur une colonne de (2,5 x 100) cm préalablement équilibrée avec le tampon d'éluant. Le débit est maintenu constant à 18 mL/h. La fraction I possède une activité protéolytique maximale.
- (B) CM-Sephadex C-50 de la fraction I. La fraction I a été soumise sur CM-Sephadex C-50 préalablement équilibrée avec un tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH 8,5. L'éluant a été réalisé par un gradient continu de force ionique (tampon acétate d'ammonium 0,1-0,5 M) suivie du même tampon à 2 M, pH 8,5. Le débit est maintenu constant à 18 mL/h et la lecture de l'absorbance des éluats est effectuée à 280 nm. La fraction C1 possède une activité protéolytique et fibrinogénolytique.

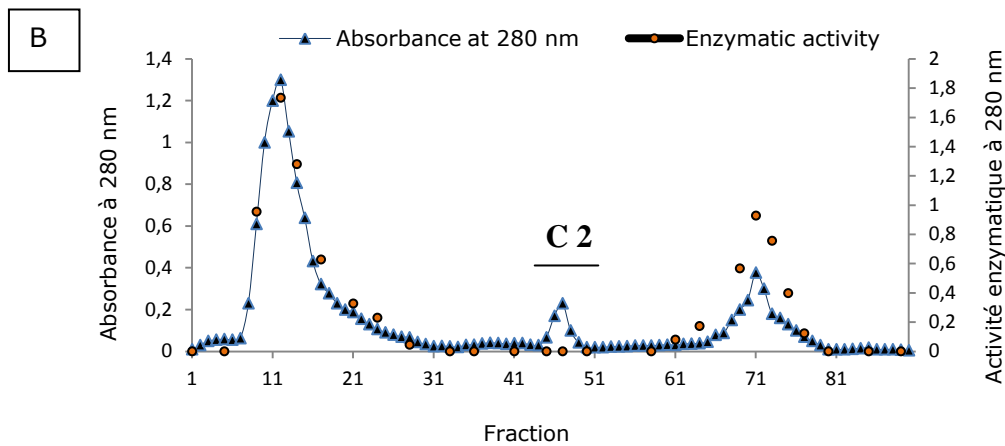


- (C) Chromatographie d'affinité de la fraction C1. La fraction C1 a été soumise sur une colonne d'affinité (1,5 x 10) cm contenant un gel de Benzamidine-Sepharose 6B. Ce gel est préalablement équilibré par le tampon Tris-HCl 0,05 M-KCl 0,5 M, pH 8. Une première élution dans les conditions d'équilibre est réalisée pour éliminer les fractions non spécifiques (Fraction A1). Elle est suivie d'une élution avec le tampon Tris-HCl 0,05 M-KCl 0,5 M, pH 8 contenant le substrat Benzoyl-L-Arginine-Ethyl-Ester (BAEE) à 10^{-2} M qui permet d'éluier les protéines douées d'une activité arginine estérase (serine protéinase).
- (D) RP-HPLC de la fraction A1 sur une colonne Beckman C8 (5 μ m: 4,6 x 250 mm), débit 1 ml/min, Gradient d'éluant linéaire 30 minutes allant de 0 % de solvant A: 1% de TFA dans l'Acetonitrile à 80% dans le solvant B. Les activités caséinolytique et amidase sont retrouvées dans CCSV-MPase.
- (E) SDS-PAGE (15%) à pH 8,1 de CCSV-MPase purifiée, utilisant les marqueurs standards de masses moléculaires suivantes phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa), and lactalbumin (14.4 kDa) de haut en bas (La piste 1). La piste 2 correspond à CCSV-MPase.

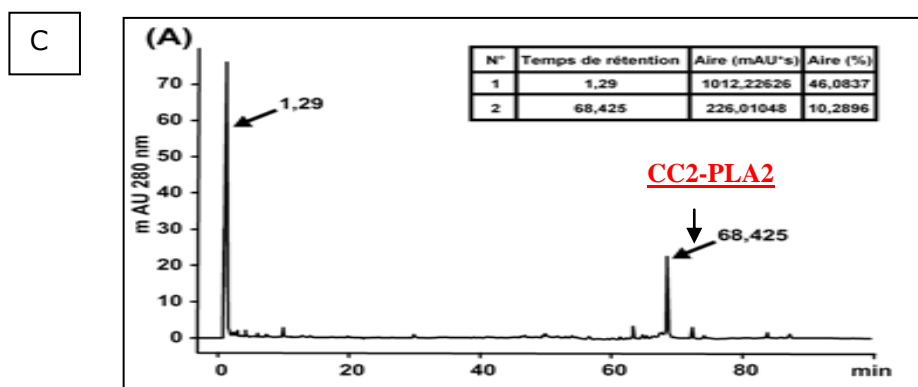
Figure 17 : Profils chromatographiques obtenus lors de la purification de CCSV-MPase à partir du venin de *Cerastes cerastes*.



Filtration moléculaire sur Sephadex-G75, dans 0,1 M d'acétate d'ammonium, pH 8,5. L'échantillon (1 g de venin équivalent de 760 Unités d'absorbance) dissout dans ce tampon a été soumis sur une colonne de (2,5 x 100) cm préalablement équilibrée avec le tampon d'éluant. Le débit est maintenu constant à 18 mL/h. La fraction I possède une activité phospholipasique maximale.



CM-Sephadex C-50 de la fraction I. La fraction I a été soumise sur CM-Sephadex C-50 préalablement équilibrée avec un tampon acétate d'ammonium 0,1 M, pH 8,5. L'éluant a été réalisé par un gradient continu de force ionique (tampon acétate d'ammonium 0,1-0,5 M) suivie du même tampon à 2 M, pH 8,5. Le débit est maintenu constant à 18 mL/h et la lecture de l'absorbance des éluats est effectuée à 280 nm. La fraction C2 possède une activité phospholipasique.



RP-HPLC de la fraction C2 sur une colonne Beckman C8 (5 µm: 4,6 x 250 mm), débit 1 ml/min, détection UV (280 nm), Gradient d'éluant linéaire 30 minutes allant de 0% de solvant A : 1% de TFA dans l'Acetonitrile à 80% dans le solvant B. L'activité phospholipase est retrouvée dans CC2-PLA2 qui était dépourvue de toute activités caséinolytique, amide-hydrolase et arginine ester-hydrolase.

Figure 18 : Profils chromatographiques obtenus lors de la purification de CC₂-PLA₂ à partir du venin de *Cerastes cerastes*

Tableau VI: Détermination des activités caséinolytique, amide hydrolase et arginine ester hydrolase des molécules CC3-SPase et CCSV-MPase

	Activité caséinolytique (UA/mL) à 280 nm	Activité amide-hydrolase (UA/mL) à 253 nm	Activité arginine ester-hydrolase (UA/mL) à 405 nm
Thrombine	0,410 ± 0,065	0,082 ± 0,01	0,765 ± 0,02
Venin	0,371 ± 0,07	0,069 ± 0,02	1,179 ± 0,013
CC3-SPase	0,409 ± 0,005	0,064 ± 0,017	1,182 ± 0,045
CCSV-MPase	0,288 ± 0,043	0,049 ± 0,003	0

(Résultats exprimés en moyenne ± S.D, n=5)

Les deux molécules (CC3-SPase et CCSV-MPase) présentent une activité caséinolytique comparable à celle du venin total et de la thrombine. Les résultats révèlent que seule la sérine-protéinase CC3-SPase est pourvue d'une activité arginine ester hydrolase alors que la métalloprotéinase CCSV-MPase en est dépourvue. Toutefois, les deux protéases montrent une forte activité amide-hydrolase similaire à celle du venin total.

La molécule CCSV-MPase semble être purifiée avec un rapport d'activité de 0,95 %. La CCSV-MPase 10 fois enrichie (protéines en poids) a révélé une activité spécifique de $34,40 \times 10^{-1}$ unités/mg/min. La molécule CCSV-MPase représente 1,22 % de l'activité protéolytique totale du venin et 0,13 % du poids du venin total (Tableau VII).

Tableau VII: Purification de l'activité protéolytique de CCSV-MPase à partir du venin de *Cerastes cerastes*.

Etapas de purification	Quantité de protéines (mg)	Taux de protéines (%)	Activité Spécifique (unités/mg/min) $\times 10^{-1}$	Activité Totale (unités)	Rapport d'Activité (%)	Facteur de purification
Venin total	1000	100	3,71	371	100	1
Chromatographie sur Sephadex G-75	81,35	8,135	16,05	130,6	35,20	4,326
Chromatographie sur DEAE-Cellulose A-50	21,18	2,118	27,99	59,30	15,98	7,54
Chromatographie d'affinité	1,308	0,130	34,40	4,5	0,95	9,27

Après purification de la sérine-protéinase CC3-SPase, un rapport d'activité de 1,34 % (protéines en poids) a été obtenu. L'activité spécifique est de 20,46 unités/mg/min (Tableau VIII). La molécule CC3-SPase, semble être 56 fois enrichie et représente 1,34 % de l'activité protéolytique totale du venin et 1,21 % du poids du venin total (Tableau VIII).

Tableau VIII: Purification de l'activité protéolytique de CC3-SPase à partir du venin de *Cerastes cerastes*

Étapes de purification	Quantité de protéines (mg)	Taux de protéines (%)	Activité Spécifique (unités/mg/min) $\times 10^{-1}$	Activité Totale (unités)	Rapport d'Activité (%)	Facteur de purification
Venin total	1000	100	3,71	371	100	1
Chromatographie sur Sephadex G-75	190,5	19,05	8,018	152,75	41,17	2,16
Chromatographie sur CM-Sephadex C-50	12,17	1,21	204,60	4,98	1,34	55,14

- Détermination de l'activité phospholipasique de CC2-PLA₂

L'activité phospholipasique de la CC2-PLA₂ ou du venin de *Cerastes cerastes* a été réalisée en utilisant comme substrat la lécithine. Les résultats obtenus montrent que l'activité phospholipasique de la molécule CC2-PLA₂ se traduit par l'apparition d'une hémolyse avec un taux d'hémoglobine élevé, mesuré en UA/mL (Tableau IX).

Tableau IX: Activité phospholipasique du venin comparée à celle de CC2-PLA₂

Activité phospholipasique	Venin	CC2-PLA ₂
Présence d'hémolyse	+++	++++++
Taux d'hémoglobine libérée (UA/mL) à 540 nm	1,03 ± 0,094	1,24 ± 0,054

(Résultat exprimé en moyenne ± SD, n=3)

Le taux d'hémoglobine libérée en présence de la molécule CC2-PLA₂ est supérieur à celui obtenu en présence du venin. Les PLA₂ présentes dans les venins de serpents libèrent l'acide gras en position 2 des phospholipides, en donnant des lysolécithines (1 acyl-glycerophosphorylcholine) capables d'induire une hémolyse. L'étude du venin de *Cerastes cerastes* a permis de purifier une PLA₂ acide douée d'un pouvoir hémolytique (Laraba-Djebari *et al.*, 1990). Plutard, deux autres PLA₂ ayant des poids moléculaires très voisins (isoformes) de 13,737 et de 13,705 kDa ont été isolées à partir du même venin. Ces deux PLA₂ sont douées d'une activité anti-agrégante et une activité anti-tumorale (Zouari-Kessentini *et al.*, 2009 et 2010). La molécule CC2-PLA₂ a montré un rapport d'activité de 0,06 % (protéines en poids) et une activité spécifique de 51,5 unités/mg/min (Tableau X). La molécule CC2-PLA₂ a été purifiée avec un facteur de 50. Elle représente 5,9 % de l'activité phospholipasique totale du venin et 0,118 % du poids du venin total (Tableau X).

Tableau X: Purification de l'activité phospholipasique de CC2-PLA₂ à partir du venin de *Cerastes cerastes*

Etapes de purification	Quantité de protéines (mg)	Taux de protéines (%)	Activité Spécifique (unités/mg/min) x 10 ⁻¹	Activité Totale (unités)	Rapport d'Activité (%)	Facteur de purification
Venin total	1000	100	10,30	1030	100	1
Chromatographie sur Sephadex G-75	81,35	8,135	16,67	83,35	8,10	8.092
Chromatographie sur DEAE-Cellulose A-50	1,18	0,118	515	60,77	0,060	50

III.2.1.2. Effets des inhibiteurs sur les activités enzymatiques des molécules

La caractérisation des protéinases purifiées a été effectuée en présence de différents inhibiteurs. Les activités caséinolytique, amide-hydrolase et arginine ester-hydrolase ont été testées en présence de l'anti-thrombine III, l'aprotinine, l'héparine, le PMSF, le 1,10 phénanthroline, l'EDTA et l'EGTA.

Les résultats obtenus ont montré que l'EDTA et le 1,10-phenanthroline induisent une inhibition quasi-totale sur l'activité protéolytique de la molécule CCSV-MPase, tandis que le PMSF, l'héparine, l'aprotinine et l'EGTA n'ont aucun effet. Celle-ci serait donc une métalloprotéinase zinc-dépendante suggérant que l'ion de Ca²⁺ n'est pas requis pour son activité catalytique (Figures 19 et 20). L'activité protéolytique de la molécule CC3-SPase a été totalement inhibée par le PMSF, l'anti-thrombine III, l'aprotinine, l'héparine et l'EGTA. Cette inhibition de l'activité protéolytique, amide-hydrolase et arginine ester-hydrolase par le PMSF (inhibiteur des serine protéases) permet de suggérer que CC3-SPase serait une serine-protéase de type thrombine ayant une activité Ca²⁺-dépendante, au vu de son inhibition par l'EGTA (Figures 19, 20 et 21). L'inhibition quasi-totale de l'activité protéolytique de la CC3-SPase par les inhibiteurs spécifiques de la thrombine (anti-thrombine III et héparine) montre que les sites catalytiques ne sont pas différents de ceux de la thrombine. Une étude faite sur afaâcytine a montré que l'ion Ca²⁺ est indispensable à l'activité non seulement en tant que cofacteur mais aussi pour la stabilité ou la cohésion structurale de la molécule enzymatique (Laraba-Djebari *et al.*, 1995).

III.2.2. Caractérisation biologique des molécules purifiées

III.2.2.1. Activités coagulante et fibrinogénolytique de CC3-SPase et CCSV-MPase

III.2.2.1.1. Activité coagulante

L'activité coagulante du venin de *Cerastes cerastes* et de CC3-SPase a été testée sur des plasmas humains citratés (Laraba-Djebari *et al.*, 1992). Cette activité a été réalisée en effectuant au préalable une courbe d'étalonnage de la thrombine avec en présence du

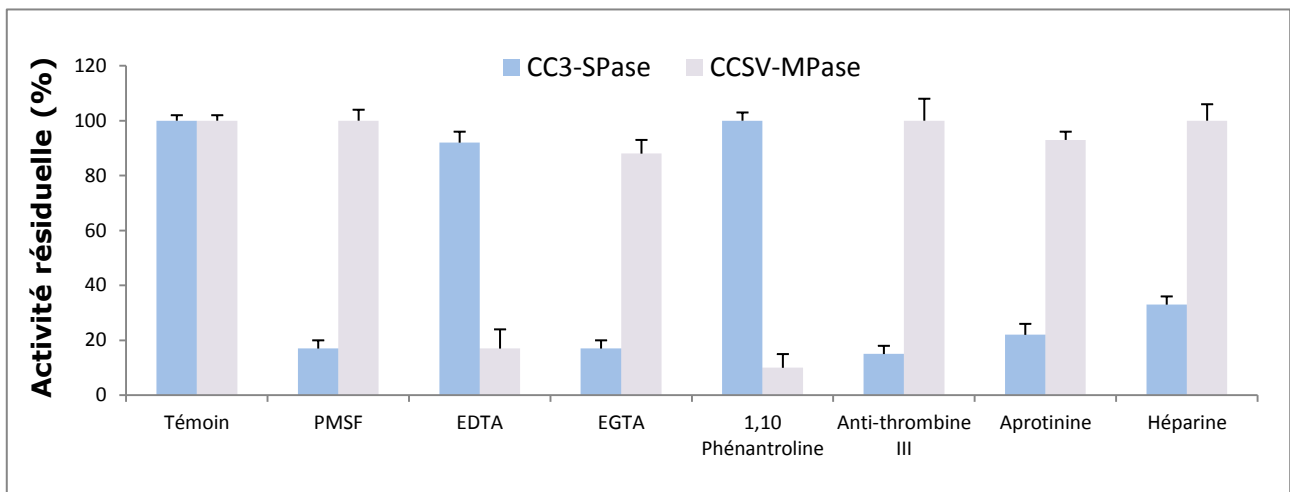


Figure 19 : Effect des inhibiteurs sur l'activité protéolytique de CC3-SPase et CCSV-MPase purifiées.

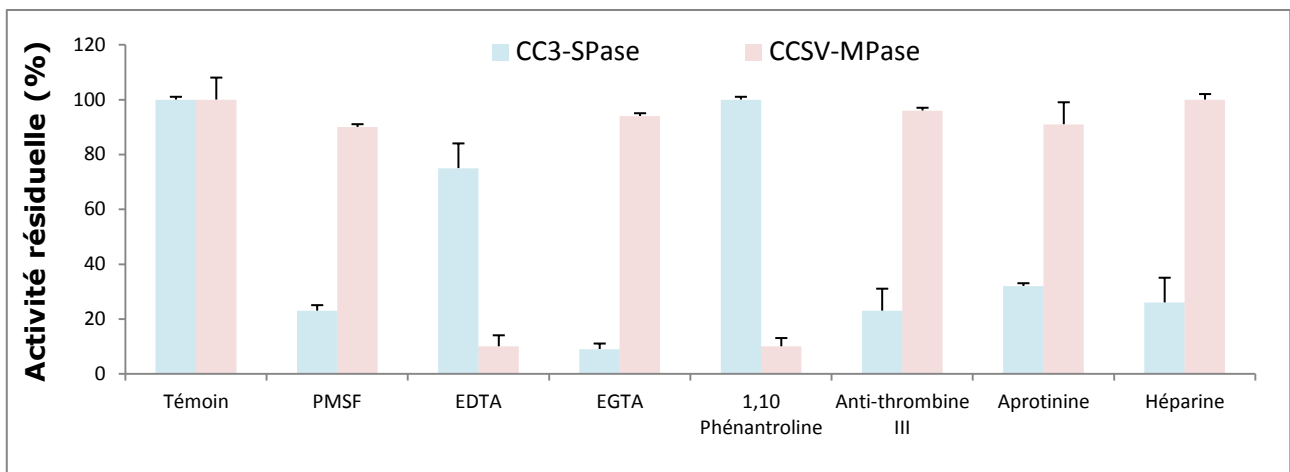


Figure 20: Effect des inhibiteurs sur l'activité amide-hydrolase de CC3-SPase et CCSV-MPase purifiées.

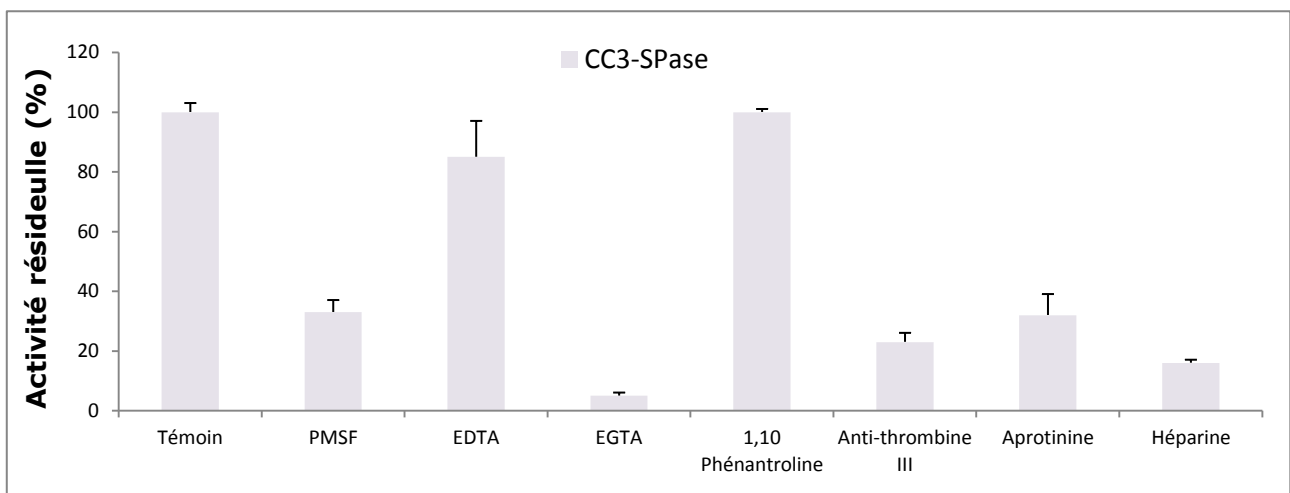


Figure 21: Effect des inhibiteurs sur l'activité arginine ester-hydrolase de CC3-SPase purifiée.

- Les enzymes ont été pré-incubées avec 5 mM d'EDTA, EGTA, PMSF, l'héparine, 1,10 phénantroline, l'antithrombine III ou l'aprotinine. Les activités enzymatiques ont été mesurées en utilisant la caséine, comme substrat, le Benzoyl Arginine-Ethyl-Ester (BAEE) et le N_ω-CBZ-L-Arginine-p-Nitroanilide Hydrochloride, comme substrats synthétiques. Les enzymes ont été pré-incubées avec 5 mM de chaque inhibiteur.

fibrinogène (Figure 22). Les résultats obtenus montrent alors que l'activité coagulante de la thrombine est inversement proportionnelle au temps de formation du caillot.

Le temps de coagulation est enregistré depuis l'addition de l'échantillon à tester (venin et CC3-SPase) jusqu'à la formation du caillot. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau XI.

L'incubation du fibrinogène en présence de la protéinase CC3-SPase (5 µg) a révélé une importante activité coagulante sur des plasmas humains (temps de coagulation de 13,63 ± 1 sec) comparé au venin (temps de coagulation de 28,31 ± 5 sec) et à thrombine. La formation du caillot par la biomolécule coagulante est accélérée de 8 secondes. Le caillot formé par la protéinase CC3-SPase semble être plus résistant pendant 24 heures, mais sensible à toute agitation suggérant ainsi que la protéinase CC3-SPase est dépourvue des propriétés d'activation du facteur XIII dont est dotée la thrombine.

Tableau XI: Temps de coagulation du venin et de la molécule coagulante CC3-SPase en présence de plasma humain normal.

	Temps (sec)	NIH/mL
Thrombine	21,73 ± 3	1,643
Venin	28,31 ± 5	1,261
CC3-SPase	13,63 ± 1	2,620

(Résultat exprimé en moyenne ± SD, n=5)

III.2.2.1.2. Activité fibrinogénolytique

Le fibrinogène est une glycoprotéine trimérique de 340 kDa constituée de trois chaînes polypeptidiques; $A\alpha$, $B\beta$ et γ qui sont reliées par des ponts disulfures. Il peut être clivé par la thrombine et donner lieu à des éléments de fibrine et des fibrinopeptides.

L'activité fibrinogénolytique du venin de *Cerastes cerastes* et de ses biomolécules purifiées (CC3-SPase et CCSV-MPase) est déterminée après analyse des produits de dégradation du fibrinogène par RP-HPLC et SDS-PAGE.

L'analyse électrophorétiques par SDS-PAGE du fibrinogène seul révèle la présence de trois bandes de poids moléculaires de 67 kDa, 50 kDa et 43 kDa correspondant respectivement aux poids moléculaires des trois chaînes $A\alpha$, $B\beta$ et γ du fibrinogène (Figure 23).

L'activité de la thrombine (témoin positif) sur le fibrinogène révèle la libération du fibrinopeptide A (FpA) suivi du fibrinopeptide B (FpB). Les mêmes résultats ont été obtenus après action du venin car il renferme plusieurs biomolécules α et/ou β fibrinogénolytique.

En présence du venin, les résultats obtenus montrent deux bandes de masse moléculaire (55 kDa et 50 kDa) révélant l'activité fibrinogénolytique des composants du venin (Figures 23).

L'action des molécules sur le fibrinogène révèle une activité β fibrinogénolytique pour la CCSV-MPase en raison de la libération uniquement du Fibrinopeptide B (Figure 24C) et une activité α β fibrinogénolytique pour la CC3-SPase en raison de la libération des deux fibrinopeptides A et B (Figure 24D).

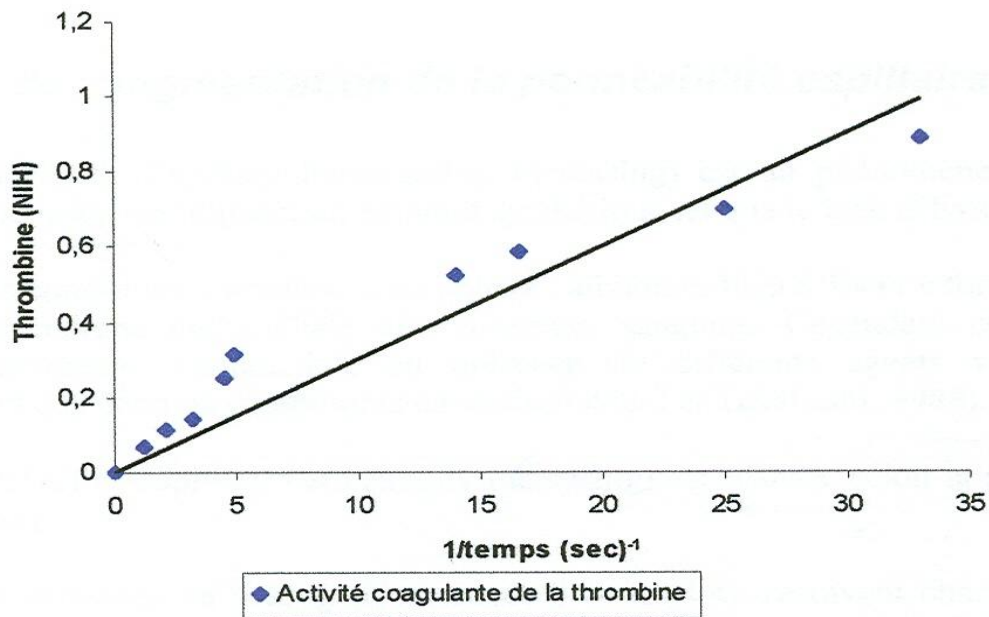


Figure 22 : Courbe standard de la dégradation du fibrinogène humain (0,3%) par la thrombine.

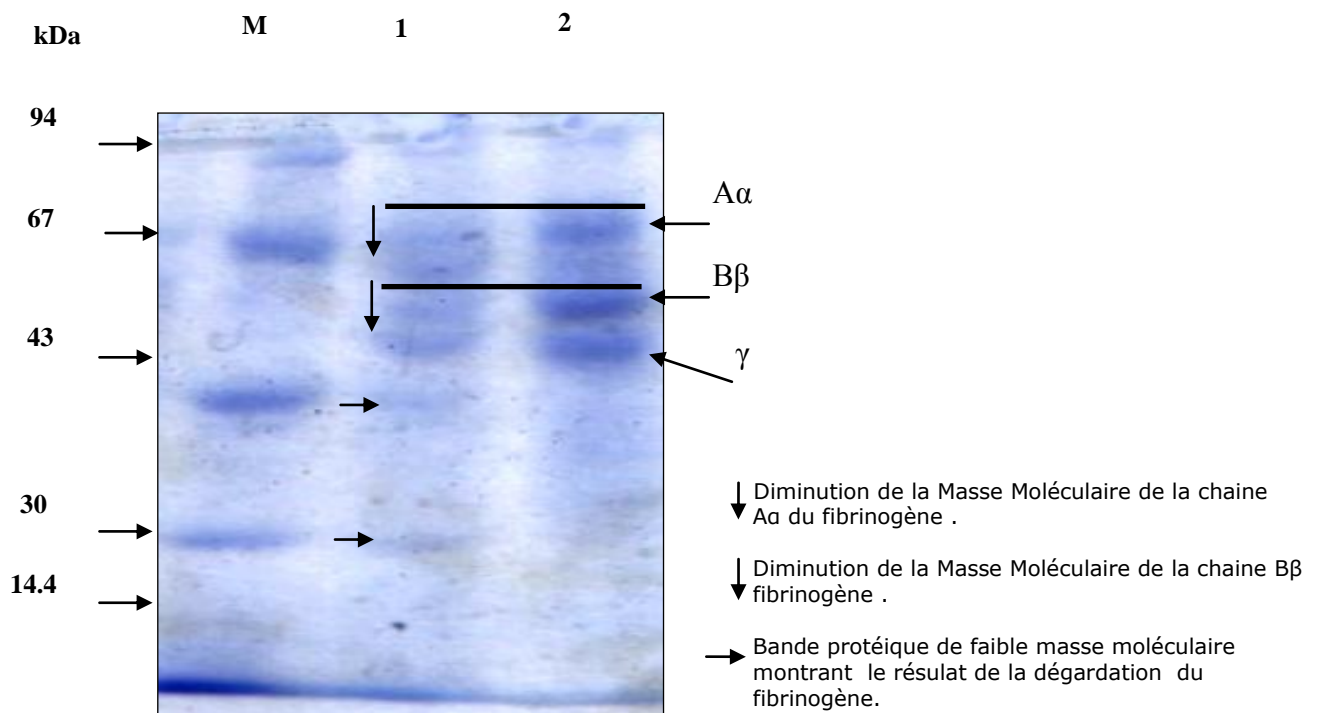


Figure 23: Profil électrophorétiques (SDS-PAGE 12%) de l'activité fibrinogénolytique du venin de *C.cerastes*. Fibrinogène (piste 2) incubé avec le venin de *C.cerastes* (piste 1) pour 10 min. (M) représente les protéines standards utilisées comme marqueurs de poids moléculaires (kDa) du bas vers le haut: phosphorylase b (94.0), bovine serum albumin (67.0), ovalbumin (43.0), carbonic anhydrase (30.0), and α -lactalbumin (14.4). Les bandes protéiques ont été colorées avec le bleu de Coomassie G250.

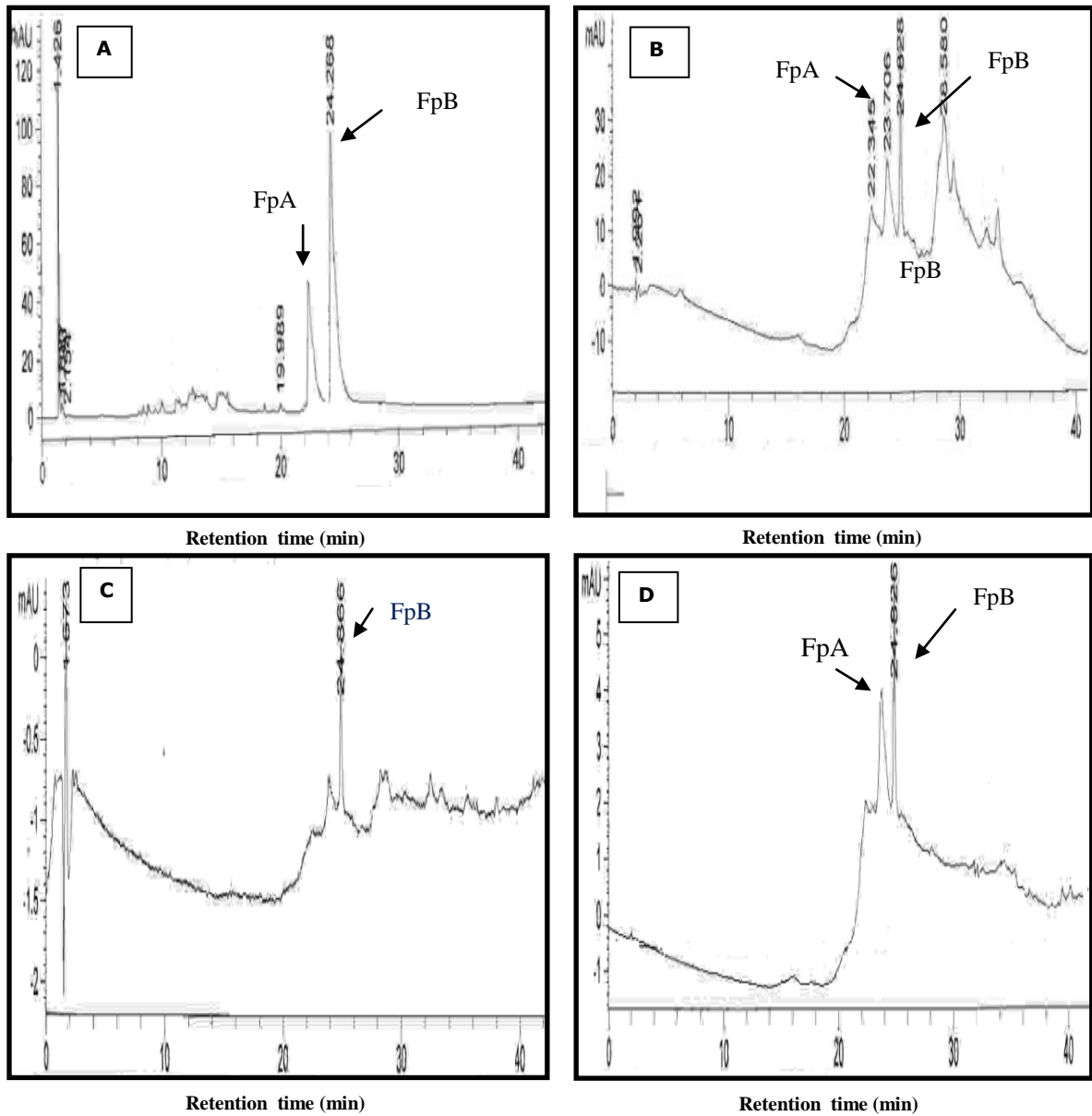


Figure 24: Profils chromatographiques de RP-HPLC des fibrinopeptides libérés à partir du fibrinogène humain après action des protéases purifiées du venin de *C.cerastes*. (A) fibrinogène humain + thrombine ; (B) fibrinogène humain + Venin. (C) fibrinogène + CCSV-MPase (D) fibrinogène + CC3-SPase. FpA : Fibrinopeptide A ; FpB : Fibrinopeptide B.

Les enzymes protéolytiques du venin de *Cerastes cerastes* ont été identifiées comme étant des α , β ou γ fibrinogénases. L'identification par SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide à 7,5 % des protéinases RP₃₄ et Afaâcytine purifiées à partir du même venin a permis de caractériser l'Afaâcytine comme étant une α β fibrinogénase et la protéinase RP₃₄ comme étant une α fibrinogénase (Laraba-Djebari *et al.*, 1992 et 1995).

La métalloprotéinase CCSV-MPase est capable de cliver seulement la chaîne B β du fibrinogène sans aucun effet sur les chaînes A α et γ . Cette molécule ne semble pas présenter les mêmes propriétés que les autres SVMPs qui hydrolysent préférentiellement la chaîne A α . Ces molécules de faible masse moléculaire appartiennent à la classe PI des SVMPs, constituées uniquement de domaine métalloprotéinase comme le cas de la lebetase purifiée à partir du venin de *Vipera lebetina*, de la fibrolase du venin d'*Akgistrodon c. contortrix*, de la neuwiedase du venin de *Bothrops neuwiedi*, de l'atroxase de *Crotalus atrox*, la piscivorase II du venin d'*Akgistrodon piscivorus piscivorus* et de la leucurolysin du venin de *Bothrops leucurus* (Retzios *et al.*, 1994; Hahn *et al.*, 1995; Siigur *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2004; Bello *et al.*, 2006).

III.2.2.1.3. Détermination de l'activité coagulante de la serine protéinase CC3-SPase en présence de plasmas humains déficients en facteurs de coagulation

L'activité coagulante de CC3-SPase présentant une activité coagulante, a été également testée sur des plasmas humains déficients en facteurs de coagulation (plasmas déficients en facteur II, en facteur VII à 5% et à 29%), utilisant la thrombine comme facteur de référence.

Le venin de *Cerastes cerastes* ou la molécule CC3-SPase ont été incubés en présence d'un plasma humain normal ou de plasmas humains déficients en certains facteurs.

Le venin semble être sans effet sur le temps de coagulation des facteurs plasmatiques, alors que CC3-SPase permet de raccourcir le temps de coagulation des plasmas humains déficients en facteur II et VII. Cependant le caillot reste fragile par rapport à celui formé avec le plasma normal (Tableau XII).

Tableau XII: Temps de coagulation de CC3-SPase avec des plasmas humains déficients en certains facteurs de coagulation

Plasmas	Temps de référence (sec) ^a	Temps avec le venin (sec) ^a	Temps avec CC3-SPase	Temps ratio CC3-SPase/ref (%)
Normal	15	5	13,63 ± 1 ^b	90,8 (-) ^d
Déficient en facteur II	83	80	13,82 ± 0,58 ^b	16,65 (-)
Déficient en facteur VII à 5%	53	63	25,53 ± 0,86 ^c	48,1 (-)
Déficient en facteur VII à 29%	53	63	25,63 ± 0,78 ^{c*}	48,3 (-)

^a Résultats de Laraba-Djebari *et al.*, 1995.

^b Résultats obtenu avec deux mesures.

^c Résultats exprimés en moyenne ± SD (n=3), ^d (-), temps de coagulation raccourci, * Caillot très fragile.

Les temps de coagulation du plasma normal diminuent significativement en présence du venin (5 secondes) et la CC3-SPase (13,63 secondes). Le temps de coagulation du plasma déficient en facteur II apparaît similaire à celui obtenu avec le plasma normal suite à l'action de la serine protéase CC3-SPase. Ces résultats montrent que cette molécule pourrait se substituer au facteur IIa et au facteur VII, ce qui laisse suggérer l'implication de CC3-SPase dans le processus de coagulation sanguine via l'activation de la voie extrinsèque.

- Détermination de l'activité coagulante de CC3-SPase en présence de différents inhibiteurs de protéases

L'inhibition de l'activité coagulante de la molécule coagulante CC3-SPase a été testée en présence d'inhibiteurs des protéases. L'incubation de CC3-SPase avec les différents inhibiteurs après 1 heure et 30 minutes montre que l'activité coagulante est totalement inhibée par les chélateurs tels que l'EDTA et l'EGTA, le 1,10 phénantroline (chélateur de l'ion de zinc) ne semble présenter aucun effet sur cette activité. Ces résultats suggèrent le rôle de l'ion de calcium dans l'activité enzymatique et coagulante de la CC3-SPase (Tableau XIII). Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus pour l'afabactine qui requiert le calcium pour son activité non seulement en tant que cofacteur mais aussi dans la stabilité et la cohésion structurale de la molécule (Laraba-Djebari *et al.*, 1995).

Tableau XIII: Temps de coagulation de CC3-SPase en présence d'inhibiteurs

	Temps de coagulation (Sec)	Pourcentage d'inhibition (%)
CC3-SPase seule	13,63 ± 1	-----
+ anti-thrombine III	85 ± 1,24	83,96
+ PMSF	87 ± 3	90
+ aprotinine	70 ± 1,77	80,96
+ Héparine	92 ± 2,23	95
+ EDTA	Plus de 24 h ^a	100
+ EGTA	Plus de 24 h ^a	100
+1,10 phénantroline	15 ± 2	0

(Résultats exprimés en moyenne ± SD, n=3), ^a Plasma incoagulable

II.2.2.1.3. Test de l'activité hémorragique de la molécule CCSV-MPase

Le venin de *Cerastes cerastes* présente une forte activité hémorragique dose-réponse avec une dose minimale hémorragique (DMH) de l'ordre de 3,2 µg/20g de souris (Chérifi, 2004; Oussedik-Oumehdi et Laraba-Djebari, 2007). Plusieurs composants du venin sont impliqués dans l'activité hémorragique. Cette activité peut être le résultat de l'action des métalloprotéinases hémorragiques, des molécules anti-agrégantes des plaquettes sanguines et des molécules fibrinolytiques. La CCSV-MPase, bien qu'elle soit douée d'activité

métalloprotéinasiqne, elle ne semble cependant présenter aucune activité hémorragique même à forte dose (Chérifi *et al.*, 2010) (Figure 25 et Tableau XIV)..

Tableau XIV: Détermination de l'activité hémorragique après injection s.c. du venin ou CCSV- MPase

Echantillon	Témoïn	Venin		CCSV-MPase	
		50 µg	100 µg	50 µg	100 µg
Diamètre du spot (cm)	0	1,2 ± 0,3	6 ± 1,1	0	0

(Résultats exprimés en moyenne ± SD, n = 5)

III.2.2.1.4. Activités agrégante et anti-agrégante de CC3-SPase et CC2-PLA₂

L'effet du venin de *C.cerastes*, de ses deux molécules CC3-SPase et CC2-PLA₂ sur la fonction des plaquettes est évalué en utilisant des plaquettes humaines préparées à partir de sang de deux donneurs différents. Des agonistes plaquettaïres ont été utilisés comme témoins (thrombine, ADP et acide arachidonique). L'action anti-agrégante de CC2-PLA₂ a été évaluée après induction de l'agrégation avec l'ADP.

Les résultats obtenus montrent que la protéinase CC2-SPase est capable d'induire l'agrégation des plaquettes même en faible quantité (10 µg). Une agrégation totale est observée et comparée à celle de la thrombine (Figure 26).

La CC2-PLA₂ révèle un pouvoir anti-agrégant sur les plaquettes humaines. Une réduction significative de l'agrégation (95 à 100%) est observée en présence de CC2-PLA₂. Cet effet antagoniste à la CC3-SPase, présente un intérêt biologique et pharmacologique car cette action anti-agrégante pourrait être un outil dans les cas de la réduction de la viscosité du sang. Cette réduction est souvent nécessaire dans le traitement des maladies thrombotiques.

Des résultats similaires ont été rapportés avec une phospholipase A₂ purifiée à partir du même venin de *Cerastes cerastes* (Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1992), cette PLA₂ n'a montré aucun effect sur l'agrégation plaquettaire. Une autre étude a montré qu'Afaâcÿtine (autre serine-protéase purifiée à partir du même venin) était capable d'induire une agrégation irréversible des plaquettes humaines, mais sans aucun effect sur les plaquettes du lapin pour le venin et l'afaâcÿtine (Laraba-Djebari *et al.*, 1995; Laraba-Djebari, 1996).

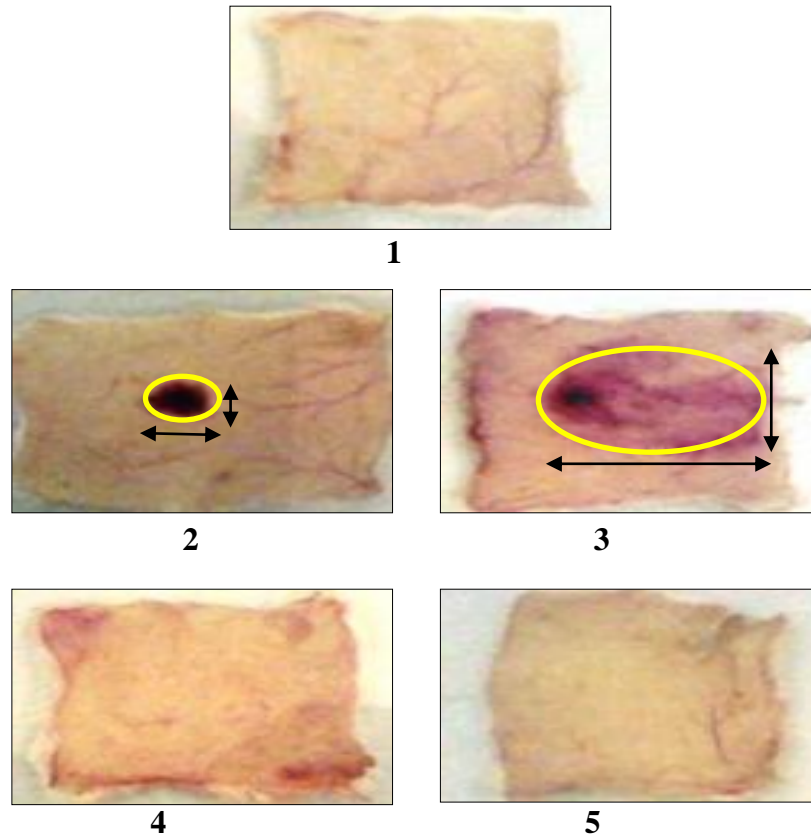
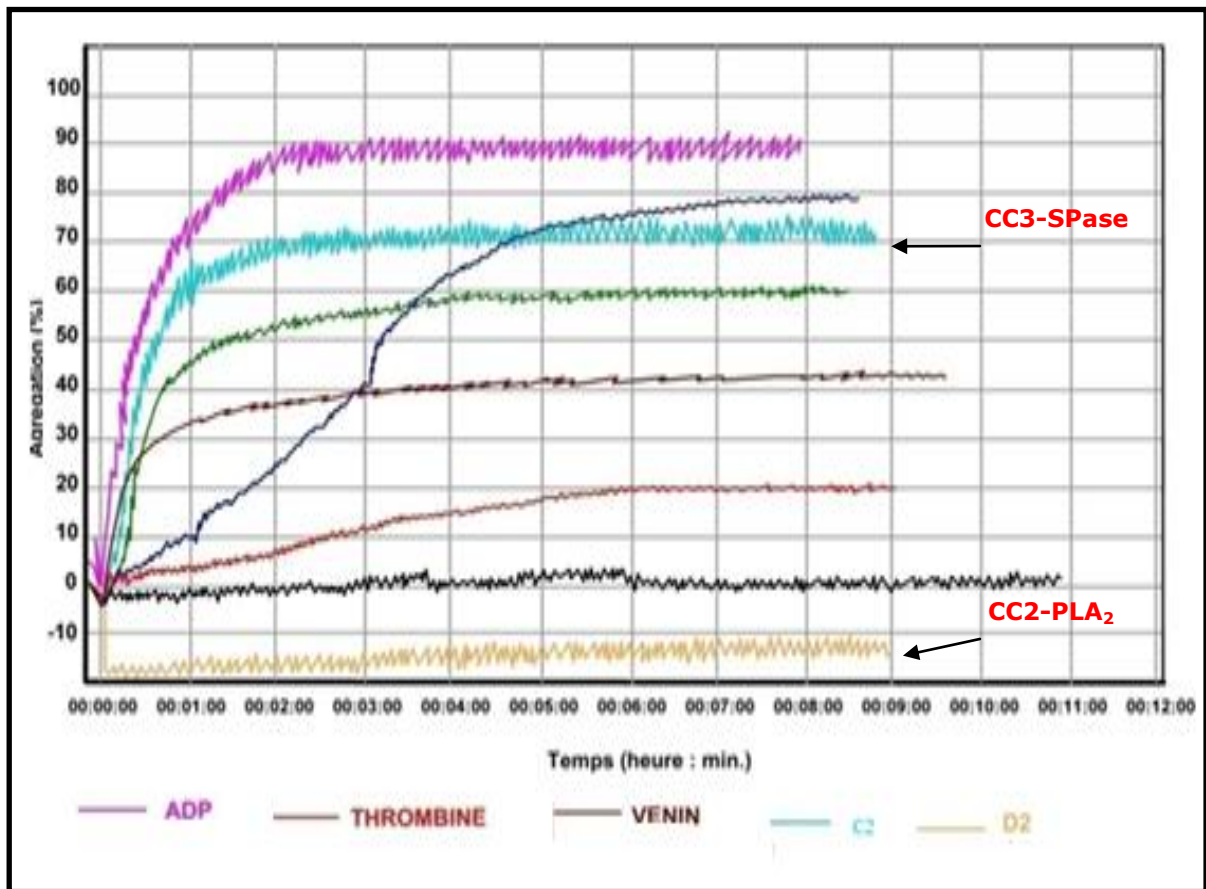


Figure 25: Détermination de l'activité hémorragique du venin de *C.cerastes* ou la métalloprotéinase CCSV-MPase après injection par voie s.c.

- Les échantillons (venin et CCSV-MPase) ont été injectés par voie sous-cutanée au niveau de la peau dorsale de souris (18 ± 2 g). **1.** Solution physiologique saline, **2** et **3.** venin (50 µg et 100 µg, respectivement), **4** et **5.** CCSV-MPase (50 µg et 100 µg, respectivement).



C2 : CC3-SPase, D2 : CC2-PLA₂

Figure 26: Effet de CC3-SPase et CC2-PLA₂ purifiées sur l'agrégation des plaquettes humaines.

- Les plaquettes sont préparées à partir de sang de deux donneurs différents, des quantités de 10 µg du venin et de chaque molécule sont ajoutées. L'ADP et la thrombine ont été utilisés comme agonistes plaquettaire.

III.2.2. Analyses MS et MS/MS par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF/TOF couplée à la chromatographie liquide de type off-line

Les trois échantillons protéiques (CC3-SPase, CCSV-MPase et CC2-PLA₂) ont été soumis à une analyse protéomique après hydrolyse avec deux endoprotéases (la lysine C endopeptidase et la trypsine). Les peptides obtenus ont été ensuite séparés sur une colonne (C18, 75 µm x15 cm) utilisant une nano-RP HPLC. Les éluâts sont collectés sur une plaque porte échantillon par un robot (Probot) qui est ensuite introduite dans un spectromètre de masse de type MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization).

L'acquisition des données en MS puis en MS/MS à partir des peptides séparés est obtenue par un spectromètre de masse de type MALDI. Dans cette étude, 312 fractions ont été collectées et analysées par le spectromètre de masse de type MALDI-TOF/TOF pour les trois molécules (Figure 27).

Les données obtenues par spectrométrie de masse sont utilisées pour identifier les trois molécules. Le manque de banques spécifiques aux protéines de serpents, nous a amené à utiliser une banque généraliste de protéines référenciant un grand nombre de protéines NCBI (7 135 739 entrées). Cette banque de protéines a été utilisée avec le logiciel MASCOT utilisé selon les critères usuels.

Une recherche sur la banque de données est effectuée sur les trois molécules. Ces protéines ont été validées à l'aide d'une suite d'algorithmes (PeptideProphet et ProteinProphet) rassemblés dans le logiciel SCAFFOLD. Les résultats obtenus pour les molécules CCSV-MPase et CC2-PLA₂ sont rapportés aux tableaux XV et XVI.

Tableau XV: Certaines protéines identifiées par homologie de séquences avec LC-MALDI MS/MS à la métalloprotéinase CCSV-MPase.

Nom de Protéine	Accession number	Espèces	Masse Moléculaire (kDa)	Nombre de Peptides communs	Indice de confiance Scaffold
Group III snake venom metalloproteinase	gi 83523642	<i>Echis ocellatus</i>	69714	3	100
Zinc metalloproteinase-disintegrin brevilysin-H6 precursor	gi 190358877	<i>Gloydus blomhoffi brevicaudus</i>	68199	2	99.8
Zinc metalloproteinase-disintegrin berythracivase precursor	gi 82216043	<i>Bothops erythmelas</i>	68513	3	100
Disintegrin CV-11-beta	gi 123913579	<i>Cerastes vipera</i>	7000	3	100

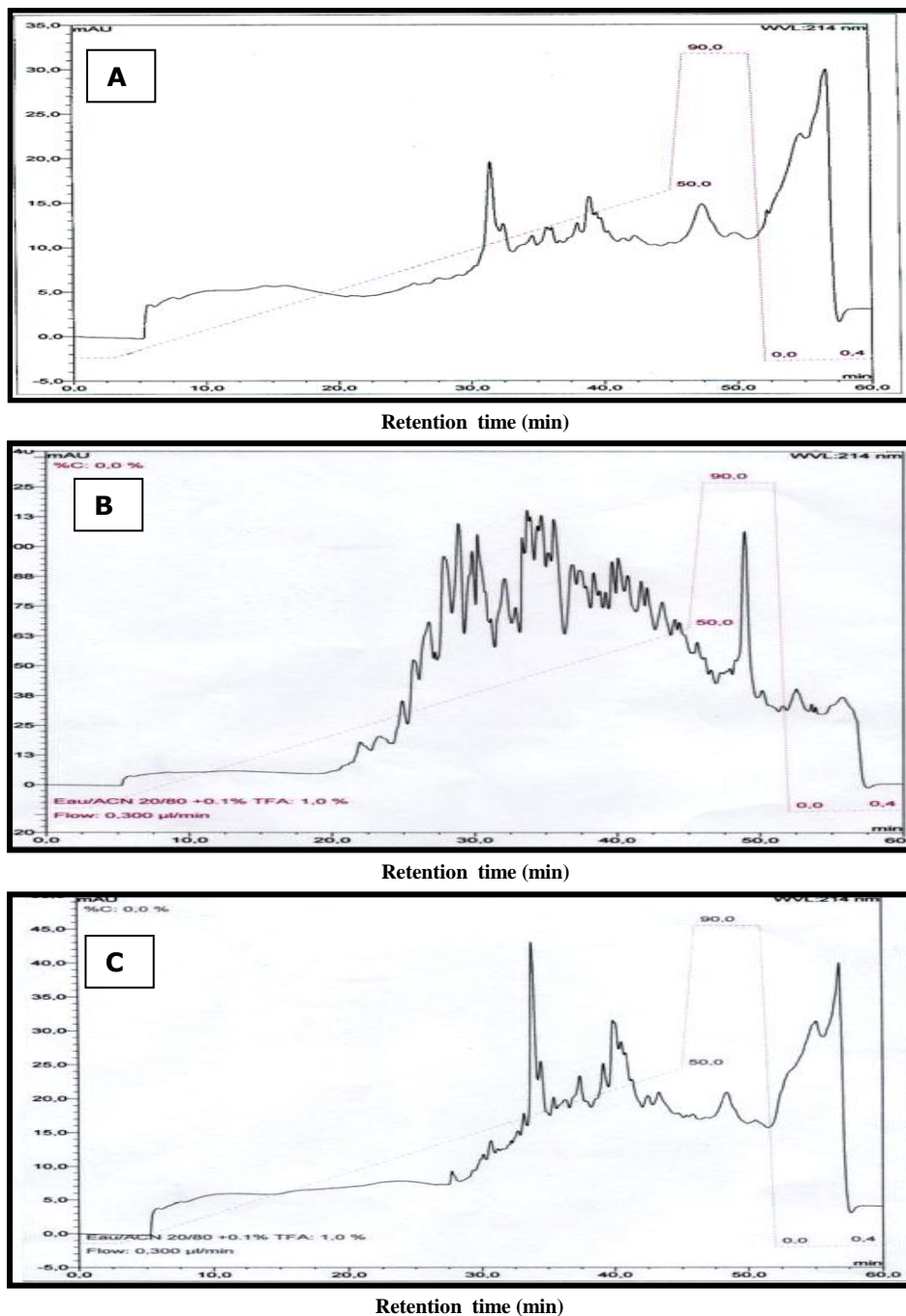


Figure 27: Profils chromatographiques de nano-RP-HPLC obtenus après digestion de CCSV MPase (A), CC3-SPase (B) et CC2-PLA₂ (C).

- Une colonne C18 PepMap (15 cm x 75µm x 3µm, 100 Å) (Dionex LC-Emballages, Sunnyvale, CA, USA) a été utilisée pour la séparation des peptides et la chromatographie a été réalisée à 40° C en combinaison avec un pré-colonne (PepMap C18, 5 mm x 300 µm x 5 microns, 100 Å)(Dionex LC-Emballages, Sunnyvale, CA, USA) pour éliminer les sels. Après une période de 5 min de lavage, la séparation des peptides a été réalisée avec un gradient linéaire de solvant B (0 à 50 % B) pendant 45 min, suivie par une étape de lavage de 5 min à 95 % du solvant B.

La métalloprotéinase CCSV-MPase de masse moléculaire estimée à 70 kDa présente une homologie de séquence avec au moins 4 métalloprotéinases déjà purifiées à partir d'autres venins de serpents (Tableau XVI). La phospholipase A₂ (CC2-PLA₂) de masse moléculaire de 14 kDa présente 50% d'homologie de séquence avec celle déjà purifiée à partir du même venin (*Cerastes cerastes*) par Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire en 1990.

Tableau XVI: Certaines protéines identifiées par homologie de séquences avec LC-MALDI MS/MS à la phospholipase CC2-PLA₂.

Nom de Protéine	Accession Number	Espèces	Masse Moléculaire (kDa)	Nombre de Peptides communs	Indice de confiance Scaffold
ammodytin I2 (A)	gi 50874464	<i>Vipera b. berus</i>	14	3	100
ammodytin I2 (A) isoform	gi 50874456	<i>Vipera a. ruffoi</i>	13.5	2	99.8
phospholipase A2	gi 6967298	<i>Vipera ammodytes</i>	13.5	3	100
ammodytin I2(C) isoform	gi 50874498	<i>Vipera ammodytes meridionalis</i>	13.7	3	100

L'analyse protéomique par MALDI-TOF MS/MS de CCSV-MPase a permis aussi la détermination d'une séquence partielle de la métalloprotéinase CCSV-MPase. Les résultats obtenus montrent que CCSV-MPase présente 15 résidus d'acides aminés en commun avec une autre métalloprotéinase du groupe III isolée à partir du venin de *Echis ocellus* et 39 résidus d'acides aminés avec la Zn²⁺-métalloprotéinase appelée berythraactivase purifiée à partir du venin de *Bothrops erythromelas*. La molécule CCSV-MPase pourrait être affiliée à la classe P-III des SVMPs avec trois domaines: un domaine métalloprotéinase, un domaine disintegrin-like et un domaine riche en cystéine au vu de sa séquence en acides aminés et sa masse moléculaire.

La caractérisation protéomique de la CC2-PLA₂ réduite et alkylée par LC-MALDI-MS/MS a été effectuée après une double digestion de la molécule par la Lysine-C endopeptidase et la trypsine, permettant d'obtenir 1207 spectres MS/MS. Les analyses LC/MS et MS/MS des peptides de la PLA₂ purifiée a permis d'identifier une vingtaine de PLA₂ isolées à partir de plusieurs venins présentant des homologies de séquences entre elles (Tableau XVI). Parmi ces molécules il y a l'ammodytin I2(A) [*Vipera berus berus*] (gi|50874464|), la phospholipase A₂ [*Vipera ammodytes*] (gi|6967298|) l'ammodytin I2(A) isoform [*Vipera ammodytes ruffoi*] (gi|50874456|) et l'ammodytin I2(C) isoform [*Vipera ammodytes meridionalis*](gi|50874498|).

La PLA₂ purifiée dans cette étude semble être une nouvelle molécule et ne présente que 51 % d'homologie de séquence avec la Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase déjà purifiée à partir du même venin *Cerastes cerastes* (gi|129506|), soit 61/120 résidus d'acides aminés communs entre les deux PLA₂ (Figure 28).

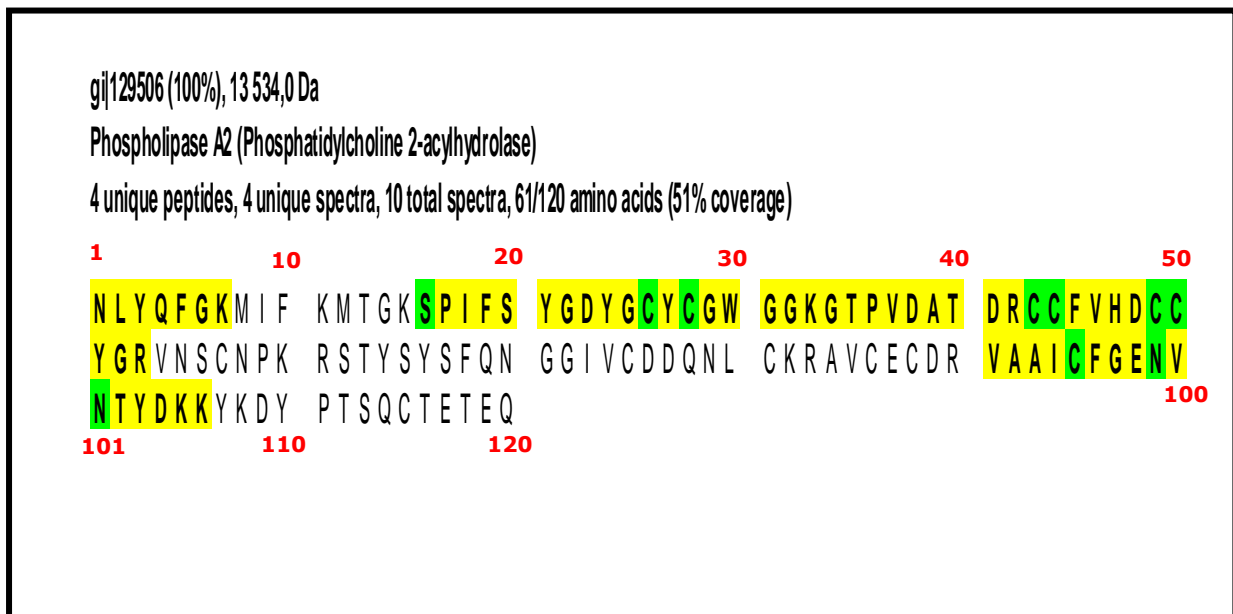


Figure 28 : Séquence partielle de la CC3-PLA₂ déduite à partir de la PLA₂ déjà purifiée du même venin.

- La séquence complète en acides aminés (1-120) représente la phospholipase A₂ déjà purifiée par Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire en 1990.
- Les résidus d'acides aminés communs entre cette PLA₂ (Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire, 1990) et la nouvelle phospholipase A2 (CC2-PLA2) sont en couleur jaune, il s'agit d'une séquence partielle de 61 résidus d'acides aminés soit 51% d'homologie de séquence entre les deux phospholipases.
- Les acides aminés en couleur verte sont les acides aminés qui ont subi des modifications chimiques lors des différents traitements nécessaires pour l'analyse protéomique.

III.3. Effets inflammatoires et métaboliques induits par les molécules purifiées

Le tableau clinique de l'envenimation vipérine se caractérise par divers effets pathophysiologiques allant du site de la morsure jusqu'aux organes vitaux de l'organisme. La composition complexe du venin traduit cette diversité d'effets. Cette partie de travail, a pour but d'abord de mettre en évidence les effets inflammatoires et métaboliques induits par le venin total de *Cerastes cerastes* et puis ensuite d'examiner l'effet des molécules purifiées sur la réponse inflammatoire et le métabolisme.

III.3.1. Effets inflammatoires induits par le venin et les molécules purifiées

III.3.1.1. Identification des cellules inflammatoires au niveau du liquide péritonéale et du sang périphérique après action du venin et les molécules purifiées

c- Inflammation observée au niveau du sang périphérique

La détermination du dénombrement cellulaire au niveau du sang périphérique prélevé à partir de animaux envenimés par voie i.p. avec une dose sub létale de venin de *Cerastes cerastes* (1 mg/Kg de masse corporelle de l'animal) révèle une hyperleucocytose constituée de lymphocytes, monocytes et polynucléaires neutrophiles. Cette hyperleucocytose est observée selon une cinétique (Figure 29A). En effet, le taux des leucocytes totaux passe de $5,6 \times 10^3$ cellules/ μL à 7×10^3 cellules/ μL entre 3 h et 48 h d'envenimation comparé à ceux des animaux témoins ($3,7 \times 10^3$ cellules/ μL). Ces taux augmentent progressivement entre 6 h et 24 h d'envenimation et sont respectivement de $6,2$ et $6,6 \times 10^3$ cellules/ μL . Cette augmentation des leucocytes semble être la conséquence de l'action des cytokines pro-inflammatoires principalement le $\text{TNF}\alpha$ et l'IL-6 ainsi que l'anaphylatoxine C3a générée après activation du complément sur la moelle osseuse (Espinosa, 2006).

Les résultats obtenus montrent également une diminution du nombre des polynucléaires éosinophiles et basophiles après 6 h d'envenimation. Cette diminution est due probablement à la migration de ces cellules du sang vers les compartiments tissulaires notamment les poumons. Ces résultats sont en accord avec ceux déjà obtenus et qui ont montré que le tissu pulmonaire est considérablement altéré par les constituants du venin avec une présence massive des polynucléaires éosinophiles (Chérifi, 2004; Chérifi et Laraba-Djebari, 2005 et 2008). Les molécules CCSV-MPase, CC3SPase ou CC2-PLA₂, injectées seules à l'animal, induisent également une augmentation des leucocytes totaux particulièrement, les lymphocytes, les monocytes et les polynucléaires neutrophiles (Figure 29B et Tableau XVII). Ces résultats indiquent que les molécules CC3-SPase et CC2-PLA₂ sont impliquées dans l'induction de l'inflammation avec une hyperleucocytose de 7 et $5,2 \times 10^3$ cellule/ μL respectivement, par rapport à celle observée avec le venin total ($6,2 \times 10^3$ cellule/ μL). La molécule CCSV-MPase semble ne pas induire une inflammation, le taux de leucocytes de $3,12 \times 10^3$ cellule/ μL est comparable à celui du témoin ($3,7 \times 10^3$ cellule/ μL). Il en est de même pour le taux des polynucléaires neutrophiles (399 ± 25 cellule/ μL) comparé à celui des animaux témoins (382 ± 35 cellule/ μL).

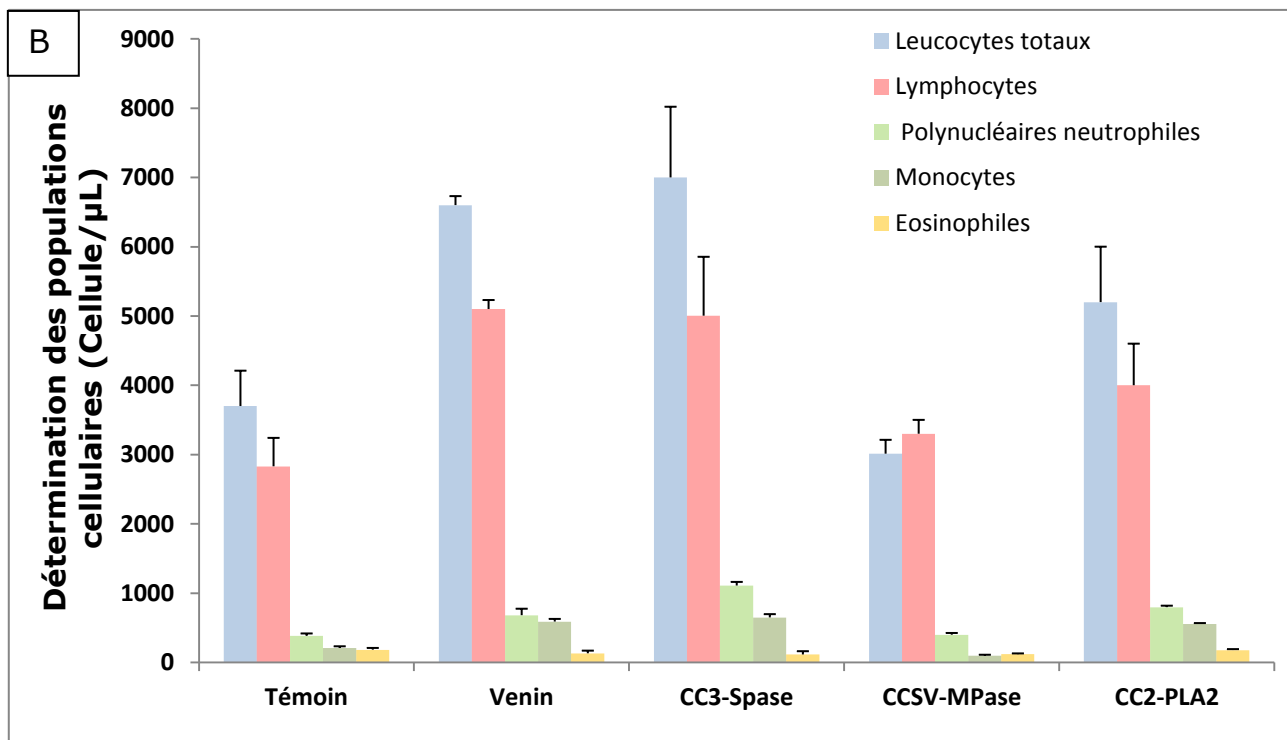
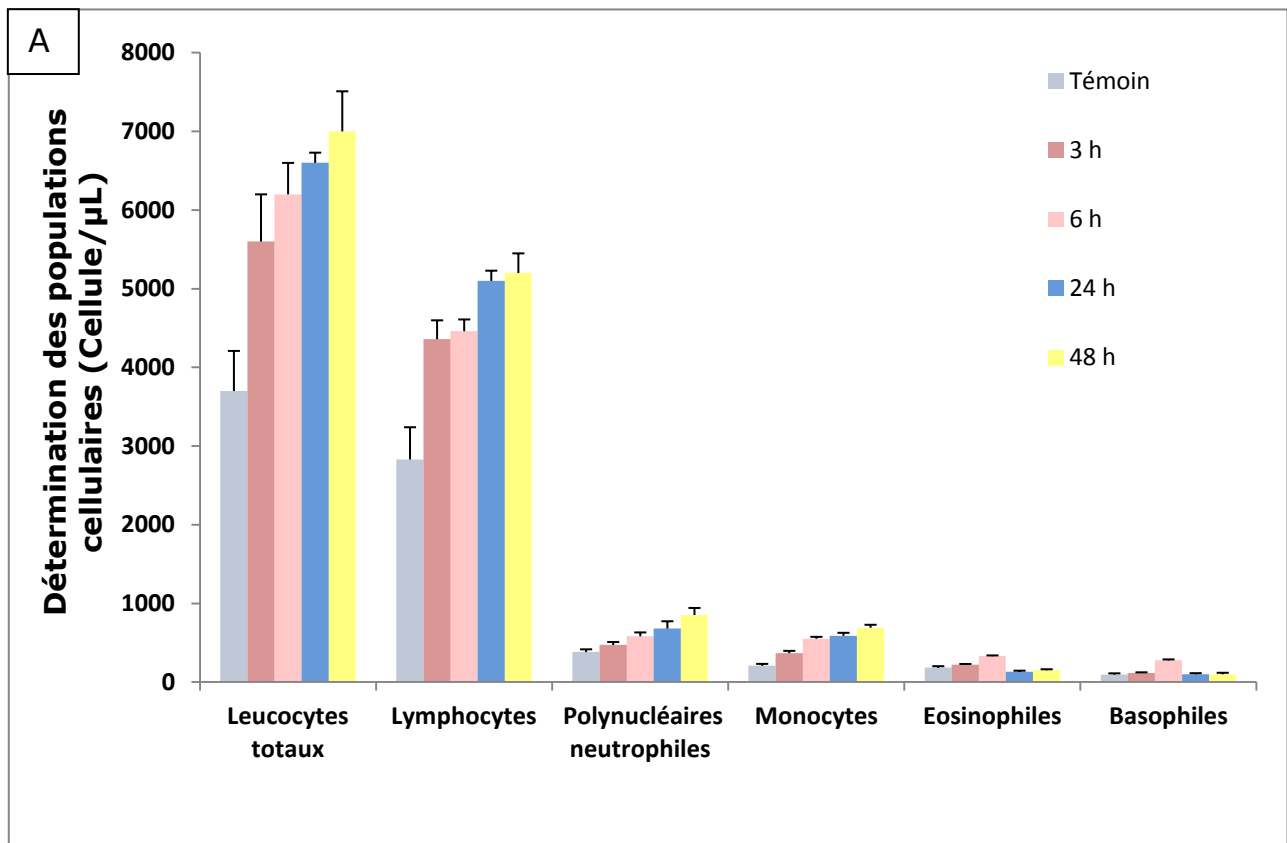


Figure 29: Identification des cellules inflammatoires au niveau du sang périphérique 24 h après injection du venin (A) ou de ses molécules (B) par voie i.p. La dose administrée est égale à 1 mg/kg de poids corporel de l'animal.

- Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, n=3.

Tableau XVII: Identification des populations cellulaires au niveau du sang de rats, 24 h après injection du venin ou de ses molécules purifiées.

Population cellulaire	Témoïn	Venin	CC3-SPase	CCSV-MPase	CC2-PLA ₂
Leucocytes totaux (x10 ³ /μL)	3,7 ± 0,51	6,6 ± 0,13	7 ± 1,02	3,12 ± 0,2	5,2 ± 0,8
Polynucléaires neutrophiles	382 ± 35	681 ± 93	1109 ± 52	399 ± 25	797 ± 21
Monocytes	207 ± 25	589 ± 38	649 ± 47	213 ± 10	554 ± 13

(Résultats exprimés en moyenne ± SD, n = 3)

d- Inflammation observée au niveau du liquide péritonéal

Le liquide péritonéal prélevé à partir des animaux envenimés par voie i.p. avec une dose sublétales du venin, montre une augmentation importante du nombre de leucocytes totaux (23,4 x 10⁶ cellules/μL) après 3 h suite à l'injection du venin. Ces résultats suggèrent une infiltration des leucocytes sous l'action des chimiokines suite à l'envenimation. Ce nombre de leucocytes diminue progressivement après 6 h. Cette augmentation des leucocytes est observée au niveau du sang périphérique, suite à une distribution du venin dans les différents compartiments vasculaires et tissulaires et la migration cellulaire vers le milieu vasculaire (Figure 30A).

Un taux de leucocytes totaux élevé est observé après 24 h lorsque les animaux sont traités avec la même dose des molécules (CC3-SPase, CCSV-MPase et CC2-PLA₂) injectée par voie i.p. . Cependant, cette augmentation demeure faible comparativement à celle induite par le venin (Figure 30B). Ces résultats observés au niveau du liquide péritonéal confirment le caractère non inflammatoire pour la métalloprotéïnase CCSV-MPase. Des résultats quasi similaires ont été obtenus lors d'une envenimation avec le venin de *Bothropos jararaca* et *Bothropos asper* (Zamunér *et al.*, 1998).

III.3.1.2. Effets du venin et des molécules purifiées sur la libération de quelques marqueurs de l'inflammation

III.3.1.2.1. Détermination de l'activité de la peroxydase éosinophilique

La peroxydase des éosinophiles est un marqueur de l'inflammation, son évaluation permet de déterminer l'effet de l'envenimation sur la cascade de l'inflammation induite par le venin de *Cerastes cerastes* ou par les trois biomolécules purifiées.

L'envenimation expérimentale des animaux avec une dose sublétales de venin de *Cerastes cerastes* révèle une activité enzymatique maximale à 3 h et à 24 h (Figure 31A).

Les animaux traités avec les molécules purifiées (1 mg/kg de poids de l'animal) et sacrifiés après 3 h et 24 h présentent des taux variables de l'activité enzymatique de l'EPO (Figure 31B).

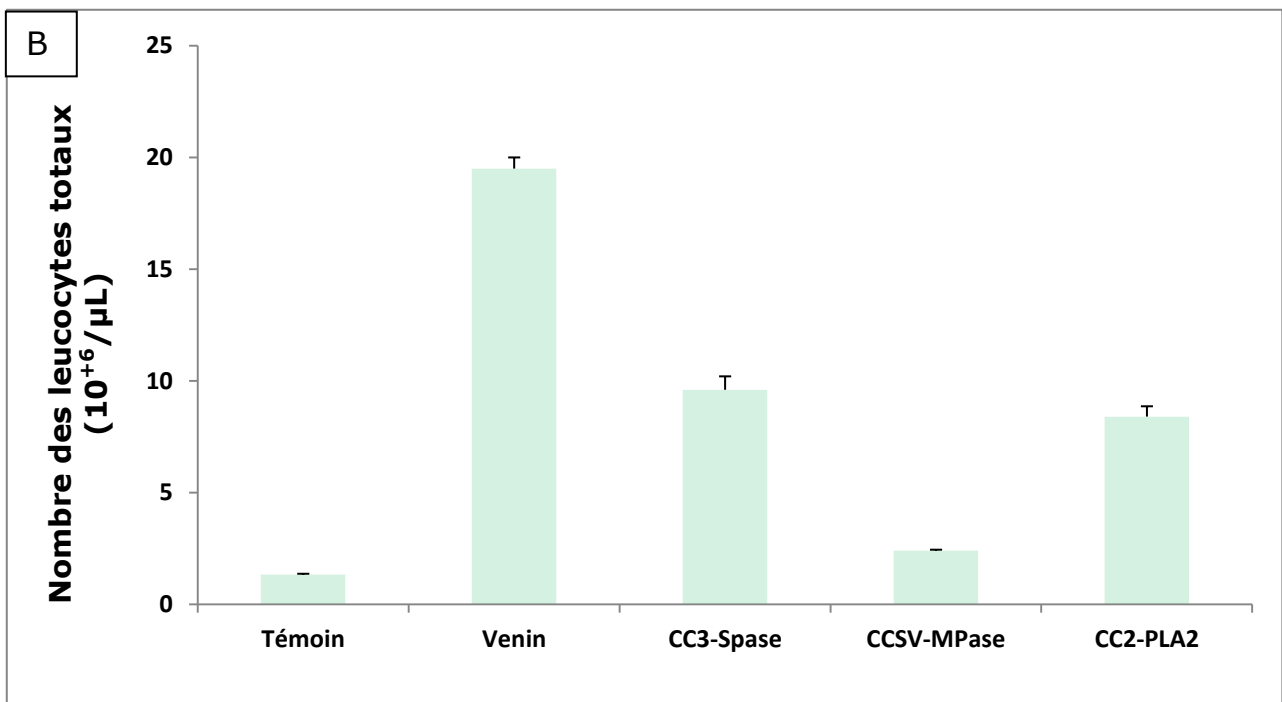
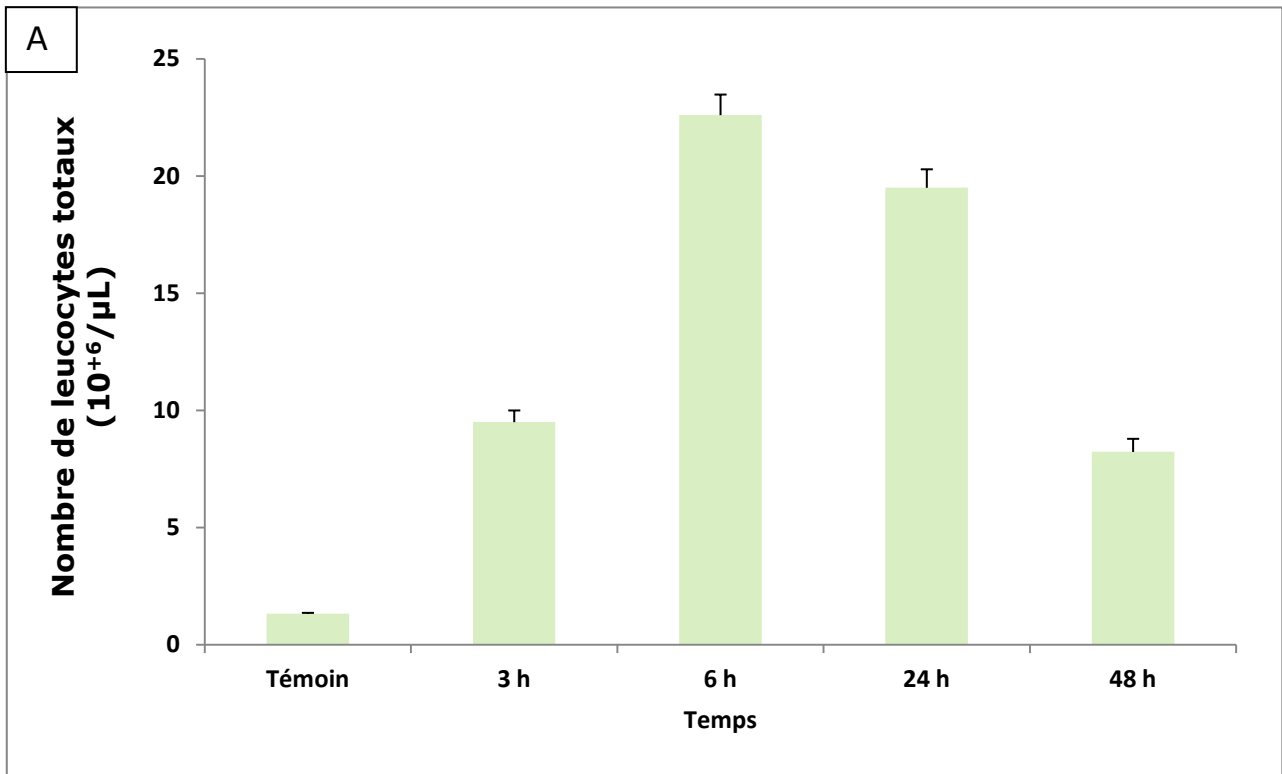


Figure 30: Dénombrement des leucocytes totaux au niveau du liquide péritonéal après injection du venin (A) ou les molécules (B) par voie i.p. La dose administrée est égale à 1 mg/kg de poids corporel de l'animal.

- Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, n=3.

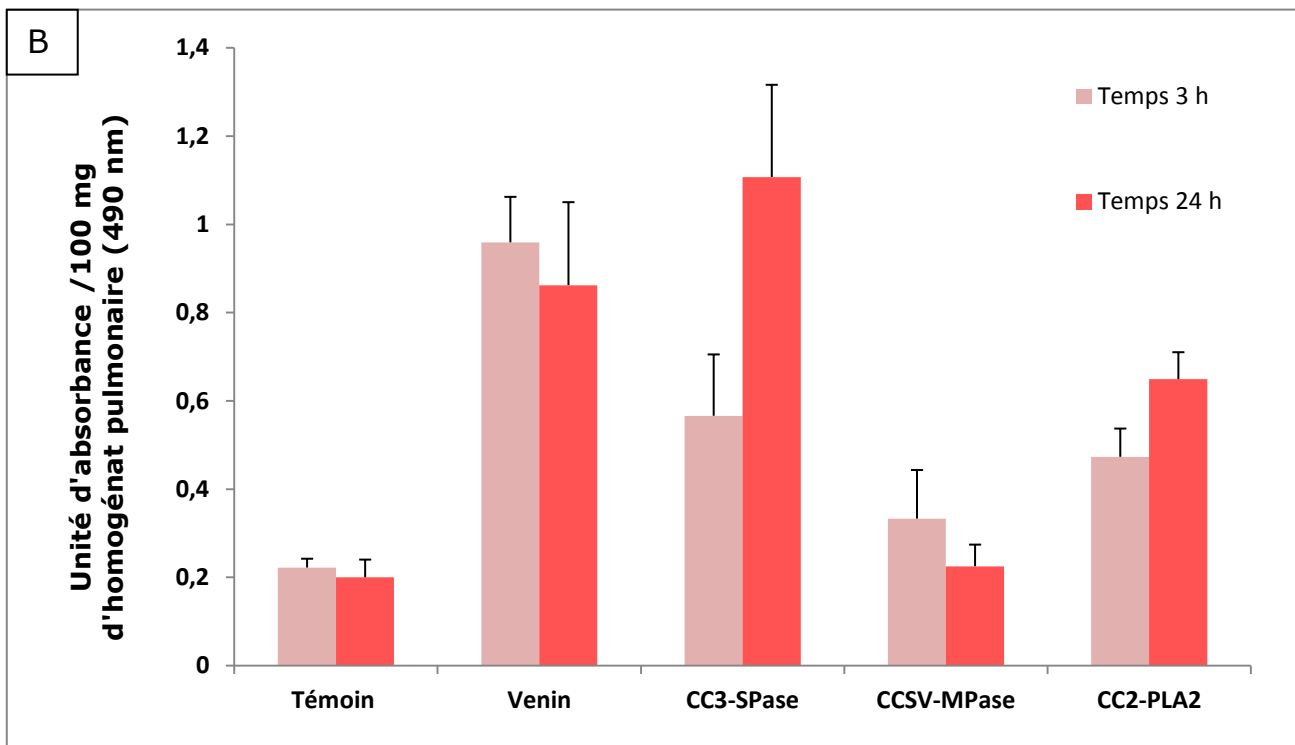
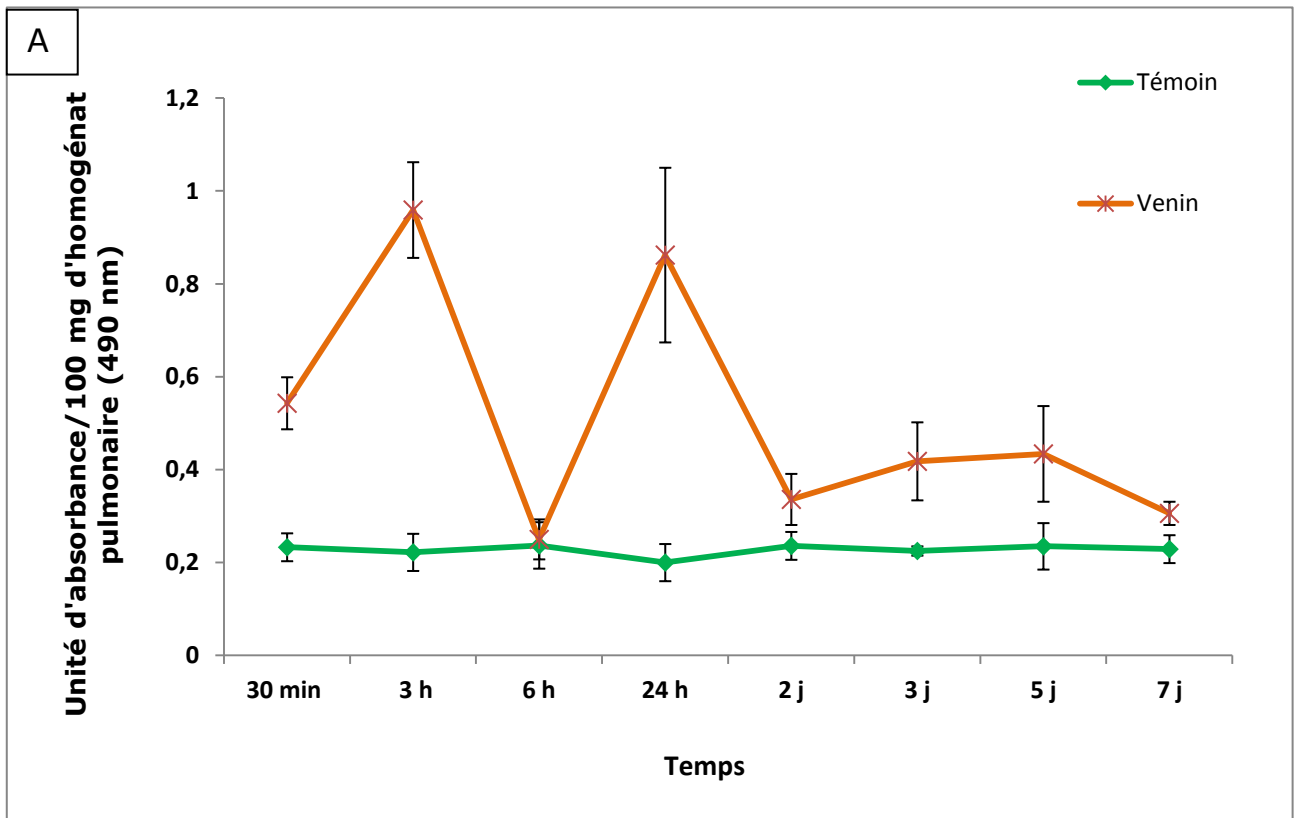


Figure 31: Détermination de l'activité EPO après action du venin (A) ou les molécules (B) injectés par voie i.p. La dose administrée est égale à 1 mg/kg de poids corporel de l'animal.

- Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, n=6.

En effet, les résultats obtenus montrent des taux élevés de l'EPO à 3 h et encore plus à 24 h lorsque les animaux sont traités la CC3-SPase et la CC2-PLA₂. La CC3-SPase induit un taux plus élevé que celui obtenu avec le venin total (Figure 31B). Cependant, ce taux est faible pour la métalloprotéinase CCSV-MPase à 3 h et reste comparable à celui du témoin à 24 h. Ces résultats révèlent que CC3-SPase serait une molécule qui induit une inflammation à l'inverse de CCSV-MPase qui ne présente aucun effet inflammatoire.

L'évaluation de la séquestration des polynucléaires éosinophiles dans le tissu pulmonaire, par le dosage de la peroxydase éosinophilique a permis de montrer la présence de cette enzyme dans les granules azurophiles des éosinophiles. Cette enzyme permet de générer des radicaux libres exerçant des effets cytotoxiques.

III.3.1.2.2. Détermination de l'activité hémolytique du complément

Les connaissances acquises sur l'activité du système de complément peuvent être utilisées dans le but de mieux connaître le processus inflammatoire induit par le venin de *Cerastes cerastes* et ses molécules d'intérêt et d'améliorer le traitement par l'utilisation de l'immunothérapie antivenimeuse.

Le système du complément joue un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire. Ce système fonctionne par activation en cascade de ses composants, il est activé rapidement et localement avec de nombreuses boucles d'amplification. Le facteur de Hagmen de la coagulation sanguine et la protéine CRP activent le complément alors que facteur I et le facteur C₁-INH l'inhibent (Espinosa, 2006).

L'étude de l'activité hémolytique du complément a été réalisée après injection par voie i.p. d'une dose sub létale du venin ou des molécules purifiées afin de montrer leurs effets sur l'activation des composés du complément. Le venin de *Cerastes cerastes* induit une élévation de l'activité lytique du complément dès 30 minutes. Cette activité atteint une valeur maximale après 24 h (Figure 32A). Les sérums des animaux sacrifiés à 3 h et à 24 h après action des molécules purifiées se caractérisent par une activité lytique qui varie selon la molécule utilisée et le temps de sacrifice de l'animal (Figure 32B). La sérine-protéinase CC3-SPase présente une importante activité ($44,43 \pm 1,28$ %) dès les 3 h qui suivent son injection alors que celle du venin est de l'ordre de $33,99 \pm 0,88$ %.

L'administration de la phospholipase CC2-PLA₂ induit une activité hémolytique ($43,34 \pm 2,58$ %) élevée comparativement à celle induite par le venin total. La métalloprotéinase CCSV-MPase induit la plus faible activité d'hémolyse légèrement supérieure à celle du témoin.

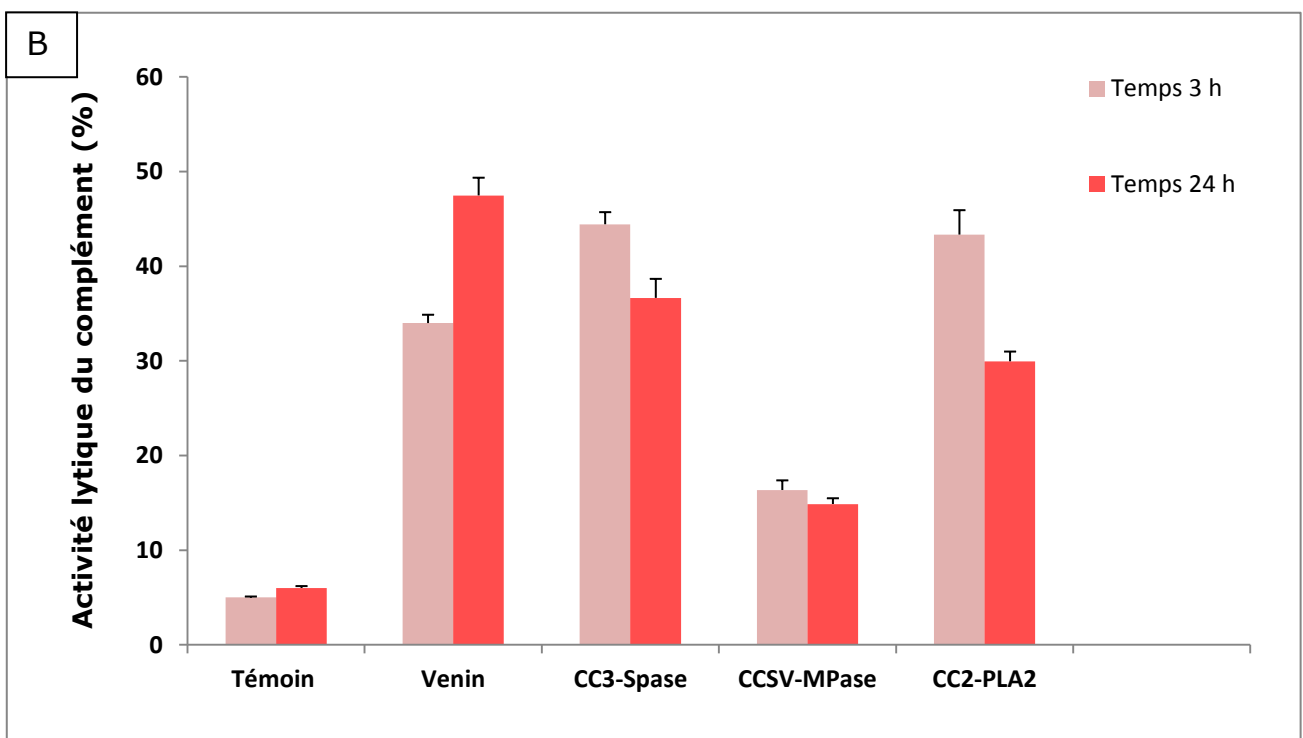
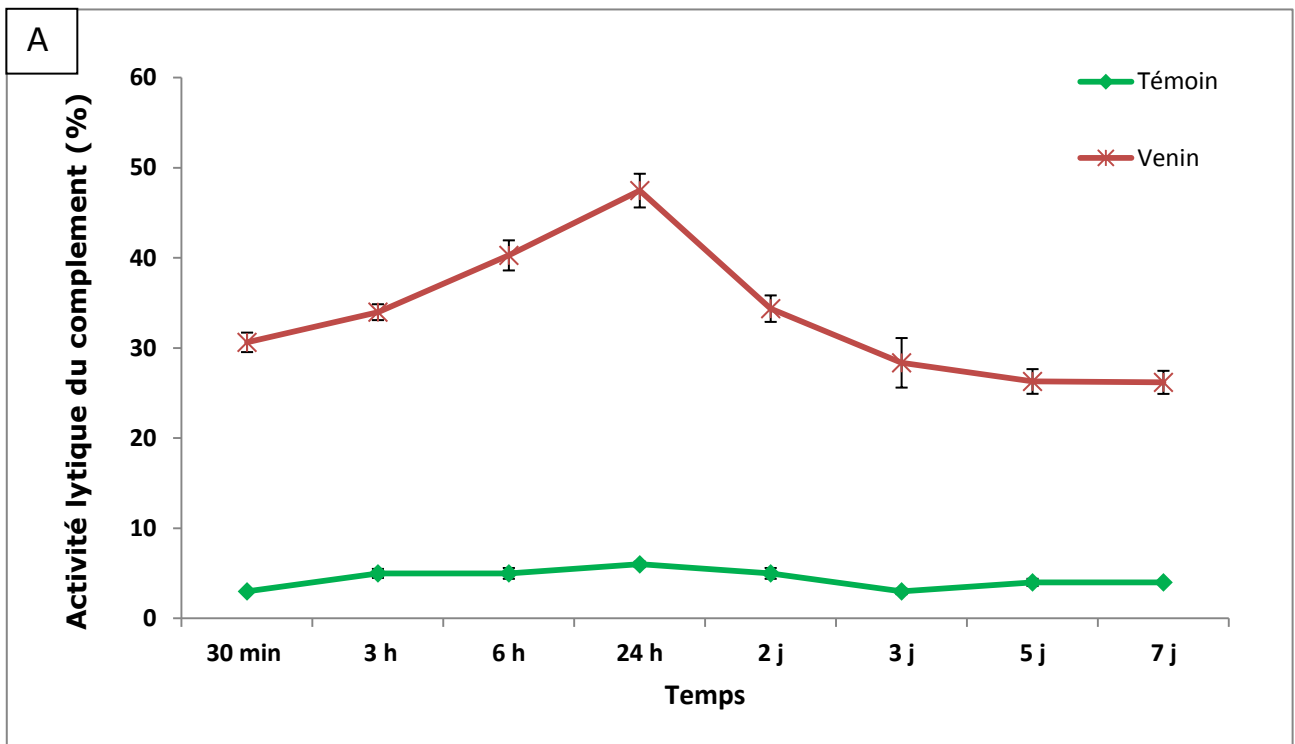


Figure 32: Détermination de l'activité hémolytique du complément après action du venin (A) et des molécules (B), injectés par voie i.p. La dose administrée est égale à 1 mg/kg de poids corporel de l'animal.

- Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, n= 3.

III.3.1.2.3. Détermination de concentrations des cytokines IL6 et IL10

De nombreuses cytokines sont impliquées dans le processus inflammatoire déclenché lors des envenimations ophidiennes (Lomonte *et al.*, 1993; D'Suze *et al.*, 2003). La détermination de la concentration sérique des cytokines permet de mieux comprendre le processus inflammatoire. Dans cette étude, deux cytokines, une pro-inflammatoire (IL6) et l'autre anti-inflammatoire (IL10) ont été dosées après envenimation expérimentale des animaux soit avec le venin total de *Cerastes cerastes*, soit traités avec chacune des molécules préalablement purifiées.

Les résultats obtenus montrent que le venin de *Cerastes cerastes* induit une réaction inflammatoire traduite par la production de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (l'IL6 et l'IL10), (Figure 33A et 34A). Une concentration maximale de l'IL6 est obtenue après 24 h d'envenimation (243 ± 24 pg/mL, $p < 0,01$). La libération de l'IL6 est rapide suite à l'inoculation du venin, avec un taux élevé (198 ± 21 pg/mL, $p < 0,01$) dès 3 h après l'envenimation. Ce taux pourrait traduire une synthèse précoce des cytokines IL1- β et TNF- α . Ces deux cytokines présentent une action synergique dans l'initiation de la réponse inflammatoire et sont elles-mêmes impliquées dans la production de l'IL6.

Le venin de *Cerastes cerastes* entraîne également une augmentation significative des concentrations de l'interleukine anti-inflammatoire (IL10) dans le milieu vasculaire après envenimation. Le taux sérique de cette cytokine est maximal après 24 h (178 ± 24 pg/mL, $p < 0,01$)(Figure 34A). Cependant, la concentration de l'IL10 à 3 h d'envenimation est similaire à celle obtenue avec les animaux témoins (26 ± 4 pg/mL, $p < 0,01$). L'augmentation de l'IL10 peut être considérée comme un rétablissement de l'homéostasie, régulant le processus pro-inflammatoire induit par les cytokines et les autres médiateurs chimiques.

Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec ceux déjà rapportés sur le même venin (Chelghoum *et al.*, 2009). Dans cette étude, les cytokines dosées après envenimation des animaux avec une dose subléthale du venin de *C.cerastes*, présentent toutes, une cinétique biphasique avec un maximum observé 3 h et à 24 h.

Des résultats similaires ont été obtenus par Vera et ses collaborateurs (2000) après injection i.p. d'une DL50 du venin de *Bothrops asper*. Ce venin induit l'apparition de deux pics de cytokines à 4 h et 18 h après envenimation.

Les molécules purifiées à partir du venin de *C.cerastes* à une dose de 1 mg/kg d'animal, induisent une réponse inflammatoire qui se traduit par la libération des cytokines (IL6 et IL10). En effet, au bout de 24 h, les molécules CC3-SPase et CC2-PLA₂ entraînent une libération importante de l'interleukine IL6 avec des concentrations maximales de 123 ± 17 pg/mL, $p < 0,05$ et 178 ± 16 pg/mL, $p < 0,05$ respectivement) (Figure 33B et 34B).

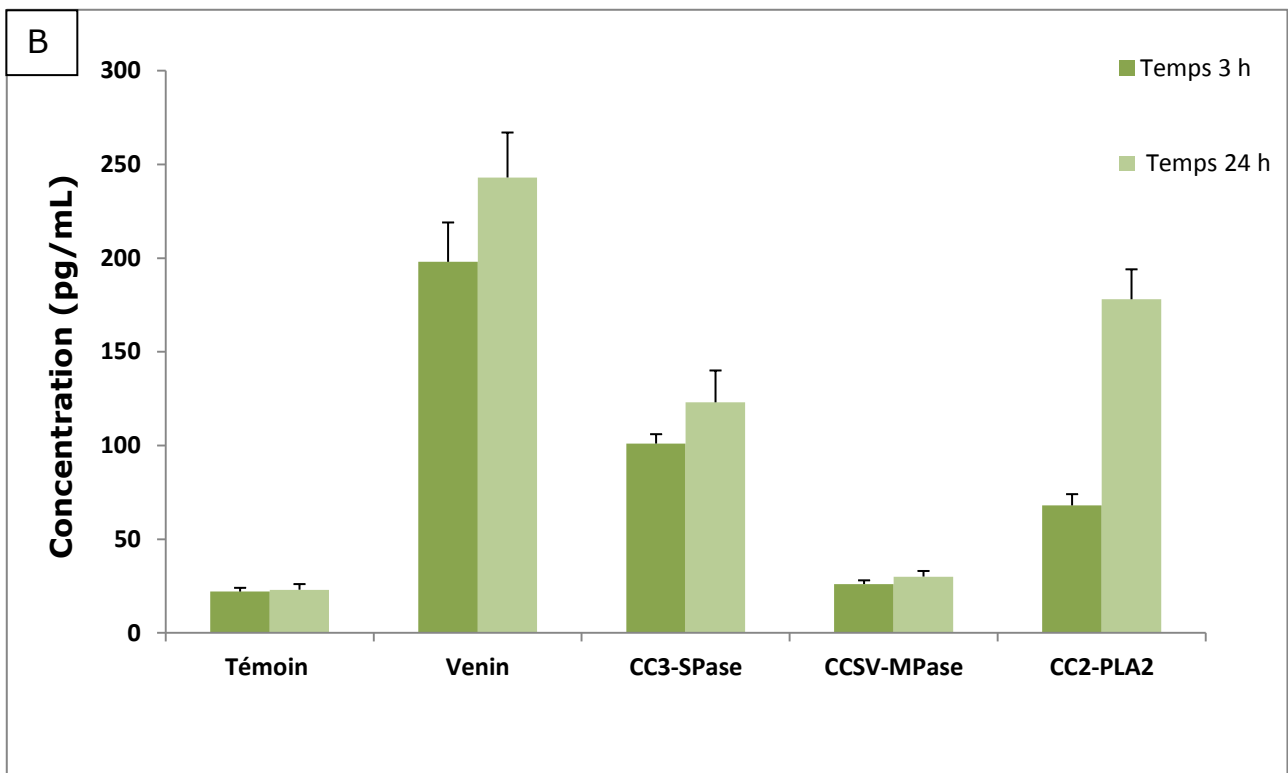
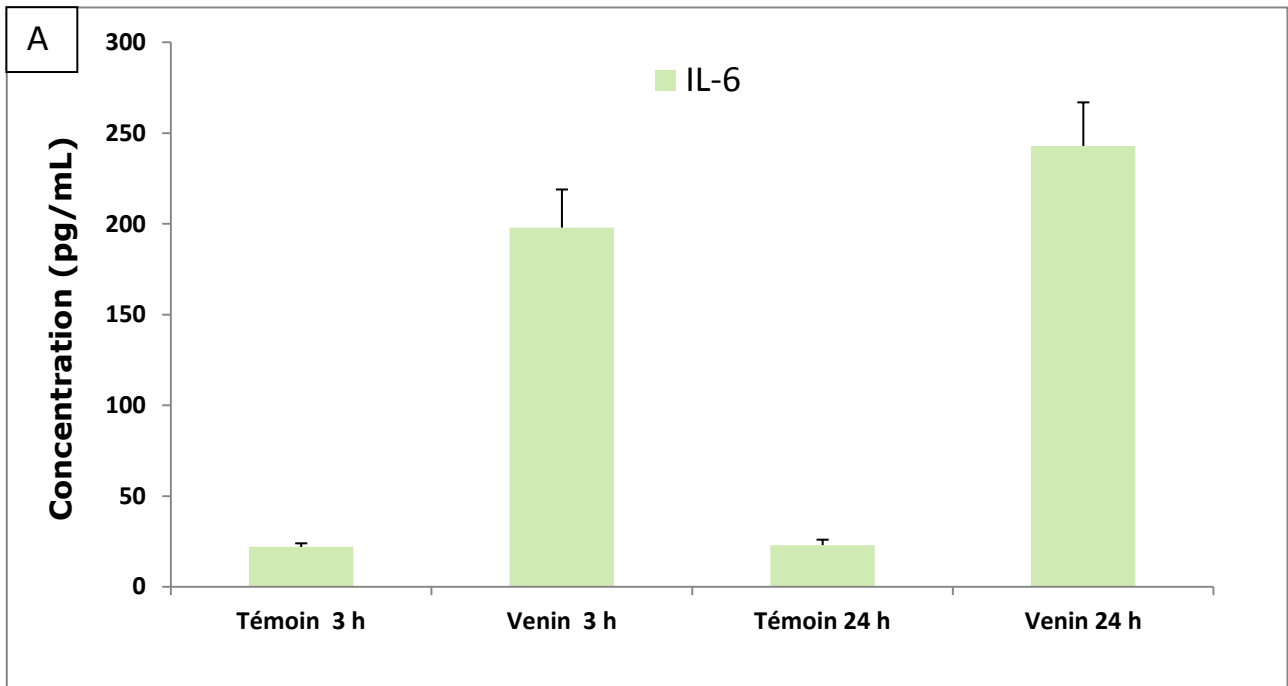


Figure 33: Détermination de la production de l'interleukine pro-inflammatoire IL-6 après action du venin (A) ou les molécules (B) injectés par voie i.p. La dose administrée est égale à 1 mg/kg de poids corporel de l'animal.

- Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, n = 3.

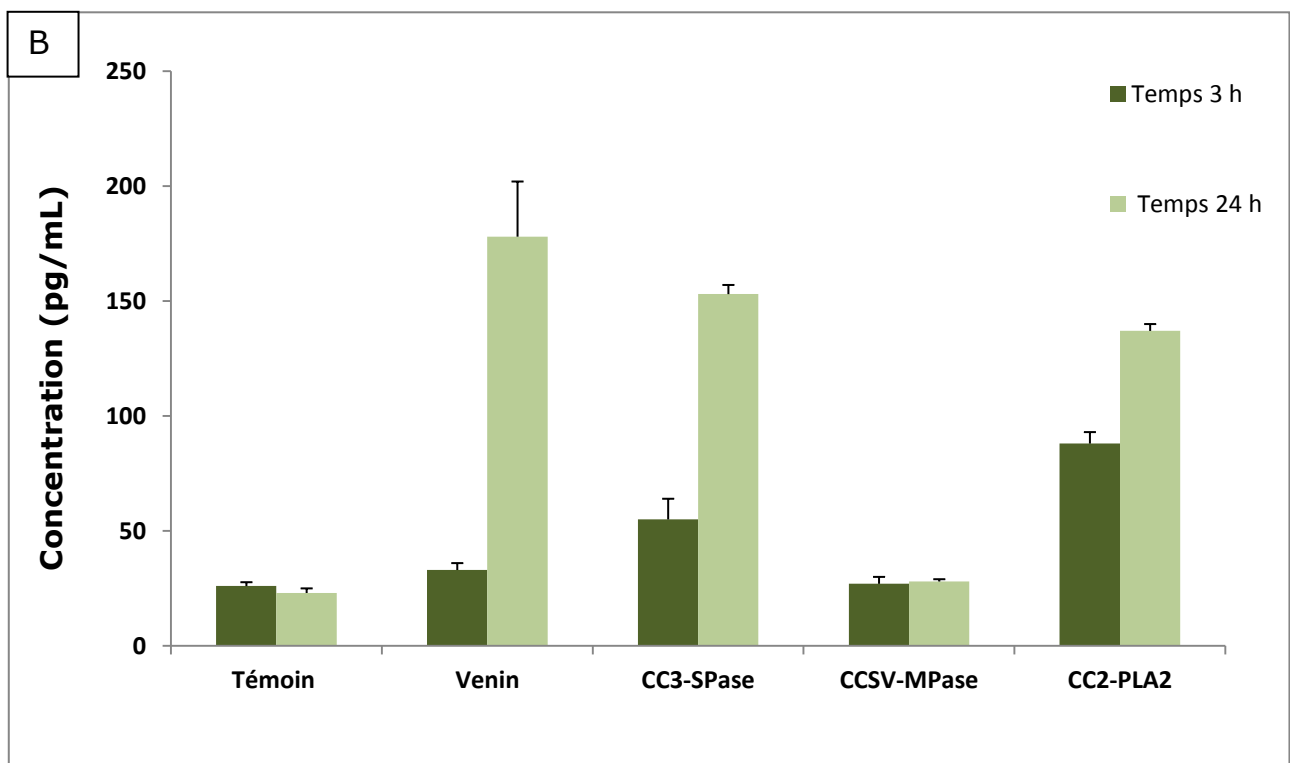
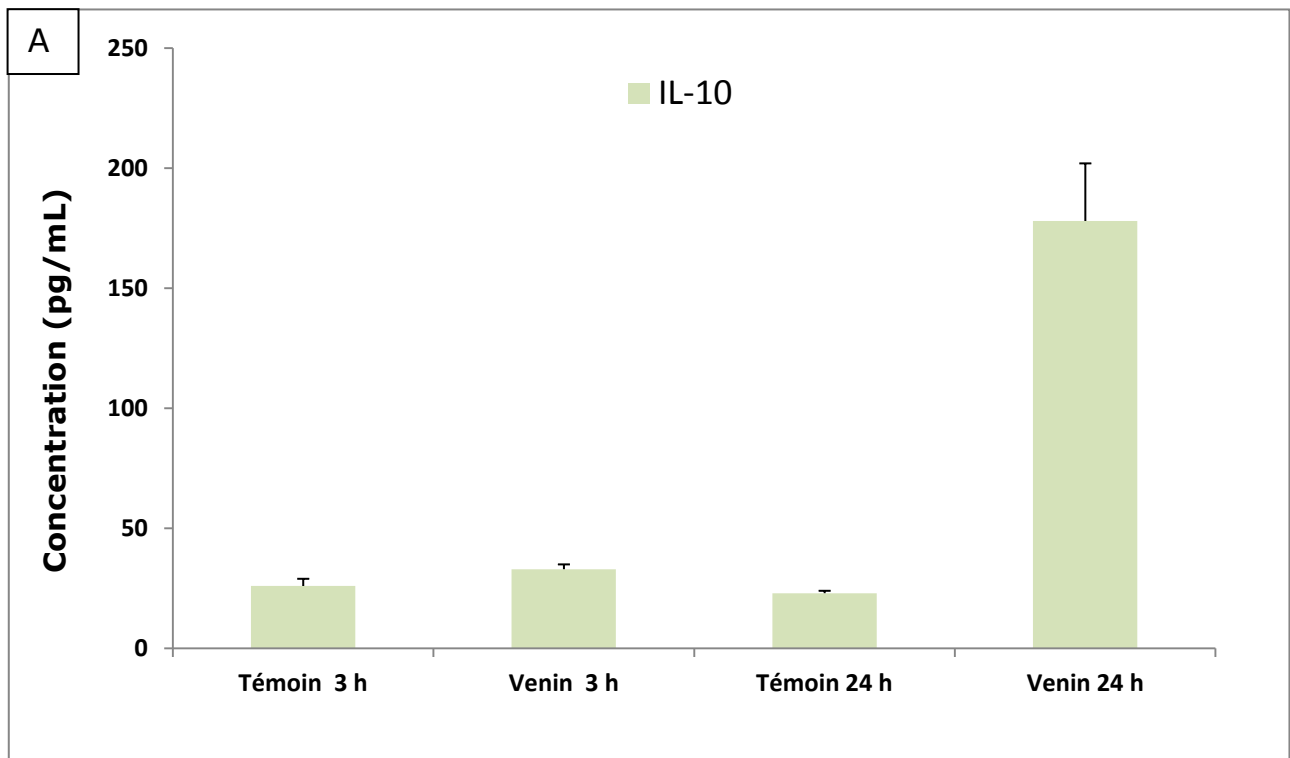


Figure 34: Détermination de la production de l'interleukine anti-inflammatoire IL-10 après action du venin (A) ou les molécules (B) injectés par voie i.p. La dose administrée est égale à 1 mg/kg de poids corporel de l'animal.

- Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, n= 3.

Ces deux molécules induisent parallèlement une augmentation significative de l'interleukine anti-inflammatoire IL10. Les taux sériques atteignent des valeurs de 153 ± 4 pg/mL, $p < 0,01$ et 137 ± 3 pg/mL, $p < 0,05$ après action de CC3-SPase et CC2-PLA₂ respectivement. Cependant, pour la métalloprotéinase les taux des cytokines IL6 et IL10 restent similaires à ceux obtenus avec le témoin. Ces résultats montrent que la serine-protéinase CC3-SPase et la phospholipase CC2-PLA₂ induisent une réponse inflammatoire systémique qui semble être comparable à celle induite par le venin total. La métalloprotéinase CCSV-MPase, quant à elle ne montre aucune réponse inflammatoire.

III.3.1.2.4. Détermination de la concentration du fibrinogène plasmatique après action des molécules CC3-SPase et CCSV-MPase

Le fibrinogène circule dans le plasma à une concentration de 2 à 4 g/L (Dreyfus, 1992), cette concentration augmente dans le sang considérablement après une infection, un traumatisme ou dans le cas d'états post-opératoires (Blombak, 1978). Le fibrinogène joue un rôle physiologique important dans le mécanisme de l'hémostase, en formant une structure dense de fibrine autour des plaquettes sanguines agrégées libérant ainsi les fibrinopeptides A et B qui agissent comme médiateurs de l'inflammation. Il joue également un rôle très important dans l'agrégation plaquettaire permettant ainsi l'interaction des plaquettes entre elles.

Les plasmas des rats envenimés avec une dose sub létale du venin de *Cerastes cerastes* par voie i.p. et sacrifiés après 3 h, 6 h et 24 h se distinguent par une concentration plasmatique du fibrinogène très faible par rapport aux plasmas des rats témoins, cela est du probablement de contenu du venin en protéases fibrinolytique (Figure 35A, Tableau XVIII).

Tableau XVIII: Concentration du fibrinogène plasmatique 24 h après traitement des rats traités avec les molécules purifiées

Echantillons	Témoin	venin	CC3-SPase	CCSV-MPase
Concentration du fibrinogène (g/L)	$4 \pm 0,07$	$0,57 \pm 0,003$	$1,47 \pm 0,08$	$2,56 \pm 0,09$

(Résultats exprimés en moyenne \pm SD, n = 5)

L'afibrinogénémie se manifeste en moyenne après douze à vingt quatre heures, dominée par les signes inflammatoires.

Des résultats similaires ont été obtenus après envenimation avec les venins de *Vipera russellii*; *Disagkistrodon acutus*, *Agkistrodon halys*, *Trimeresurus stejnegeri* et *Trimeresurus mucrosquamatus*. Le traitement des animaux avec les molécules CC3-SPase et CCSV-MPase et sacrifiés après 24 h, révèle une diminution significative de la concentration du fibrinogène pour la CC3-SPase, cette diminution est cependant moins importante pour la CCSV-MPase (Figure 35B). En effet, la CC3-SPase présente une activité de type thrombine ce qui est en parfait accord avec son activité $\alpha\beta$ fibrinogénase.

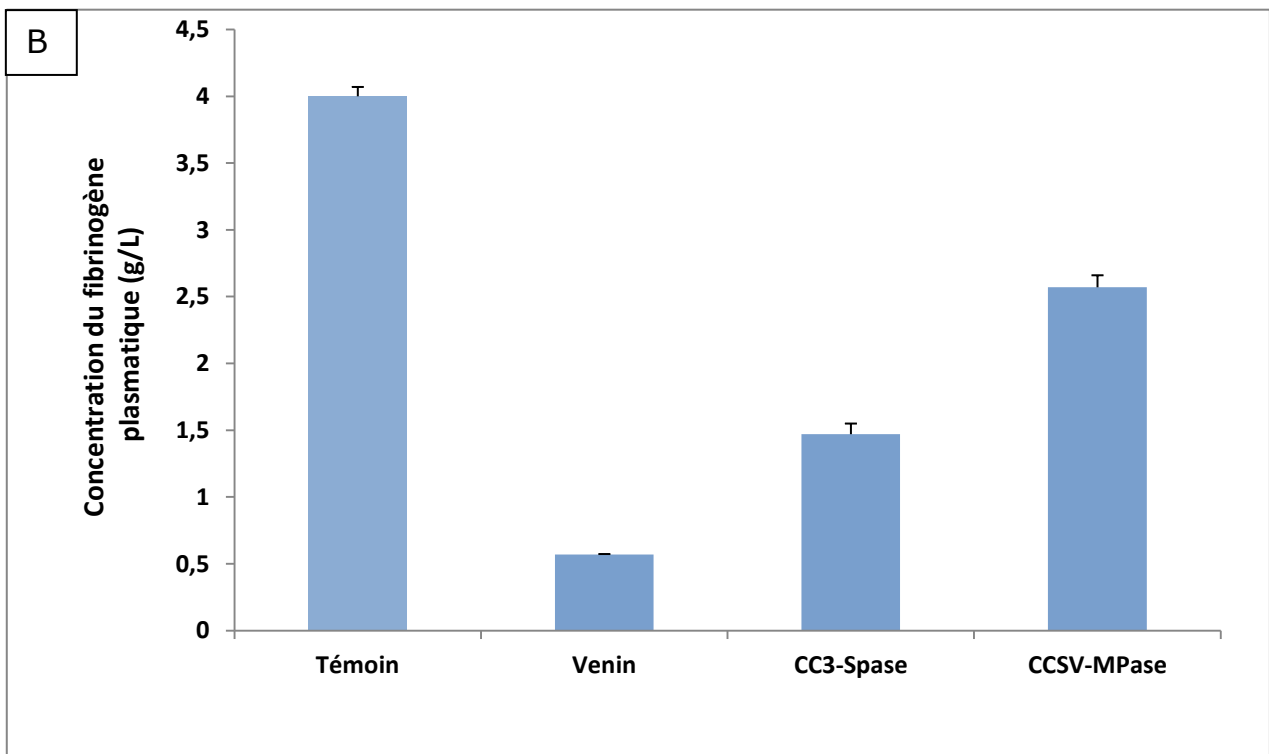
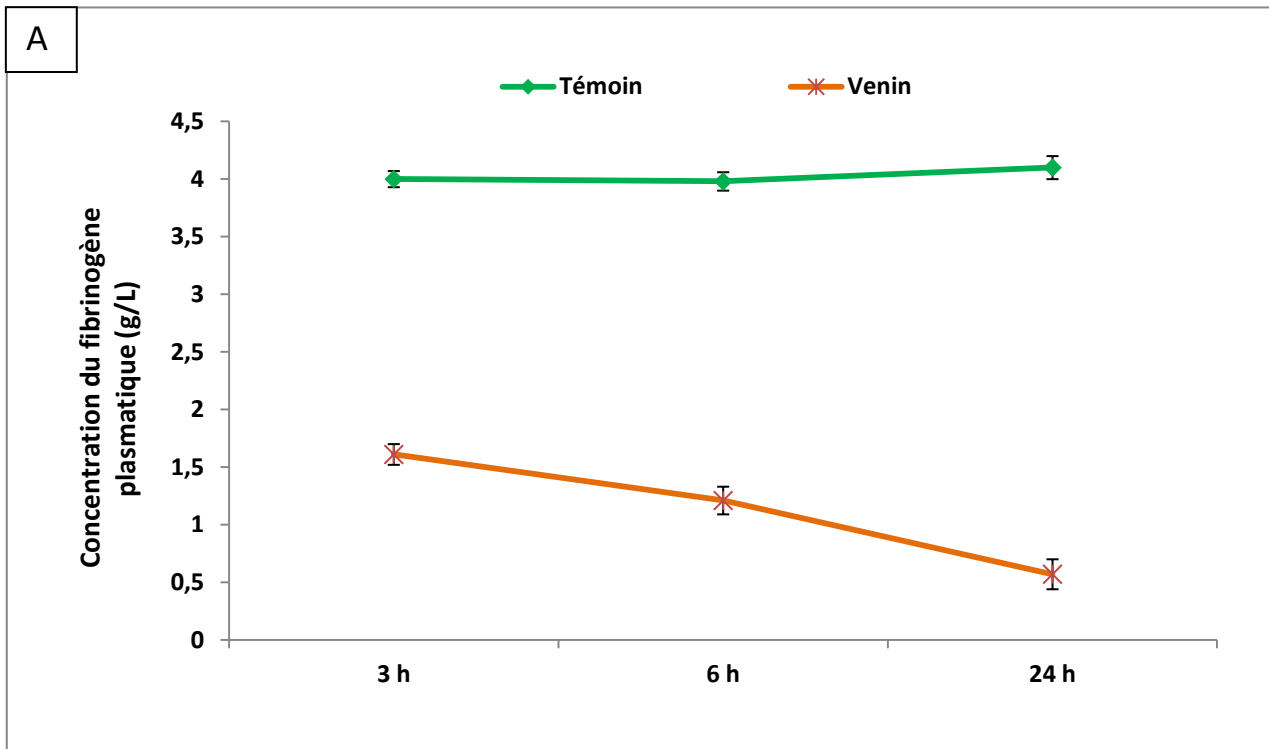


Figure 35: Détermination de la concentration du fibrinogène plasmatique après 24 h d'injection du venin (A) ou les molécules (B) injectées par voie i.p. La dose administrée est égale à 1 mg/kg de poids corporel de l'animal.

- Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, n=3.

III.3.1. Effets métaboliques induits par le venin et les molécules purifiées

Les effets du venin de *Cerastes cerastes* et des trois molécules purifiées (CC3-SPase, CCSV-MPase et CC2-PLA₂), (1 mg/kg de masse corporelle de l'animal) sur le métabolisme ont été mis en évidence par la détermination des concentrations de certains paramètres métaboliques libérés.

La cinétique de libération des métabolites (glucose, cholestérol, triglycérides, urée et créatinine) dans le sang a été suivie pendant une semaine chez des animaux envenimés. Pour les trois molécules, les analyses ont été réalisées au bout de 3 et 24 h d'administration des molécules (1 mg/kg de masse corporelle de l'animal).

III.3.1.1. Effet du venin et les molécules sur le glycémie

Les effets du venin de *Cerastes cerastes* et des molécules sur la fonction du pancréas ont été évalués par le dosage de la glycémie. Les résultats obtenus montrent que le taux du glucose sérique augmente de manière significative dès les 30 minutes d'envenimation. Un taux maximal ($1,366 \pm 0,093$ g/L, $p < 0,01$) est obtenu à 3 h après envenimation. Cette concentration diminue après 6 h d'envenimation pour augmenter encore une fois à 24 h d'envenimation ($1,043 \pm 0,038$ g/L, $p < 0,01$). Après 2 jours, la glycémie baisse et atteint les valeurs des animaux témoins (Figure 36A).

L'hyperglycémie a été souvent associée à une hyperamylasémie. En effet, le venin de *Cerastes cerastes* induit une hypéramylasémie chez la souris envenimée avec une dose subléthale par voie sous-cutanée avec une activité amylasique augmente dans le sang de manière significative (2193,23 UI/L) après 60 minutes d'envenimation. Parallèlement, une diminution du taux d'amylase est observée au niveau de l'homogénat pancréatique (Chérifi, 2004). L'augmentation de l'amylase pourrait être due à un changement de la perméabilité cellulaire (Borel, 1989).

Des valeurs maximales des taux du glucose sérique sont observées après 24 h suite à l'action de CCSV-MPase ($1,28 \pm 0,091$ g/L, $p < 0,05$) et de CC3-SPase ($1,25 \pm 0,048$ g/L, $p < 0,01$) (Figure 36B). La glycémie atteint un taux aussi élevé ($1,06 \pm 0,051$ g/L, $p < 0,01$) après 3 h de l'administration de CCSV-MPase alors que la CC3-SPase n'entraîne aucun effet au bout de ce temps. Par ailleurs, la phospholipase CC2-PLA₂ n'a montré aucune action sur le taux du glucose sérique (Figure 36B).

III.3.1.2. Effet du venin et les molécules sur la cholestérolémie et les triglycéridémie

La cinétique des variations des paramètres métaboliques lipidiques (cholestérol et les triglycérides) a été analysée, suite à une envenimation avec le venin de *Cerastes cerastes* et à l'administration des molécules purifiées.

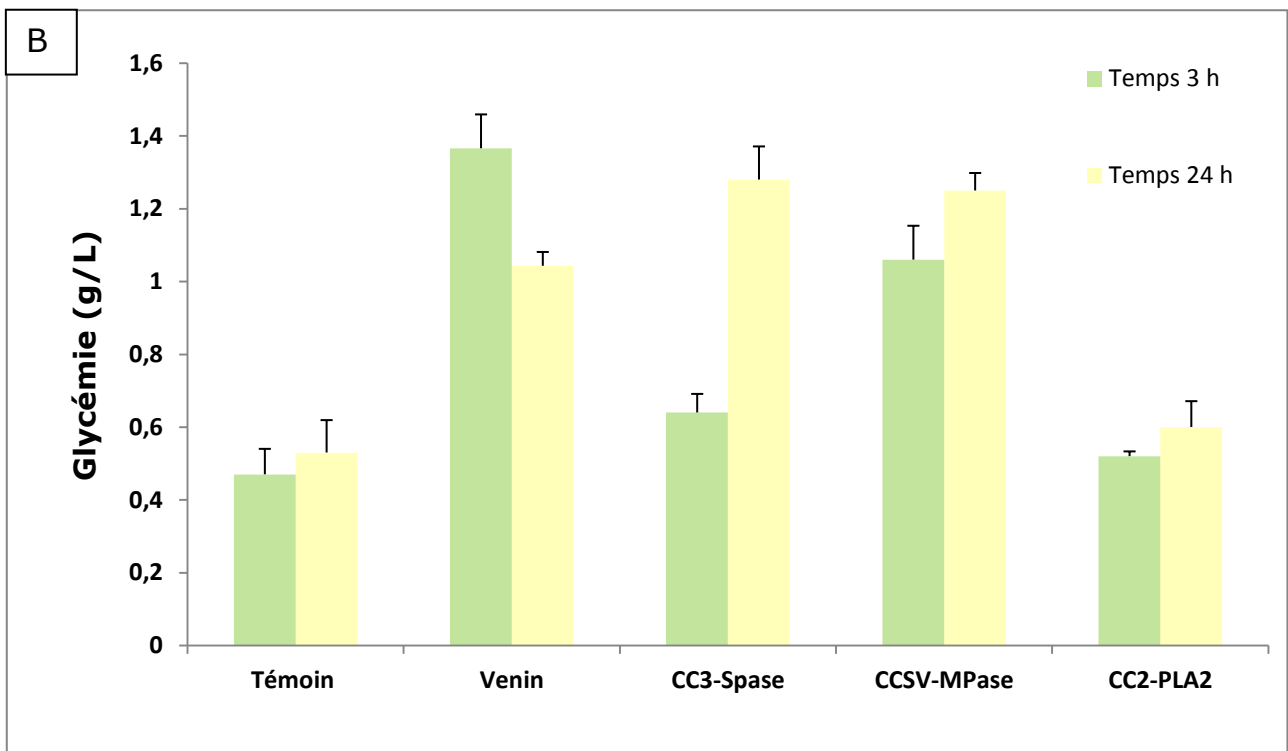
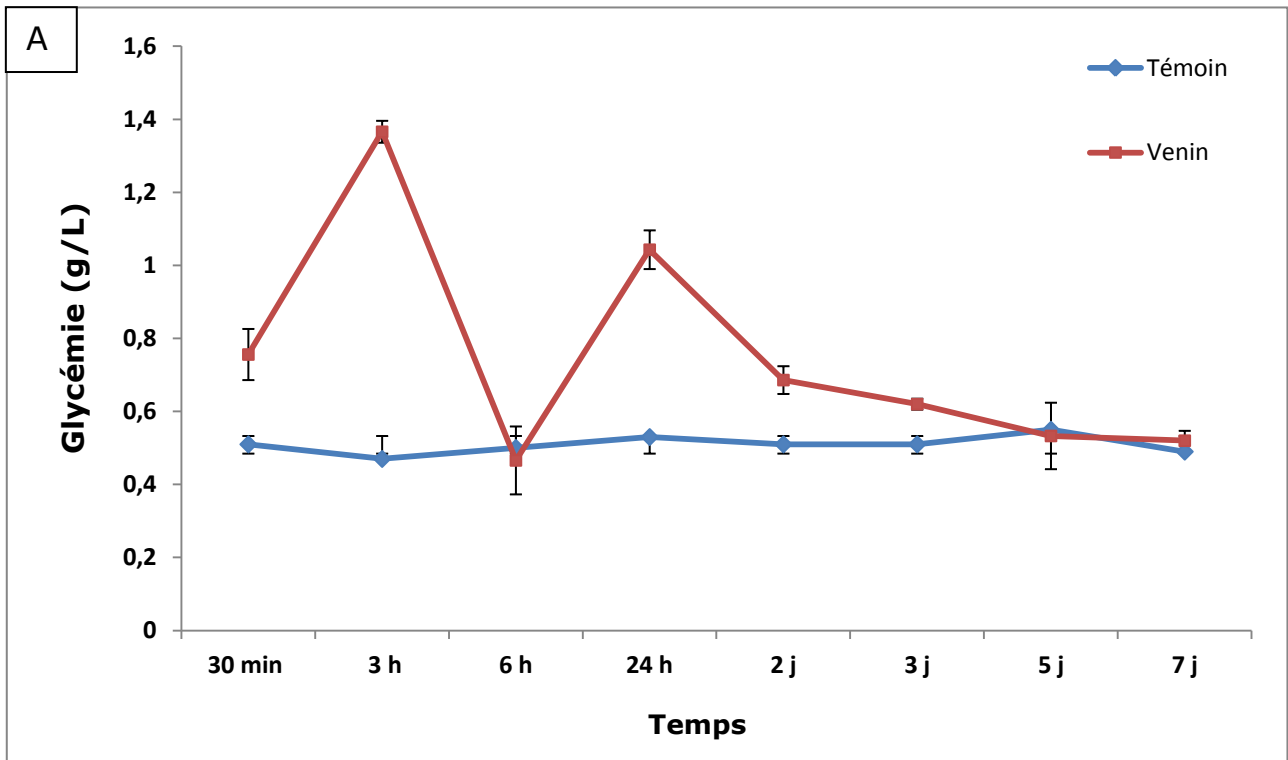


Figure 36: Effets du venin de *Cerastes cerastes* sur la glycémie (A) et des molécules purifiées CC3-Spase, CCSV-MPase et CC2-PLA₂ (B), injectés par voie i.p. La dose administrée est égale à 1 mg/kg de poids corporel de l'animal.

- Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, n=3.

L'envenimation avec le venin de *Cerastes cerastes* provoque une dyslipidémie biphasique se caractérisant par une triglycéridémie élevée et une hypercholestérolémie atteignant des valeurs maximales après 3 h et 24 h d'envenimation. Au bout de 3 h, le taux de cholestérol sérique atteint une valeur de $1,08 \pm 0,09$ g/L ($p < 0,01$) suivi d'un deuxième taux maximal à 3 jours d'envenimation ($0,98 \pm 0,038$ g/L, $p < 0,01$) (Figure 37A).

Cette étude a montré que le venin induit un dysfonctionnement hépatique ce qui pourrait expliquer ces perturbations métaboliques (Chérifi, 2004; Chaou *et al.*, 2006).

Une autre étude réalisée avec le venin de *Vipera lebetina* a montré que la cinétique des métabolites lipidiques (cholestérol et les triglycérides) suit une variation biphasique (Chaou, 2005).

La quantification du cholestérol et des triglycérides sériques après administration des molécules purifiées chez les rats, n'a montré aucune modification significative au bout de 3 h puisque les taux enregistrés sont comparables à ceux du témoin. Cependant, la métalloprotéinase CCSV-MPase induit une triglycéridémie élevée au bout de 24 h de traitement des animaux ($1,22 \pm 0,038$ g/L), ($p < 0,05$) sans aucune variation de la cholestérolémie (Figures 37B et 38B). La serine protéinase CC3-SPase induit une variation du taux de cholestérol ($1,02 \pm 0,031$ g/L, $p < 0,05$) alors qu'elle n'induit aucune variation du taux des triglycérides ($0,61 \pm 0,03$ g/L) ($p < 0,01$).

III.3.1.2. Effet du venin et les molécules sur l'urémie et la créatinémie

Une étude de la biodistribution du venin de *Cerastes cerastes* chez la souris envenimée par voie s.c. a révélé une forte concentration du venin au niveau du parenchyme rénal (Chérifi, 2004; Chérifi *et al.*, 2005 et Chaou *et al.*, 2006). Dans cette étude, la perturbation de la fonction rénale a été évaluée par la détermination de l'activité des enzymes marqueurs du dysfonctionnement rénal.

La fonction rénale peut être aussi évaluée par l'analyse des métabolites marqueurs du rein (l'urée et la créatinine). La cinétique de ces deux paramètres métaboliques a été réalisée après action du venin total et les trois molécules purifiées.

L'injection du venin de *C. cerastes* provoque une élévation significative de l'urémie et de la créatinémie après 24 h envenimation (Figure 39A et 39B). La concentration de l'urée et de la créatinine diminuent au-delà de 24 h et atteignent des valeurs semblables à celles du témoin.

Ces deux métabolites ne sont pas affectés par les trois molécules purifiées. En effet, les valeurs se rapprochent du témoin quel que soit la molécule administrée.

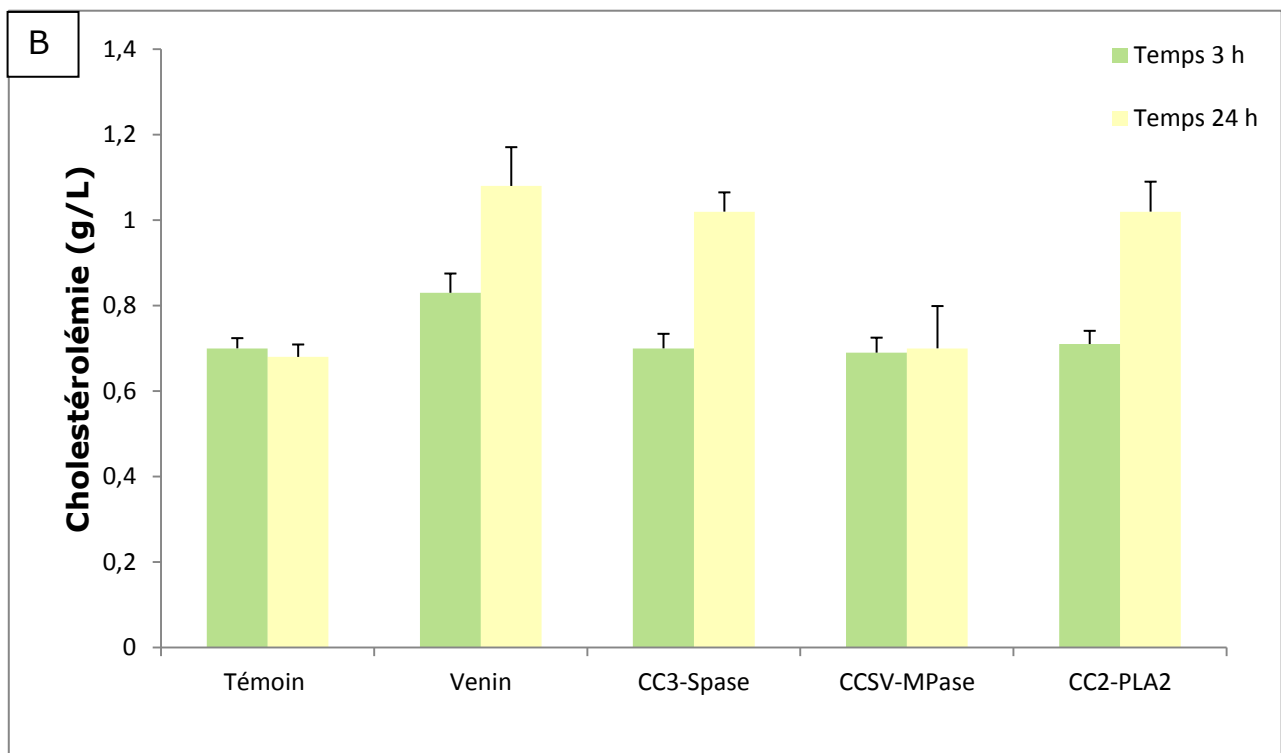
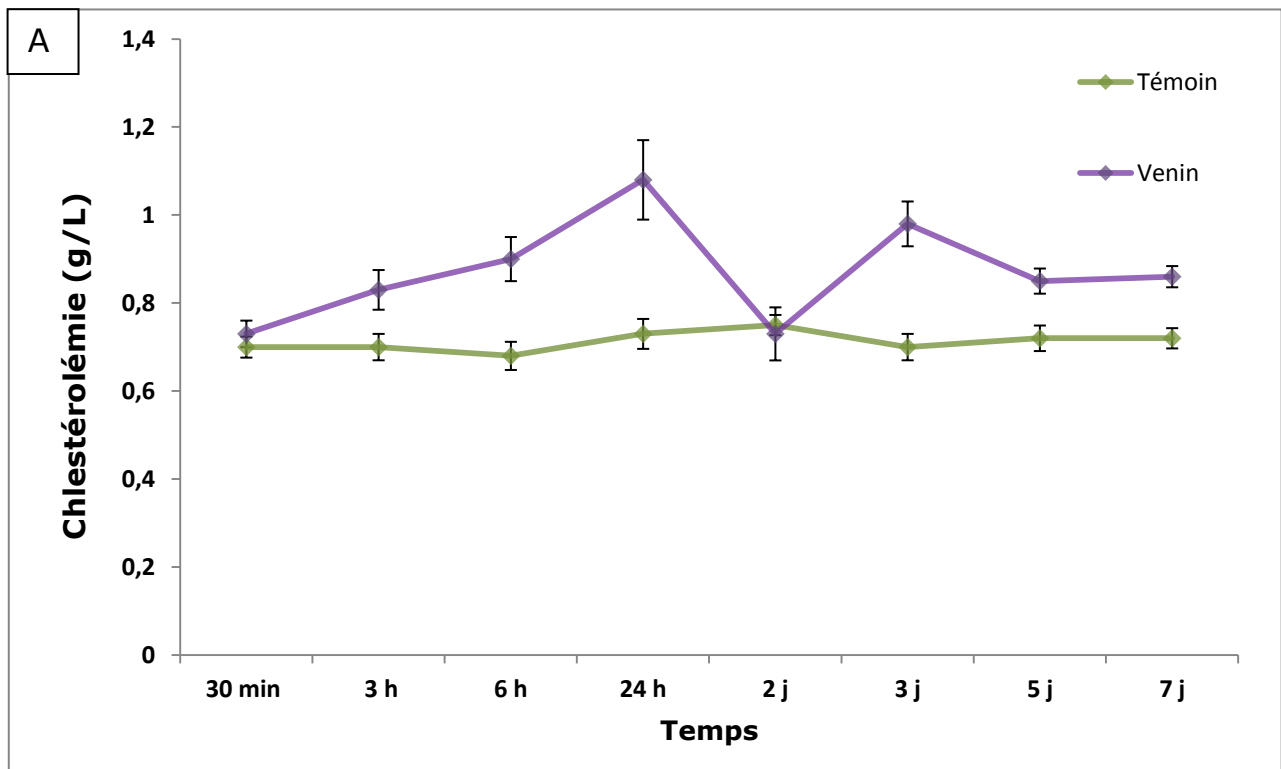


Figure 37: Effets du venin de *Cerastes cerastes* sur la cholestérolémie (A) et les molécules purifiées CC3-SPase, CCSV-MPase et CC2-PLA2 (B), injectés par voie i.p. La dose administrée est égale à 1 mg/kg de poids corporel de l'animal.

- Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, n=3.

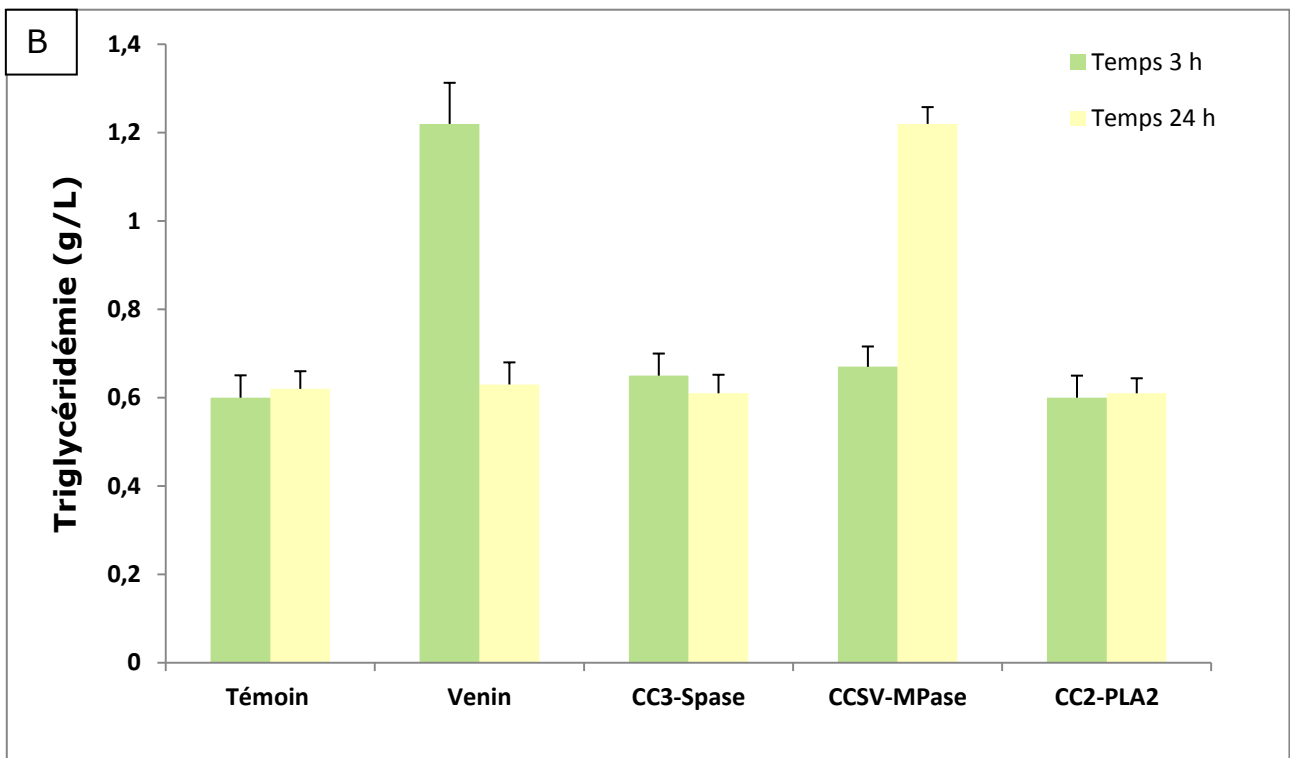
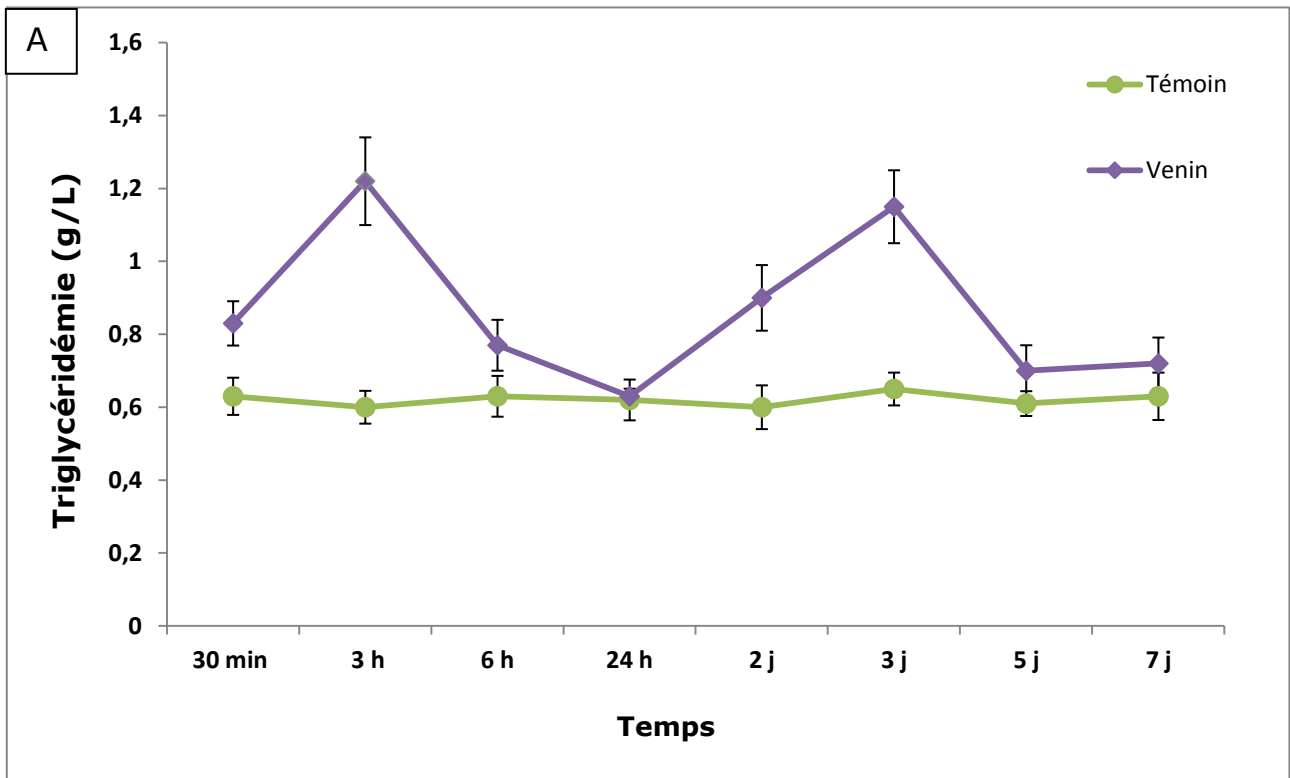


Figure 38: Effets du venin de *Cerastes cerastes* sur la triglyceridémie (A) et les molécules purifiées CC3-SPase, CCSV-MPase et CC2-PLA2 (B), injectés par voie i.p. La dose administrée est égale à 1 mg/kg de poids corporel de l'animal.

- Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, n=3.

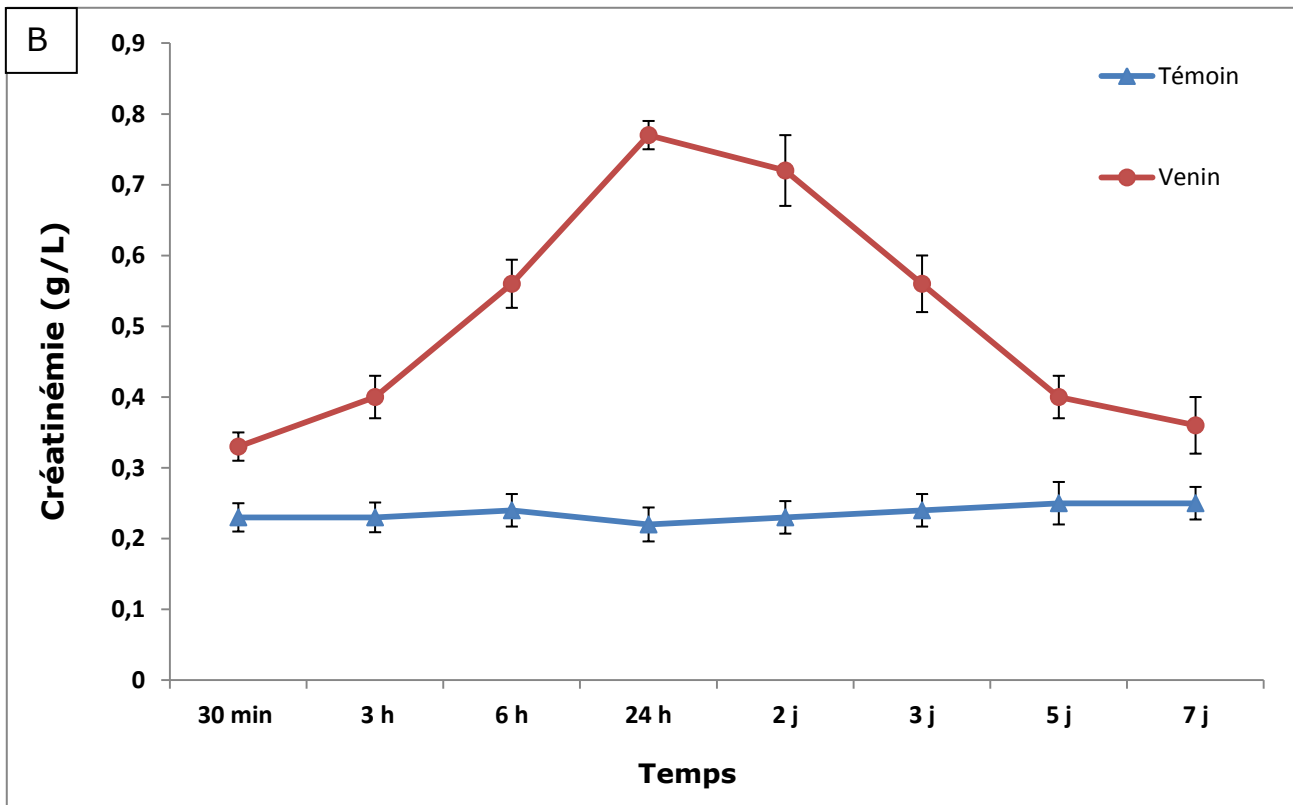
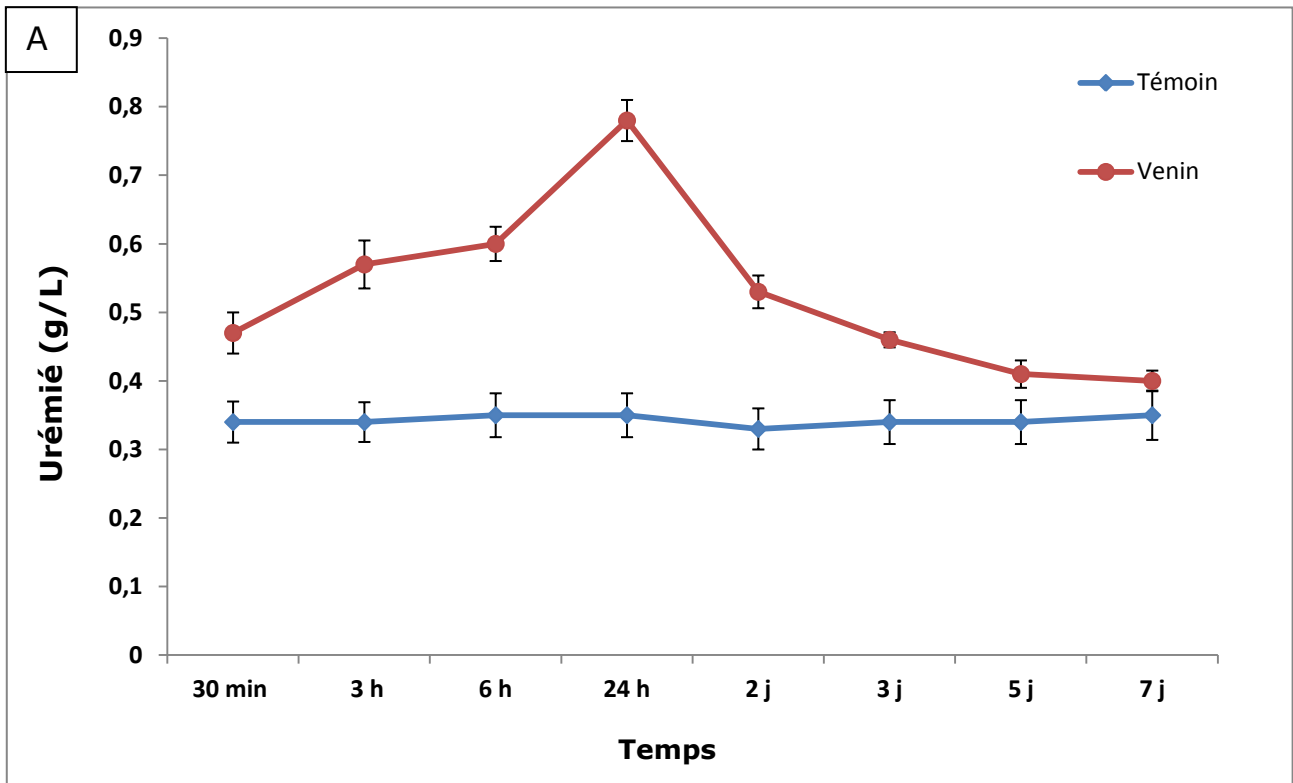


Figure 39: Effets du venin de *Cerastes cerastes* sur l'urémie (A) et la créatinémie (B), injecté par voie i.p. La dose administrée est égale à 1 mg/kg de poids corporel de l'animal.

- Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD, n=3.

II.4. Etude de la cinétique de distribution du venin et des molécules purifiées

L'étude de la biodistribution du venin et des molécules purifiées a nécessité tout d'abord la purification d'anticorps antivenin sous forme de fragments $F(ab')_2$ et la préparation d'un immuno-conjugué. Ce conjugué est utilisé dans le test d'ELISA sandwich. Des anticorps sous forme de fragments Fab spécifiques au venin total ont été également purifiés. Ils seront utilisés dans les tests d'immunothérapie seuls ou en association avec les anticorps de type $F(ab')_2$.

II.4.1. Préparation, purification et caractérisation des anticorps de type Fab et $F(ab')_2$ spécifiques au venin

L'immunisation des lapins a permis d'obtenir des immun-sérums, qui présentent un titre en anticorps de 3 276 800 à J42 évalué par le test ELISA (SL5 et SL6). Le titre obtenu pour le reste des lapins correspond à 1 638 400 (SL1, SL2, SL3, SL4)(Figure 40).

Les immun-sérums présentant des titres voisins sont mélangés et soumis à une double précipitation au sulfate d'ammonium afin d'obtenir les IgG. La quantité d'immunoglobulines G récupérées est divisée en deux lots. Un lot d'IgG est hydrolysé avec la pepsine pour obtenir les fragments $F(ab')_2$. L'autre lot est hydrolysé par la papaïne pour obtenir les fragments Fab.

La concentration en protéines ainsi que le titre en anticorps ont été déterminés après chacune des étapes (Tableau XIX). Les résultats montrent que les titres des anticorps des fragments $F(ab')_2$ et Fab sont estimés à 512 000 avec des concentrations protéiques de 28,69 et 27,5 mg/mL respectivement.

La purification des fragments $F(ab')_2$ et Fab par immuno-affinité a été réalisée après couplage du venin à un gel de Sepharose CL4B activé au BrCN. Le rendement du couplage ainsi réalisé est estimé à 97,8 %.

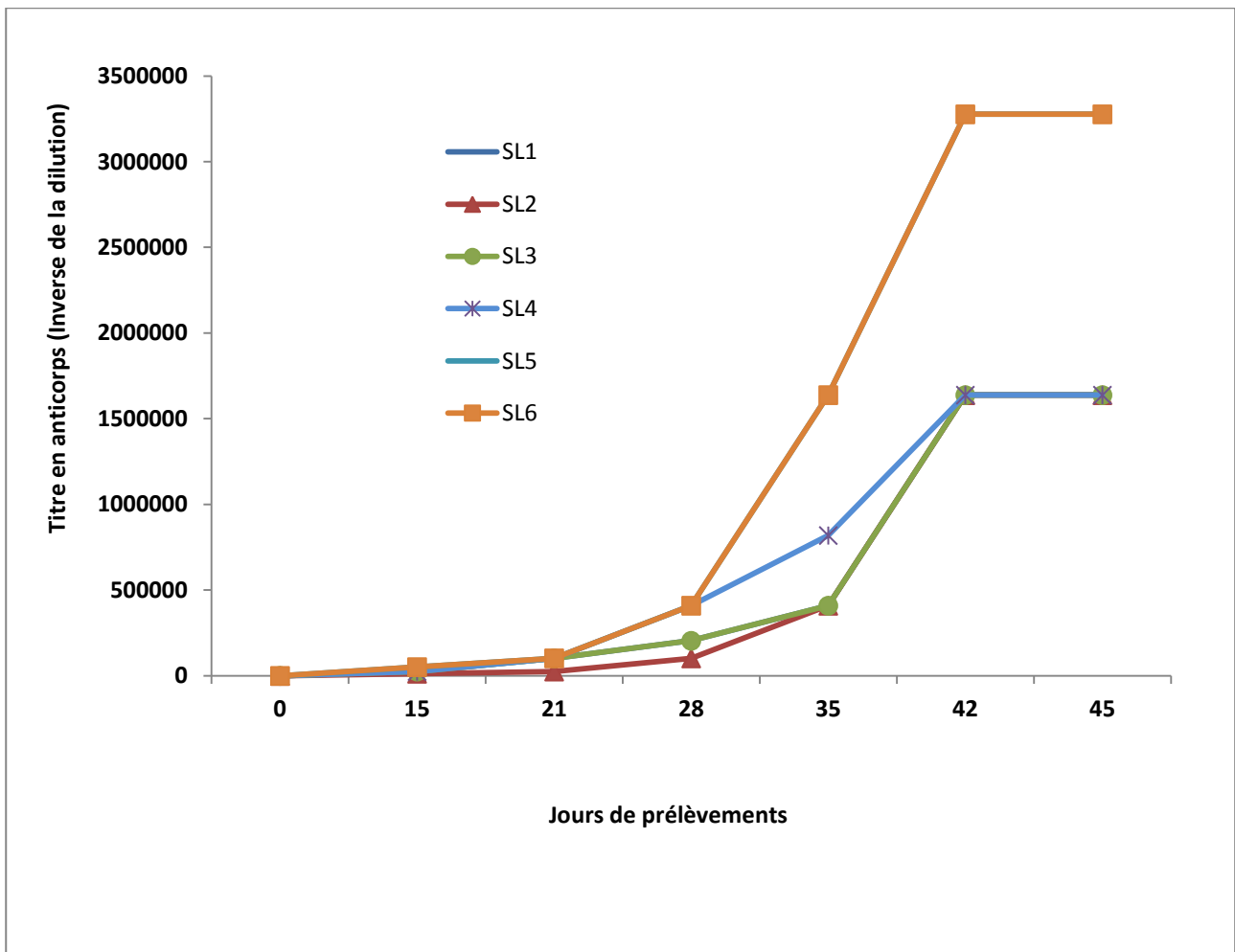


Figure 40: Détermination du titre en anticorps des immun-sérums expérimentaux (SL1 à SL6) tout au long du programme d'immunisation des lapins avec le venin de *Cerastes cerastes*

Tableau XIX: Détermination de la concentration en protéines et des titres en anticorps des immun-sérums (SL1, SL2, SL3 et SL4)

Immun-sérums (Mélange SL1, SL2, SL3 et SL4)	Concentration de protéines (mg/mL)	Titre en anticorps
Immun-sérum brut	61,37	1 638 400
Immun-sérum après précipitation au sulfate d'ammonium (IgG)	49,18	1 638 400
Immun-sérum après hydrolyse à la pepsine et dialyse (F(ab') ₂)	28,69	512 000
Immun-sérum après hydrolyse à la papaine et dialyse (Fab)	27,5	512 000

La purification des fragments F(ab')₂ et Fab (100 Unités d'absorbance) par immuno-affinité sur gel de Sepharose CL4B activé par le BrCN et couplé au venin de *Cerastes cerastes* a permis d'obtenir deux profils chromatographiques avec 3 pics d'absorbance (Figures 41A et 41B).

Le premier pic élué à pH 7,4 correspond aux protéines n'ayant aucune affinité avec le venin de *Cerastes cerastes*. Ce pic pourrait correspondre à des protéines sériques n'ayant pas été éliminées au cours des étapes de précipitation. Le deuxième pic élué à pH 3 correspondrait aux anticorps spécifiques de moyenne affinité, le troisième pic élué à pH 2 est constitué des anticorps de haute affinité.

Le rendement de la chromatographie de la purification des fragments F(ab')₂ et des fragments Fab anti-venin est estimé à 89,81 % et 79,68 % respectivement.

II.4.2. Etude de l'antigénicité du venin et des molécules purifiées

L'immuno-réactivité des fragments F(ab')₂ et Fab spécifiques au venin de *Cerastes cerastes* est testée vis-à-vis du venin et des trois molécules purifiées CC3-SPase, CCSV-MPase et CC2-PLA₂ à l'aide des tests ELISA et Dot-ELISA.

Le test ELISA est effectué sur une microplaque sensibilisée avec le venin de *Cerastes cerastes* ou avec les molécules à raison de 5 µg/mL (Tableau XX et Figure 42).

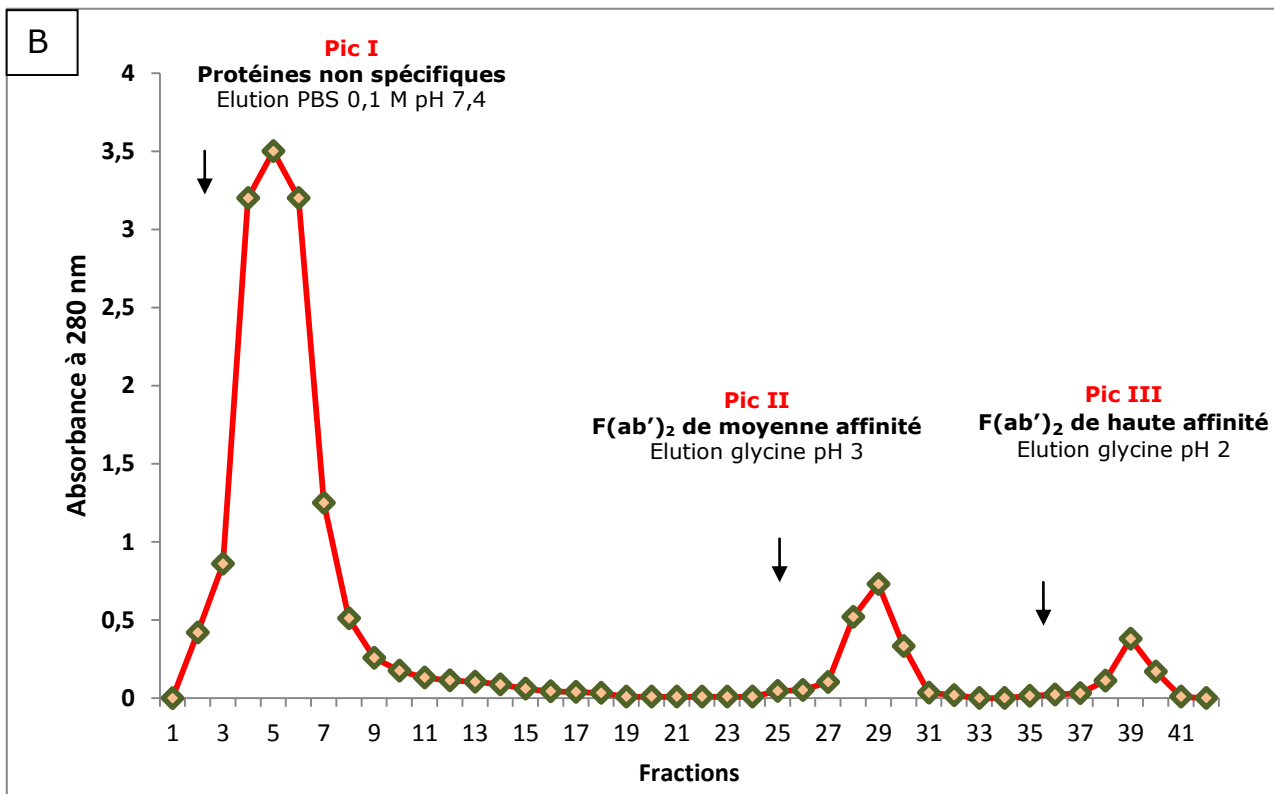
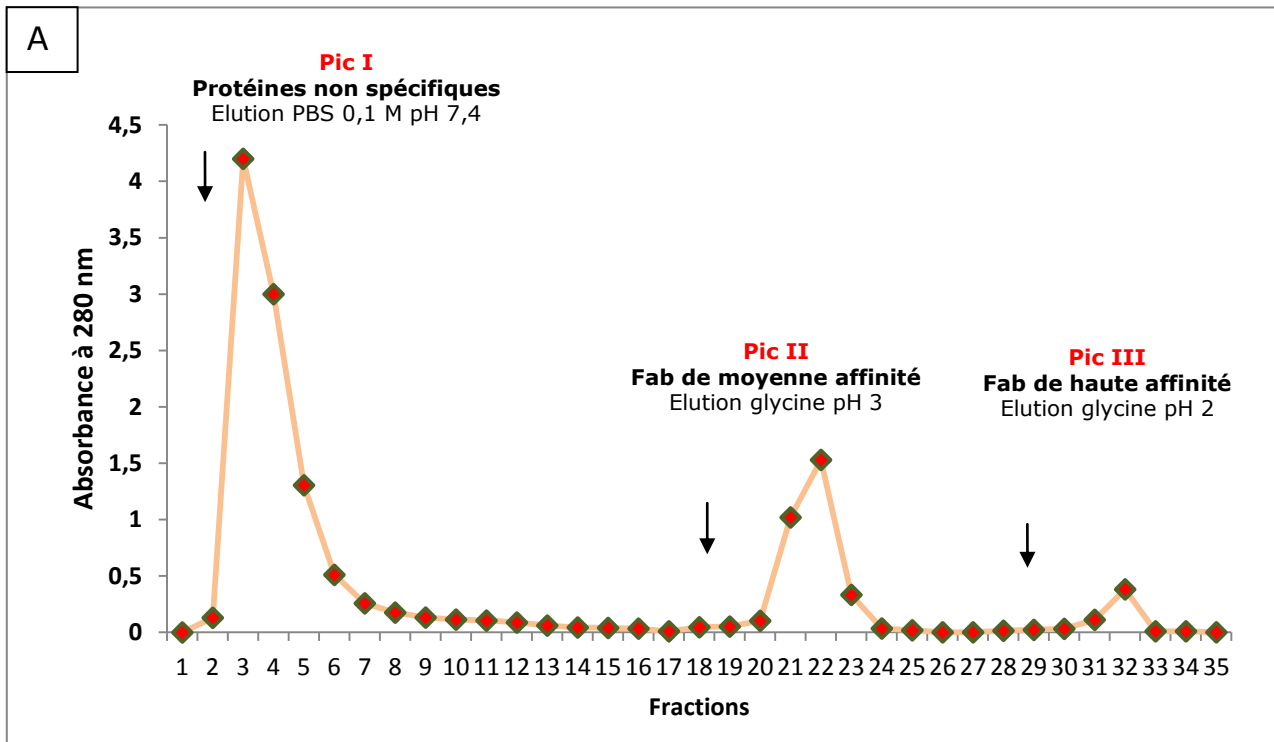


Figure 41: Purification des fragments Fab (A) et F(ab')₂ (B) par chromatographie d'affinité sur Sepharose CL4B activé au BrCN et couplé au venin de *Cerastes cerastes*. Le débit est maintenu constant à 18 mL/h. La quantité d'échantillon déposée correspond à 100 Unités d'Absorbance (Colonne, 8 x 1 cm).

Tableau XX: Comparaison des titres en anticorps des fragments F(ab')₂ et Fab vis-à-vis du venin de *Cerastes cerastes* et des molécules purifiées

	Titre en anticorps des F(ab') ₂ spécifiques au venin	Titre en anticorps des Fab spécifiques au venin
Venin	256 200	128 000
CC3-SPase	128 200	128 000
CCSV-MPase	128 000	128 000
CC2-PLA ₂	64 000	64 000

Le titre des immun-sérums spécifiques vis-à-vis du venin de *Cerastes cerastes* est estimé à 256 000 pour les fragments F(ab')₂ et à 128 000 pour les fragments Fab. Les fragments F(ab')₂ anti-venin possèdent un titre deux fois moins important vis-à-vis des deux protéases CC3-SPase et CCSV-MPase et quatre fois moins important vis-à-vis de la phospholipase CC2-PLA₂. Cependant, les fragments Fab anti-venin présentent le même titre pour la CC3-SPase et la CCSV-MPase (128 000) et un titre de deux fois inférieur vis-à-vis de la CC2-PLA₂ (64 000).

Ces résultats montrent d'une part que les fragments F(ab')₂ présentent un titre élevé vis-à-vis de leur antigène spécifique (le venin) comparés aux fragments Fab anti-venin. D'autre part, ces mêmes fragments sont capables de réagir avec les trois molécules purifiées (CC3-SPase, CCSV-MPase et CC2-PLA₂) de manière identique. La CC2-PLA₂ semble cependant moins reconnue par les anticorps anti-venin.

La détermination de la quantité minimale du venin ou des molécules immuno-détectée par les deux types d'anticorps (Fab ou F(ab')₂) à l'aide du Dot-ELISA a permis d'évaluer l'antigénicité des molécules vis-à-vis ces anticorps dirigés contre le venin (Tableau XXI).

Tableau XXI: Comparaison de la capacité d'immuno-réactivité des fragments F(ab')₂ et Fab vis-à-vis du venin de *Cerastes cerastes* et des molécules purifiées

	Quantité (ng) du venin ou des molécules immuno-détecté(es) par	
	F(ab') ₂ spécifiques au venin	Fab spécifiques au venin
Venin	3,125	3,125
CC3-SPase	6,25	6,25
CCSV-MPase	6,25	6,25
CC2-PLA ₂	12,5	12,5

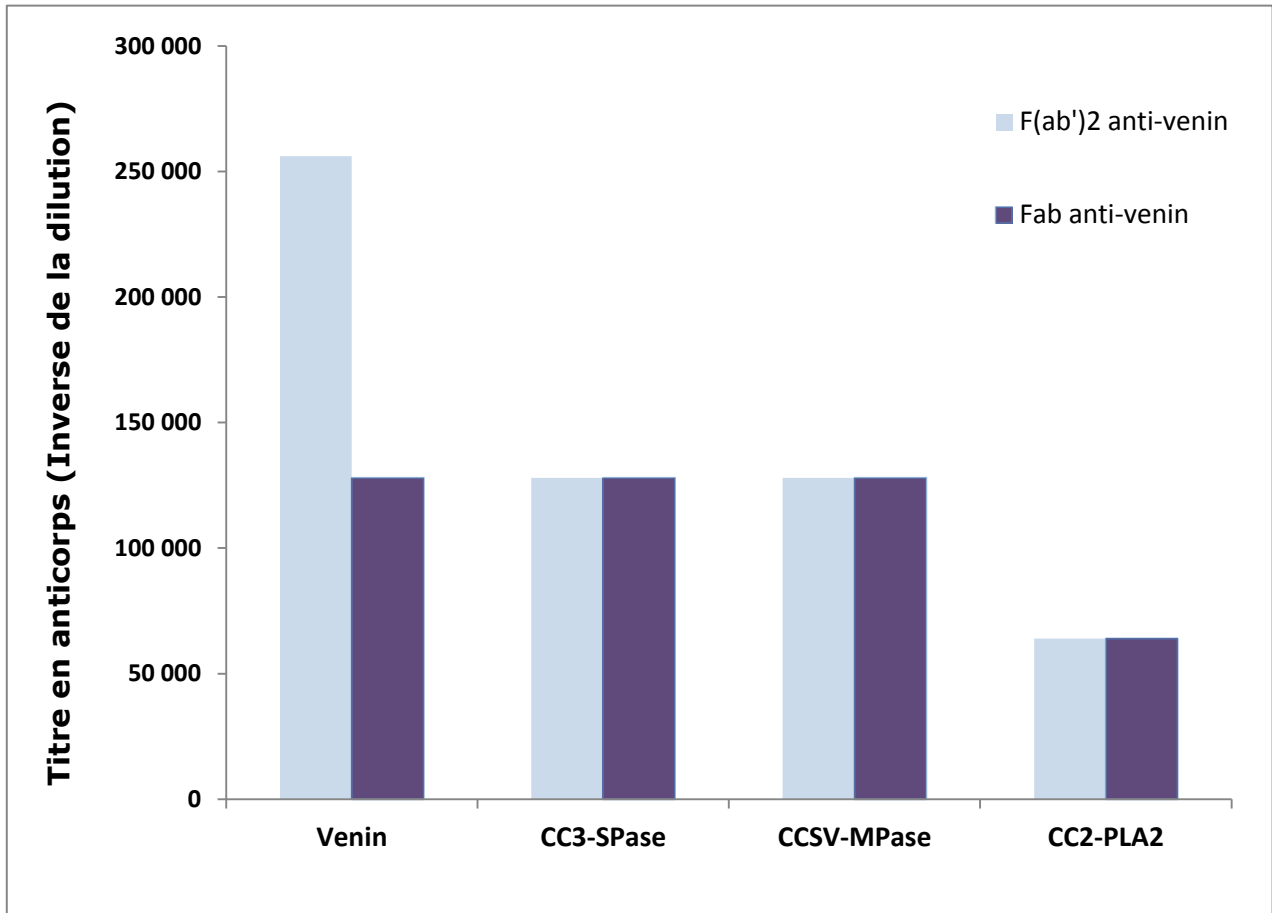


Figure 42: Comparaison des titres en anticorps des fragments F(ab')₂ et Fab anti-venin vis-à-vis du venin de *Cerastes cerastes* et des molécules purifiées.

Les résultats obtenus montrent que les deux types de fragments (Fab et F(ab')₂) détectent la même quantité de venin (3,125 ng) avec une quantité cependant deux fois plus élevée pour la CC3-SPase et la CCSV-MPase, alors que celle pour la CC2-PLA₂ (12,5 ng) est encore élevée.

II.4.3. Cinétique de distribution du venin et des molécules purifiées

La cinétique de distribution du venin de *Cerastes cerastes* et des molécules purifiées (CC3-SPase, CCSV-MPase et CC2-PLA₂) a été étudiée par ELISA sandwich chez un modèle rat mis au point chez le venin d'*Androctonus australis hector* et adapté au venin de *Cerastes cerastes*.

II.4.3.1. Préparation d'un immuno-conjugué spécifique au venin de *Cerastes cerastes* et son utilisation en ELISA sandwich

Les fragments F(ab')₂ de moyenne et haute affinité ont été couplés à la peroxydase puis testés par ELISA simple. La mise au point du test ELISA sandwich a permis d'établir au préalable certains paramètres afin de quantifier le venin et les molécules purifiées.

Le seuil de détection du test est fixé à 10 ng/mL pour le venin de *Cerastes cerastes*. Le conjugué préparé a donné un seuil de 16,19 ng/mL. La linéarité est respectée entre 10 et 100 ng/mL de concentration de venin de *Cerastes cerastes*.

L'immuno-conjugué a été utilisé à une dilution de 1/500 qui présente une bonne réactivité (R=0,9838) (Figure 43).

La spécificité de l'immuno-conjugué (1/500) préparé a été également testée vis-à-vis des venins de serpents (*Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina*) et de scorpions *Androctonus australis hector* (Figure 44 et Tableau XXII). Ce conjugué F(ab')₂ détecte le venin de *Cerastes cerastes* spécifiquement avec un titre de 3200. Les résultats montrent que l'immuno-conjugué reconnaît faiblement le venin de *Vipera lebetina*

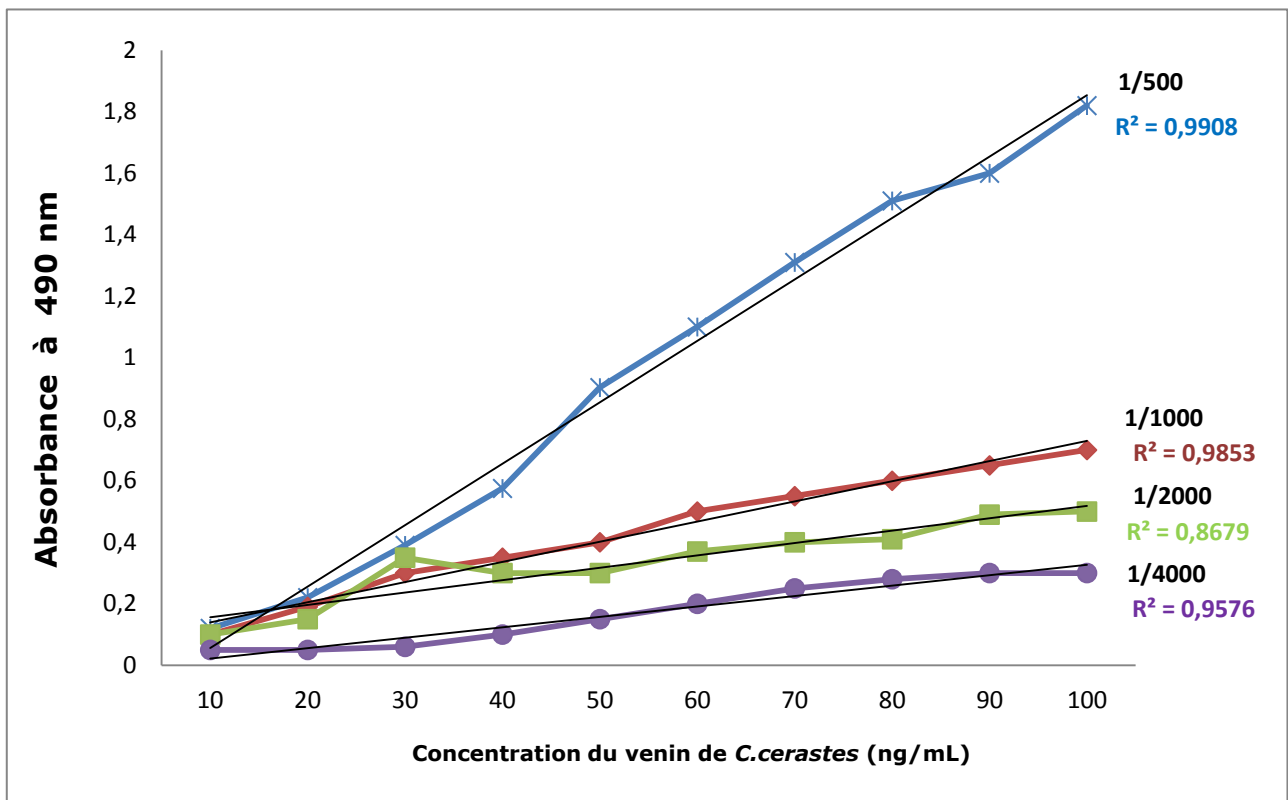


Figure 43: Détermination du titre de l'immuno-conjugué constitué de fragments $F(ab')_2$ anti-venin de *Cerastes cerastes* couplé à la peroxydase.

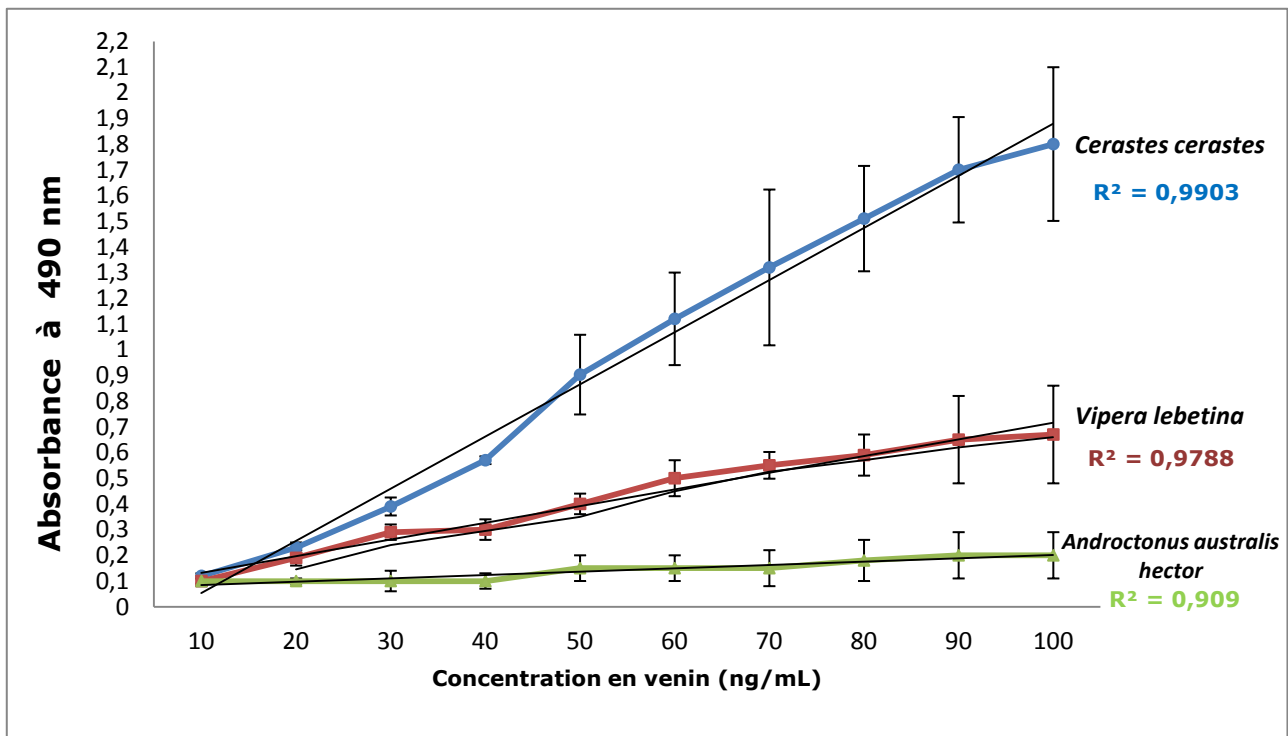


Figure 44: Evaluation de la spécificité de l'immuno-conjugué vis-à-vis des venins de vipères et de scorpion par ELISA sandwich.

Tableau XXII: Titres en anticorps d quelques immuno-conjugués vis-à-vis les espèces de venins algériens

Immuno-conjugué	Titre en anticorps (ELISA)
F(ab') ₂ anti-venin de <i>Cerastes cerastes</i> couplé à la peroxydase vis à vis le venin <i>Cerastes cerastes</i>	3 200
F(ab') ₂ anti-venin de <i>Cerastes cerastes</i> couplé à la peroxydase vis à vis le venin <i>Vipera lebetina</i>	800
F(ab') ₂ anti-venin de <i>Cerastes cerastes</i> couplé à la peroxydase vis à vis le venin <i>Androctonus australis hector</i>	200
F(ab') ₂ anti-venin d' <i>Androctonus australis hector</i> couplé à la peroxydase vis à vis le venin <i>Cerastes cerastes</i>	400
F(ab') ₂ anti-venin d' <i>Androctonus australis hector</i> couplé à la peroxydase vis à vis le venin <i>Androctonus australis hector</i>	204 800

Les mêmes résultats ont été obtenus avec les conjugués anti-venin de *Tityus serrulatus* couplé à la peroxydase, anti-venin de *Crotalus durissus* couplé à la peroxydase et anti-venin de *Bothrops* couplé à la peroxydase (Chavez-Olortegui *et al.*, 1994 et 1996). Cependant, le titre obtenu pour l'immuno-conjugué utilisé dans cette étude est quatre fois plus élevé (Cherifi, 2004).

II.4.3.2. Quantification du venin de *Cerastes cerastes* et des molécules purifiées par ELISA Sandwich

Après envenimation des animaux par voie s.c. avec une dose subléthale (1 mg/kg de masse corporelle de l'animal), des prélèvements de sang et d'organes (foie, cœur, reins, poumons, pancréas, intestins, estomac, rate et cerveau) ainsi que le tissu entourant le site d'injection ont été effectués selon une cinétique allant de 30 minutes à 7 jours. Les concentrations du venin dans les différents compartiments ont été déduites à partir d'une courbe d'étalonnage établie par ELISA sandwich.

Les résultats obtenus montrent que le venin diffuse rapidement du site d'injection vers le compartiment sérique. Une concentration maximale ($107 \pm 13,1$ ng/mL, $p < 0,01$ %) est observée à 3 heures après envenimation et diminue progressivement pour devenir presque indétectable à 3 jours (Figure 45).

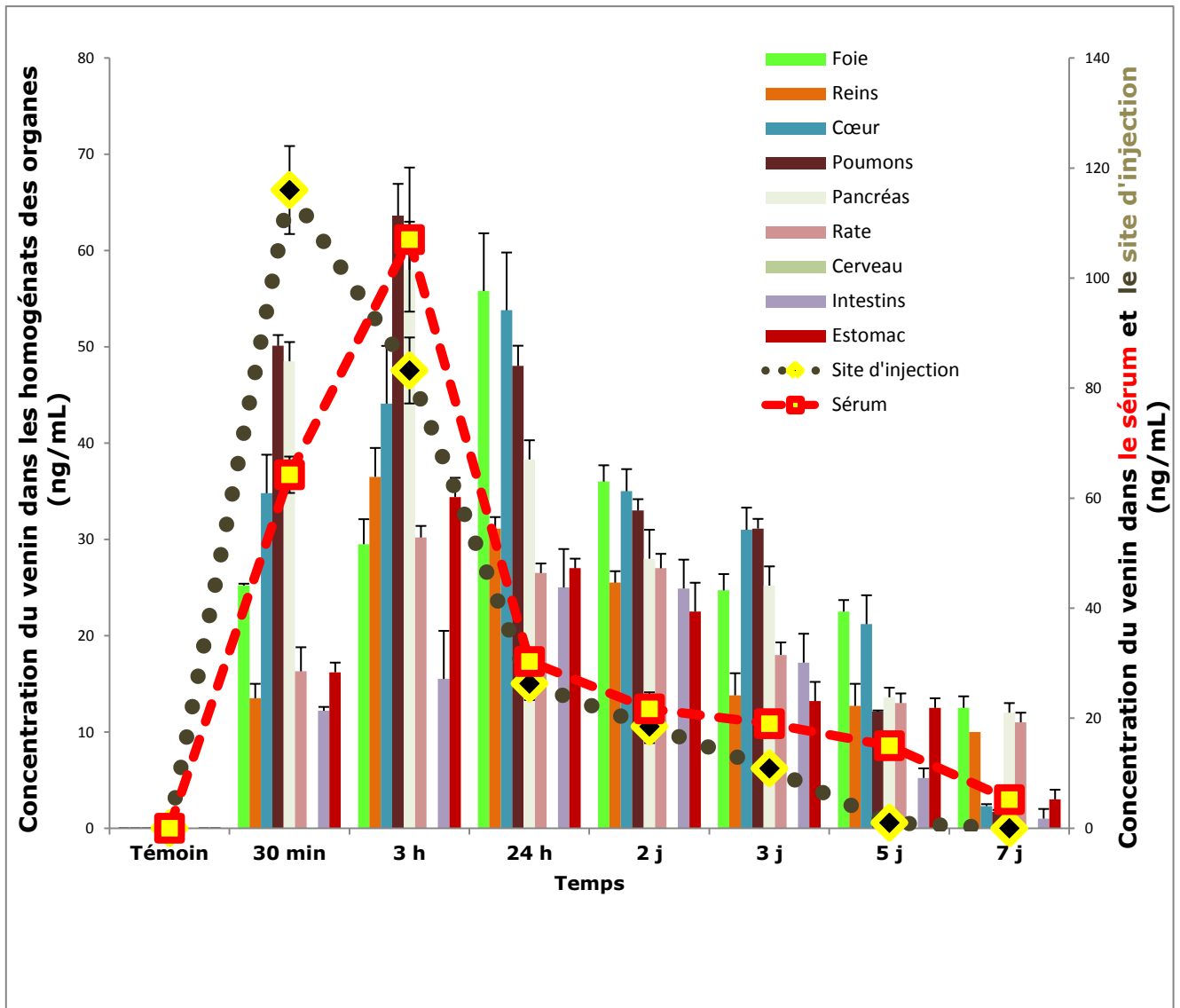


Figure 45: Etude de la cinétique de distribution du venin de *Cerastes cerastes* par ELISA sandwich au niveau des compartiments sérique et tissulaires après envenimement des rats avec une dose subléthale de 1 mg/kg de poids corporel de l'animal.

Les concentrations maximales du venin dans les autres tissus sont détectées entre 3 et 24 h d'envenimation. Un taux maximal du venin est retrouvé dans les reins ($36,5 \pm 1,5$ ng/mL) et le foie ($55,8 \pm 6,8$ ng/mL) respectivement après 3 h et 24 h d'envenimation. Les organes reins et foie, puis respectivement, dans le cœur ($53,8 \pm 6,6$ ng/mL), le poumon ($63,62 \pm 3,31$ ng/mL) et le pancréas ($58 \pm 2,1$ ng/mL) seraient les cibles de diffusion rapide du venin. Des concentrations plus faibles sont retrouvées au niveau de la rate, de l'estomac et des intestins et aucune trace de venin n'est détectée dans le cerveau. L'élimination du venin semble débiter à partir de 5 jours d'envenimation (Figure 44). Cette élimination lente du venin de *Cerastes cerastes* pourrait être expliquée par la masse moléculaire des différents constituants de ce venin.

De nombreuses études de biodistribution ont été réalisées sur les venins de serpents en utilisant le test ELISA sandwich (Ismail *et al.*, 1997; Rivière *et al.*, 1998; Rocha, 1999; Chérifi, 2004; Chérifi *et al.*, 2005; Chaou, 2005). Ces études ont montré que les venins de serpents sont rapidement absorbés au niveau du site d'injection et diffusent vers les compartiment vasculaire et tissulaires, leur élimination reste cependant très lente.

Une étude effectuée avec le venin de *Vipera aspis* radiomarqué à l'iode 125 et injecté par voie i.v. ($260 \mu\text{g}/\text{kg}$ du poids de lapin) a montré une distribution rapide avec un délai estimé à $31 \pm 8,4$ minutes déterminé par le test ELISA sandwich et $15 \pm 3,6$ minutes déterminé par radiomarquage (Rivière *et al.*, 1998). Celle réalisée sur le venin de *Walterinnesia aegyptia* ($200 \mu\text{g}$) montre une distribution rapide. En effet, un temps de $20 \pm 2,1$ minutes suffit pour que le venin soit distribué dans les compartiments vasculaire et tissulaires de lapin envenimé (Ismail *et al.*, 1997).

La distribution des molécules purifiées (CC3-SPase, CCSV-MPase et CC2-PLA₂) a été étudiée de la même manière par ELISA sandwich. Les résultats obtenus montrent que toutes les molécules sont détectées à des concentrations sériques élevées à 3 h et à 24 h (Figures 46A, 46B et 46C). Le caractère hydrophile des molécules pourrait retarder leur absorption vers certains compartiments tissulaires dont elles doivent traverser des membranes biologiques hydrophobes, ce qui contribue à maintenir leurs taux élevés dans le compartiment vasculaire.

Dans les compartiments tissulaires, des concentrations relativement élevées de CC3-SPase, CCSV-MPase et CC2-PLA₂ sont détectées à 3 h, dans les organes cibles du venin à savoir les reins, le foie, le cœur, le poumon et le pancréas.

Ces résultats montrent que l'élimination des biomolécules à travers les organes, rein et foie est un phénomène très lent comparativement à leur vitesse de distribution dans les autres tissus, ceci peut être attribué à leur masse moléculaire élevée. Ces biomolécules pourraient ne pas

être éliminées par une filtration glomérulaire dans le rein, mais plutôt par des mécanismes plus complexes.

Ces résultats semblent être en accord avec ceux obtenus avec la PLA₂ myotoxique isolée à partir du venin de *Bothrops asper* (Moreno et Guitiérrez, 1987). La radioactivité maximale de cette phospholipase marquée à l'iode est retrouvée dès 30 minutes en ordre décroissant au niveau du foie, les reins, les poumons, la rate et le sérum (Moreno et Guitiérrez, 1987).

II.5. Effet de l'immunothérapie sur la distribution, les perturbations métaboliques et inflammatoires du venin

Les immun-sérums sous forme de fragments Fab et F(ab')₂ testés par séroneutralisation ont été également utilisés afin de tester leur pouvoir neutralisant sur la distribution, les perturbations métaboliques et inflammatoires du venin de *Cerastes cerastes* (Tableau XXIII). Le test de séroneutralisation a été effectué en considérant la DL50 du venin comme étant équivalente à 48 µg/20 g de souris (2,4 mg/kg de masse corporelle), (Laraba-Djebari, 1984).

Tableau XXIII: Mesure de la capacité neutralisante des fragments Fab et F (ab')₂ spécifiques au venin de *Cerastes cerastes* par séroneutralisation

Nombre de DL50 de venin injectée	Fragments F(ab') ₂ anti-venin			Fragments Fab anti-venin		
	Nombre de souris vivantes après 24 h	Nombre de souris vivantes après 48 h	Taux de survie	Nombre de souris vivantes après 24 h	Nombre de souris vivantes après 48 h	Taux de survie
2 DL 50	4	4	100 %	4	4	100 %
3 DL 50	4	4	100 %	4	4	100 %
4 DL 50	4	4	100 %	4	4	100 %
5 DL 50	3	3	75 %	4	4	100 %
6 DL 50	2	2	50 % ^b	4	4	100 %
7 DL 50	0	0	0 %	3	3	75 %
8 DL 50	0	0	0 %	3	3	75 %
9 DL 50	0	0	0 %	2	2	50 % ^c
5 DL 50 de venin seul ^a	0	0	0 %	0	0	0 %

^a Dose utilisée comme témoin positif pour tester l'effet léthal du venin en absence d'immun-sérums.

^b Pourcentage avec lequel la nouvelle DL50 du venin a été calculée en présence des fragments F(ab')₂.

^c Pourcentage avec lequel la nouvelle DL50 du venin a été calculée en présence des fragments Fab.

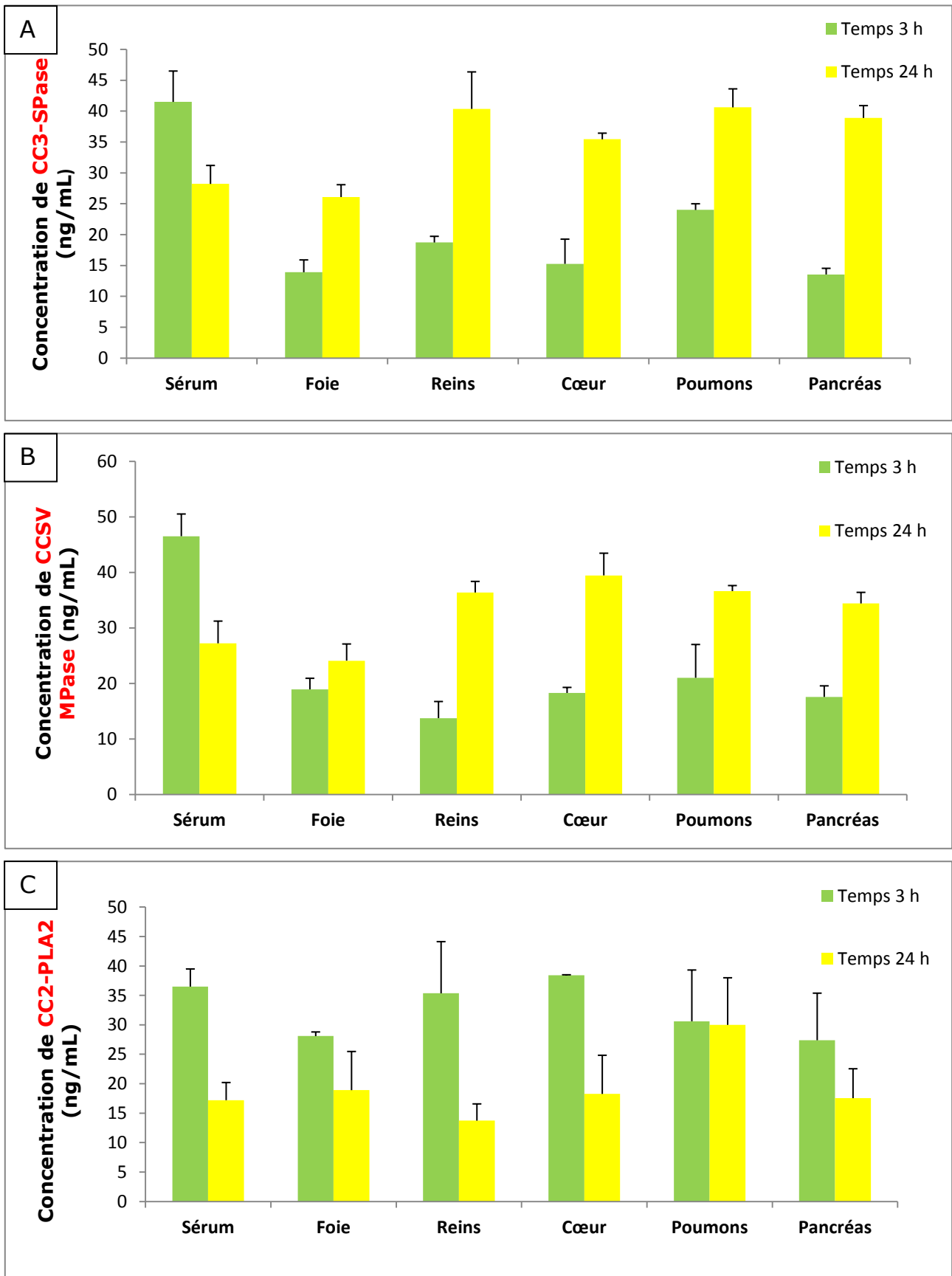


Figure 46: Détermination de la distribution des molécules purifiées, CC3-SPase (A), CCSV-MPase (B) et CC2-PLA₂ (C) dans les compartiments vasculaire et tissulaires chez le rat.

Les résultats de séroneutralisation montrent que les fragments Fab anti-venin présentent un effet protecteur jusqu'à 5 DL50 (240 µg de venin/20 g de souris). Les fragments F(ab')₂ anti-venin possèdent quant à eux un pouvoir neutralisant total de 6 DL50.

La comparaison entre la nouvelle DL50 obtenue avec l'immun-sérum expérimental Fab (432 µg/20 g de souris) et celle obtenue avec l'immun-sérum expérimental F(ab')₂ (288 µg/20 g de souris) montre une nette augmentation de l'efficacité de l'immun-sérum expérimental constitué de fragment Fab.

Des résultats similaires ont été rapportés par Clissa *et al.*, 1999. Ces auteurs ont montré qu'un volume de 1 mL de sérum anti-venin de *Crotalus durissus terrificus* ne peut neutraliser que 165 µg de ce venin.

Les effets des deux immun-sérums anti-venin constitués de fragments Fab ou F(ab')₂ (40 mg/kg) seul ou en association (Fab + F(ab')₂) administrés par voie i.p. 30 minutes après injection d'une dose subléthale du venin de *Cerastes cerastes*, sur la biodistribution du venin ont été étudiés dans le sérums des rats envenimés .

L'effet de l'administration de l'immunothérapie sous forme de fragments F(ab')₂ sur la distribution du venin, entraîne une neutralisation totale du venin circulant dans le sérum dans les 24 h qui suivent l'envenimation. Une très faible concentration du venin de *Cerastes cerastes* est encore détectée au niveau des reins (3,8 ± 1,2 ng/mL), du cœur (7,4 ± 1,4 ng/mL), des poumons (3,21 ± 1,04 ng/mL) et du pancréas (2,9 ± 3 ng/mL) (Figure 47). Les fragments Fab, quant à eux, semblent être moins efficaces car des concentrations plus élevées de venin sont retrouvées (20,5 ± 4; 16,03 ± 1,04; 14,5 ± 1 ng/mL) respectivement au niveau des organes cœur, poumons et pancréas

L'ensemble des résultats de l'administration de l'immunothérapie montre que l'injection des fragments F(ab')₂ et Fab spécifiques diminue l'antigénémie du venin de *Cerastes cerastes*, Cependant cette neutralisation reste partielle au niveau des compartiments tissulaires.

L'action de l'immunothérapie administrée sous forme de fragments Fab et F(ab')₂ a permis de révéler que les taux des paramètres métaboliques sériques diminuent considérablement par rapport à ceux obtenus avec les animaux envenimés (venin 24 heures) et atteignent des valeurs semblables à celles des rats envenimés pendant 30 minutes (Tableau XXIV). Cette neutralisation semble être meilleure avec les fragments F(ab')₂, l'association des deux types de fragments ne semble pas améliorer le traitement.

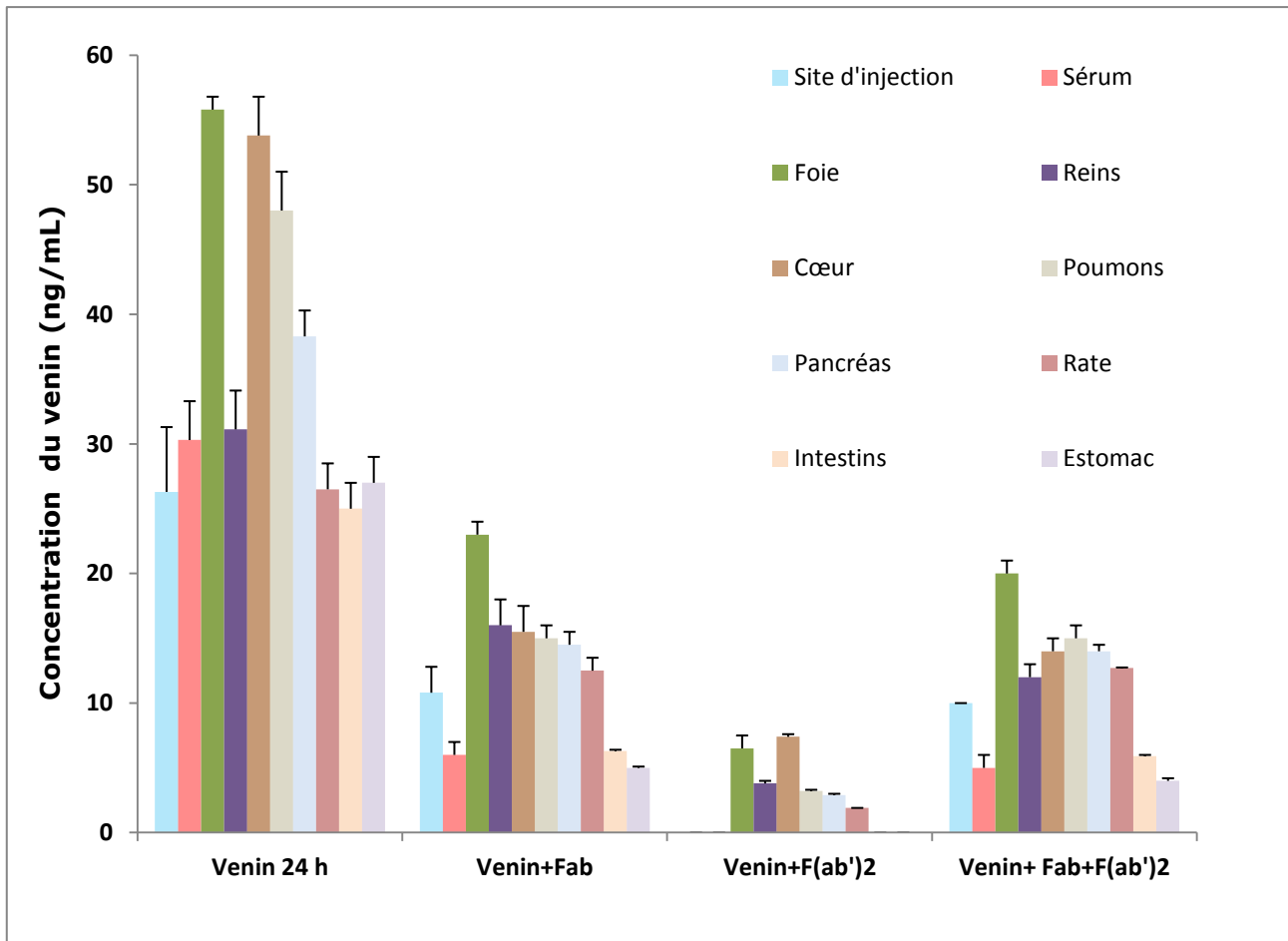


Figure 47: Effet de l'immunothérapie sur la cinétique de distribution du venin de *Cerastes cerastes* au niveau sérique et tissulaires après envenimation des rats avec une dose subléthale. Les anticorps Fab et F(ab')₂ ont été injectés soit séparément ou en association. La dose des anticorps administrée est égale à 40 mg/Kg. L'administration des anticorps est effectuée par voie i.p. 30 minutes après envenimation.

Les paramètres créatinémie et urémie restent cependant élevées et ce quelque soit le type de traitement. Les métabolites lipidiques (Cholestérolémie et Triglycéridémie) et le glucose sérique semble retourner à la normale sous l'action des fragments $F(ab')_2$.

L'effet de l'immunothérapie sur la réponse inflammatoire montre une neutralisation partielle. Le taux de l'activité lytique du système du complément reste élevé. Tandis que les taux de la peroxydase éosinophilique et la fibrinogénémie semblent revenir à la normale (Tableau XXIV).

Tableau XXIV: Effets de l'immunothérapie sur les paramètres inflammatoires et les variations sériques des rats envenimés avec une dose subléthale (1 mg/kg de rat) du venin de *Cerastes cerastes*.

		Témoin (-)	Venin 24 h [#]	Témoin (+) venin (30min)	Venin + F(ab') ₂ anti- venin ^{##}	Venin + Fab anti-venin ^{##}	Venin+ Fab + F(ab') ₂ anti- venin ^{##}
Métaboliques sériques (g/L)	Glycémie	0,51 ± 0,02	1,043 ± 0,038	0,756 ± 0,03	0,53 ± 0,083	0,59 ± 0,091	0,58 ± 0,05
	Cholestérolémie	0,72 ± 0,023	1,08 ± 0,09	0,73 ± 0,029	0,74 ± 0,02	0,80 ± 0,003	0,79 ± 0,001
	Triglyceridémie	0,63 ± 0,051	0,63 ± 0,02	0,83 ± 0,051	0,65 ± 0,021 ^b	0,61 ± 0,032 ^b	0,6 ± 0,041 ^b
	Créatinémie	0,23 ± 0,08	0,77 ± 0,024	0,33 ± 0,03	0,7 ± 0,011	0,75 ± 0,021	0,78 ± 0,034
	Urémie	0,34 ± 0,08	0,78 ± 0,1	0,47 ± 0,09	0,68 ± 0,05	0,77 ± 0,09	0,70 ± 0,023
Marqueurs inflammatoires	Fibrinogène (g /L)	4 ± 0,07	0,57 ± 0,003	1,61 ± 0,04 ^a	2,61 ± 0,01	3,01 ± 0,02	2,89 ± 0,01
	Activité lytique du complément (%)	3 ± 0,01	47,48 ± 1,47	30,64 ± 1,08	18,62 ± 0,49	35,96 ± 0,59	22,46 ± 2,85
	EPO (UA/mL)	0,233 ± 0,1	0,862 ± 0,188	0,543 ± 0,03	0,603 ± 0,13	0,743 ± 0,02	0,688 ± 0,05
	IL-6 (pg/mL)	22 ± 3	243 ± 24	198 ± 21 ^a	_____	_____	_____
	IL-10 (pg/mL) [≈]	26 ± 4	178 ± 24	33 ± 4 ^a	_____	_____	_____

- ^a Témoin (+) venin à 3 h.
- ^b Les valeurs sont identiques que le témoin(-) car à 24 heures d'envenimation il y a retour à la normale pour la triglyceridémie, donc l'effet de l'immunothérapie n'est pas évalué pour ce métabolite.
- [≈] L'IL-10 n'est pas un marqueur de l'inflammation, c'est une interleukine anti-inflammatoire.
- [#] Les résultats obtenus avec des lots de rats envenimés sont comparés statistiquement au témoin (-)
- ^{##} Les résultats obtenus avec des lots de rats traités sont comparés statistiquement au témoin (+): venin 30 minutes. * p<0,05%, **p<0,01%.

DISCUSSION GENERALE

IV. DISCUSSION GENERALE

Les venins de *Viperidae* sont riches en enzymes hydrolytiques qui produisent un tableau clinique très complexe telles que les hémorragies et les troubles de la coagulation sanguine (Rivière et Bon, 1999; Braud *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2004; Castro et Rodriguez, 2006; Kornalik, 1990; Liu *et al.*, 2006). Certains composants agissent à différentes étapes de la coagulation sanguine. Ces composants ont souvent des fonctions antagonistes, alors que certains agissent en synergie (Laraba-Djebari, 1984, Mukherjee *et al.*, 2000). Par conséquent, la toxicité des venins ne peut pas être attribuée à un composé particulier (Laraba-Djebari *et al.*, 1995). Cependant, il est déjà bien établi que certains composants du venin présentent des effets bénéfiques lorsqu'ils agissent seuls.

Le venin de *Cerastes cerastes* est un mélange de composants protéiques ayant plusieurs actions notamment sur la coagulation (Laraba-Djebari, 1984; El-Asmar *et al.*, 1990; Laraba-Djebari *et al.*, 1992 et 1995; Laraba-Djebari, 1996; El-Ayeb et Karoui, 2003). Ces protéines peuvent être des hémorragines induisant des troubles de la perméabilité capillaire, des désintégrines ou des protéines apparentées, qui perturbent l'hémostase primaire en agissant sur l'adhésion plaquettaire. Ainsi, une même molécule peut être douée de plusieurs activités. Les différences structurales existant entre les protéines, les facteurs naturels de l'hémostase, ainsi que la multiplicité des cibles des constituants d'un même venin, sont des éléments qui pourraient expliquer l'efficacité partielle de l'immunothérapie (Mion *et al.*, 2002).

Les fibrinogénases (Serine-protéases ou Métalloprotéines) sont largement répandues dans les venins des *Viperidae*. Elles hydrolysent le fibrinogène et/ou le forment et dégradent le caillot de fibrine, renforçant ainsi l'effet hémorragique des métalloprotéinases ce qui donne lieu à des saignements pathologiques.

Dans cette étude, deux protéases fibrinogénases (CC3-SPase et CCSV-MPase) et une phospholipase anticoagulante (CC2-PLA₂) ont été purifiées et caractérisées. Leur analyse protéomique a permis de montrer qu'elles sont nouvellement identifiées dans le venin de *Cerastes cerastes*. La CC3-SPase et la CCSV-MPase présentent des masses moléculaires déterminées par spectrométrie de masse, respectivement de 40 et 70 kDa. La masse moléculaire de la phospholipase CC2-PLA₂ est de 14 kDa.

La purification de la CC3-SPase a révélé une activité spécifique de 20,46 unités/mg/min. La molécule représente 1,34% de l'activité protéolytique totale du venin et 1,21 % de son poids total. La deuxième molécule, CCSV-MPase, quant à elle, est purifiée avec un rapport d'activité de 0,95 %, son activité spécifique est de $34,40 \times 10^{-1}$ unités/mg/min. Elle représente 1,22 % de l'activité protéolytique totale du venin et 0,13 % de son poids. La troisième molécule, CC2-PLA₂ présente un rapport d'activité de 0,06 % et une activité spécifique de 51,5 unités/mg/min.

Le facteur de purification de cette molécule est de 50 et elle représente 5,9 % de l'activité phospholipasique totale du venin et 0,118 % de son poids.

La détermination structurale de la phospholipase A₂ (CC2-PLA₂) a été réalisée par LC-MALDI-MS/MS. La protéine est identifiée à l'aide d'une base de données utilisant la banque NCBI. L'analyse LCMS/MS des fragments tryptiques de cette molécule a montré des similitudes de séquences avec d'autres PLA₂ isolées d'autres venins de serpents. Parmi ces enzymes, il y a, I2 ammodytin (A) [*Vipera berus berus*] (gi |50874464|), la phospholipase A₂ [*Vipera ammodytes*](gi| 6967298|) I2 ammodytin (A) isoforme [*Vipera ammodytes ruffoi*] (gi |50874456|), I2 ammodytin (C) isoforme [*Vipera ammodytes meridionalis*] (gi |50874498|).

L'analyse protéomique a permis de montrer que la CC2-PLA₂ purifiée dans cette étude est une nouvelle molécule, qui ne présente que 51 % d'homologie de séquence avec la phosphatidylcholine 2-acylhydrolase précédemment purifiée à partir du même venin Algérien *Cerastes cerastes* par Laraba-Djebari et Martin-Eauclaire en 1990, (gi |129506|), soit avec 61/120 résidus d'acide aminés en commun entre les deux PLA₂.

Les protéases (CC3-SPase et CCSV-MPase) présentent une importante activité caséinolytique comparable à celle du venin total. La CC3-SPase est douée d'une activité arginine ester hydrolase alors que la CCSV-MPase ne l'est pas. Ces deux molécules présentent une forte activité amidolytique similaire à celle du venin total.

L'utilisation des inhibiteurs spécifiques aux serine-protéinases et aux métalloprotéinases a montré que CC3-SPase serait une sérine-protéinase de type thrombine Ca²⁺-dependante. Une étude réalisée sur l'afaâcysteine isolée à partir du venin de *Cerastes cerastes*, a montré que l'ion Ca²⁺ est indispensable pour l'activité non seulement en tant que cofacteur mais dans la stabilité ou la cohésion structurale de la molécule enzymatique (Laraba-Djebari *et al.*, 1995). La CCSV-MPase semble être une métalloprotéinase zinc-dependante car les chélateurs des métaux, l'EDTA et le 1,10-phenantroline inhibent totalement l'activité protéolytique de la CCSV-MPase. Ceci suggère aussi que contrairement à CC3-SPase, le Ca²⁺ n'est pas requis pour son activité catalytique. La sensibilité de la serine-protéinase CC3-SPase, aux inhibiteurs spécifiques de la thrombine (héparine et anti-thrombine III) pourrait indiquer que la CC3-SPase possède des récepteurs identiques à ceux de la thrombine vis-à-vis ces récepteurs. Les propriétés coagulantes d'Afaâcysteine isolée à partir du venin *Cerastes cerastes*, insensible aux inhibiteurs plasmatiques spécifiques à la thrombine, seraient d'autant plus intéressantes qu'elle pourrait servir en tant qu'agent hémostatique dans certains cas d'hémorragie; telles que la thrombopénie dans des situations post-opératoires (Laraba-Djebari *et al.*, 1995; Laraba-Djebari, 1996).

L'activité de CC3-SPase et CCSV-MPase sur le fibrinogène a également été testée. La serine-protéinase hydrolyse la molécule du fibrinogène en agissant sur les deux chaînes α et β de ce substrat provoquant ainsi la formation d'un caillot de fibrine fragile au cours du temps. La CCSV-MPase, quand elle, agit sur la chaîne β du fibrinogène entraînant la libération uniquement du fibrinopeptide B.

Deux enzymes de type thrombine ont été isolées à partir du venin de *Cerastes cerastes*, RP34 (Laraba-Djebari *et al.*, 1992) et afaâcytine (Laraba-Djebari *et al.*, 1995). Afaâcytine est un composant mineur du venin (2 % w/w) et hydrolyse le fibrinogène de la même manière que CC3-SPase en dégradant tout d'abord la chaîne α et puis 24 heures plus tard, elle dégrade la chaîne β aboutissant à un caillot non stable. Ceci permet de déduire que CC3-SPase comme afaâcytine, elle est incapable d'activer le facteur XIII responsable de la stabilité du caillot de fibrine (Laraba-Djebari *et al.*, 1995; Chérifi et Laraba, 2008).

La métalloprotéinase CCSV-MPase clive seulement la chaîne B β du fibrinogène et ne présente aucune activité sur les chaînes A α et γ , ceci est en désaccord avec les résultats des autres SVMPs qui présentent une activité fibrinogénolytique en hydrolysant préférentiellement la chaîne A α . Toutefois, ces molécules appartiennent à la classe PI des SVMPs, constituées uniquement du domaine métalloprotéinase (Castro *et al.*, 2004), comme c'est le cas de la lebetase purifiée à partir du venin de *Vipera lebetina* (Siigur *et al.*, 1998), la fibrolase de *Akgistrodon c. contortrix* (Retzios *et al.*, 1994), la neuwiedase de *Bothrops neuwiedi* (Rodrigues *et al.*, 2000) l'atroxase de *Crotalus atrox* (40), la piscivorase II de *Akgistrodon piscivorus piscivorus* (Hahn *et al.*, 1995) et la leucurolysin du venin de *Bothrops leucurus* (Bello *et al.*, 2006).

Les propriétés de CCSV-MPase et CC3-SPase pourraient permettre leur utilisation comme agents thérapeutiques dans certaines pathologies nécessitant l'administration des anti-coagulants.

La plupart des enzymes de type thrombine isolées à partir des venins de serpents agissent sur le fibrinogène en hydrolysant une seule chaîne plutôt que les deux, bien que le site de clivage soit le même (Arg16-Gly17) sur la chaîne α et (Arg15-Gly16) sur la chaîne β , libérant soit le fibrinopeptide A ou le fibrinopeptide B. Iwasaki et collaborateurs (1990) ont montré que les enzymes de type thrombine dégradent principalement la chaîne α . Les molécules qui sont β fibrinogénases ne permettent pas la formation de caillot. Ceci est en accord avec CCSV-MPase qui dégrade exclusivement la chaîne β du fibrinogène. Tandis que CC3-SPase provoque la coagulation du sang d'une manière rapide par rapport la thrombine humaine. En effet, le temps de coagulation avec cette serine-protéinase est de l'ordre de $13,63 \pm 1$ secondes comparée à celui de la thrombine qui est de $21,73 \pm 3$ secondes.

L'activité coagulante de la CC3-SPase a été également testée sur des plasmas humains déficients en facteurs de coagulation (plasmas déficients en facteurs II et VII à 5 % et à 29 % de déficience). La CC3-SPase permet un raccourcissement du temps de coagulation des plasmas déficients en facteur II et VII mais avec un caillot fragile par rapport à celui formé avec le plasma normal. Le temps de coagulation du plasma déficient en facteur II est similaire à celui obtenu avec le plasma normal après action de la serine protéase CC3-SPase, ceci suggère que cette molécule est capable de se substituer aux facteurs IIa et VII.

Les venins de *Viperidae* sont de nature hémorragique. L'hémorragie se présente localement au niveau du site de la morsure, puis devient systémique en s'étendant vers les différents organes après diffusion du venin. Dans cette étude, l'activité hémorragique du venin de *Cerastes cerastes* et de la métalloprotéinase CCSV-MPase a été évaluée. Les résultats ont montré que la molécule CCSV-MPase n'est pas douée d'activité hémorragique quelque soit la dose injectée, alors que le venin de *Cerastes cerastes* présente un pouvoir hémorragique même à faible dose (Chérifi *et al.*, 2010). Une envenimation expérimentale avec le venin *Cerastes cerastes* a montré qu'il est fortement hémorragique et sa dose minimale hémorragique est de 3 µg/20 g de masse corporelle de l'animal (Abib et Laraba-Djebari, 2003; Chérifi, 2004; Oussedik-Oumehdi et Laraba-Djebari, 2008, Boukhalfa-Abib *et al.*, 2009). L'utilisation d'anticorps dirigés contre le venin brut sous forme d'un traitement spécifique après envenimation a indiqué que l'hémorragie n'a été que partiellement neutralisée, il serait donc plus approprié d'utiliser la CCSV-MPase comme antigène pour produire un antisérum efficace afin de traiter l'hémorragie induite par le venin (Chérifi *et al.*, 2010). Un immun-sérum produit avec une métalloprotéinase a déjà fait ses preuves avec la mutalysin-II et la neuwiedase non-hémorragiques isolées à partir des venins de *Lachesis muta* et de *Bothrops neuwiedi* respectivement (Estevao-Costa *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2001).

Les venins de *Viperidae* sont également impliqués dans les perturbations de l'hémostase. Dans cette étude, l'action de la phospholipase CC2-PLA₂ et de la serine-protéinase CC3-SPase sur la fonction des plaquettes a été étudiée. En présence de CC2-PLA₂, une réduction significative de l'agrégation des plaquettes induite par l'acide arachidonique (95 à 100 %) est observée. Alors que la protéinase CC2-SPase est capable d'induire l'agrégation des plaquettes à une quantité faible. Il apparaît alors que ces deux molécules exercent des effets antagonistes sur les plaquettes sanguines.

Plusieurs PLA₂ anti-coagulantes ont été isolées et bien caractérisées à partir des venins de serpents. Récemment, une nouvelle PLA₂ anti-coagulante a été isolée et caractérisée comme étant inhibitrice du complexe prothrombinase par le biais de sa liaison spécifique au FX (Saul *et al.*, 2010). Ammodytoxine A (Atxa) et son isoforme naturelle Ammodytoxine C ont été isolées du venin de *Vipera ammodytes ammodytes*, elles appartiennent au groupe IIA des phospholipases sécrétées. Ces deux isoformes ne diffèrent que par deux résidus d'acides

aminés (Phe 124> Ile et Lys128> Glu), mais présentent des différences importantes dans la toxicité. Le mécanisme par lequel elles bloquent la coagulation a été élucidé. Des expériences de compétition utilisant la résonance plasmonique de surface montrent une inhibition complète de la liaison à Atxa FXa par la calmoduline (CaM). La structure cristalline a montré que la région C-terminale requise pour la liaison au FXa et la CaM, est fortement exposée et accessible à l'interaction avec les récepteurs protéiques dans les formes monomères et dimères de l'ammodytoxine (Saul et al., 2010)..

Plusieurs cytokines sont impliquées dans le processus inflammatoire induit lors des envenimations vipérines. La détermination de la concentration sérique des cytokines permet de comprendre le processus inflammatoire. Cette étude a montré également que CC3-SPase et CC2-PLA₂ induisent une réponse inflammatoire systémique qui semble être comparable à celle induite par le venin total. Cette inflammation se traduit par une infiltration des leucocytes dans le sang périphérique notamment les neutrophiles, une activation du système du complément et une augmentation de l'activité de peroxyde éosinophile pulmonaire et la libération des interleukines IL-6 et IL-10. Parmi toutes les cytokines pro-inflammatoires libérées lors des envenimations vipérines, l'IL-6 présentant un taux relativement élevé, a toujours été considérée comme un marqueur de sévérité des envenimations.

L'activité de la peroxydase éosinophilique (EPO) a permis d'évaluer la séquestration des polynucléaires éosinophiles dans le tissu pulmonaire, au vu de la présence spécifique de cette enzyme dans les granules azurophiles des éosinophiles. L'EPO génère des radicaux libres qui exercent des effets cytotoxiques.

Une étude portant sur la biodistribution du venin de *Cerastes cerastes* et des trois molécules purifiées a été effectuée dans les différents compartiments des rats.

Un test ELISA sandwich a été utilisé afin de quantifier les venins dans les sérums et les homogénats d'organes des animaux envenimés ou traités avec les biomolécules. Les résultats obtenus montrent que le venin de *Cerastes cerastes* et les trois molécules (CC3-SPase, CC3-MPase et CC2-PLA₂) diffusent rapidement du sérum vers les tissus des rats envenimés. Une concentration maximale sérique est atteinte au bout de 3 heures pour le venin et la phospholipase CC2-PLA₂ et 24 heures pour les deux protéinases. Les reins, le foie, les poumons, le cœur et le pancréas, seraient les principaux organes cibles pour le venin de *Cerastes cerastes* ainsi que pour ses molécules. Le foie par sa fonction de détoxification, constitue un passage obligatoire à toute substance toxique ou non toxique.

L'absence du venin et de ses molécules dans le cerveau est attribuée à la présence de la barrière hémato-lymphatique qui empêcherait le passage des toxines du venin au cerveau (Revelo et al., 1996; Selvanayagam et al., 1999). Le même résultat a été décrit avec le venin de *Vipera lebetina*. La quantification de ce venin par ELISA sandwich a montré que ses constituants n'ont pas pu traverser la barrière hémato-lymphatique pour rejoindre le compartiment cervical (Chaou et al., 2006; Chaou, 2006).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Rivière et collaborateurs (1998) qui ont montré que la concentration plasmatique maximale du venin de *Vipera aspis* injecté par voie intraveineuse, est retrouvée à 0,53 heures alors qu'il est éliminé après 12 heures d'envenimation. Cette étude indique que le venin injecté par voie intra-veineuse est éliminé plus rapidement que lorsqu'il est injecté par voie intra-musculaire mimant une envenimation accidentelle, le temps de demi-vie d'élimination étant de 30 heures dans le cas où la voie d'injection est musculaire.

La quantification du venin de *Cerastes cerastes* au niveau du compartiment vasculaire a permis d'observer une concentration maximale qu'au bout de 3 heures d'envenimation. Ce résultat indique que l'absorption du venin à partir du site d'injection vers le compartiment vasculaire est un phénomène rapide comparativement à sa vitesse d'élimination (Rivière *et al.*, 1998). Ceci est en parfait accord avec les observations cliniques qui montrent, dans le cas d'envenimation par *Vipera aspis*, que les symptômes apparaissent lentement et se manifestent durablement (Audebert *et al.*, 1992).

Au vu des résultats obtenus, il semblerait que le venin de *Cerastes cerastes* suit une cinétique comparable à celle de la plupart des venins de serpents (*Viperidae*). Des études expérimentales de toxicocinétiques ont été réalisées chez l'animal avec plusieurs venins de serpents, elles ont permis de déterminer un certain nombre de paramètres qui pourraient aider à la compréhension du mécanisme d'action (Audebert *et al.*, 1994; Ismail *et al.*, 1996 et 1998). Ces études montrent que la distribution des composants des venins de *Walterinnesia aegyptia* (Ismail *et al.*, 1998) et de *Vipera aspis* (Audebert *et al.*, 1994) est rapide, elle est comprise entre 0,2 et 0,5 heures et que leur demi-vie d'élimination est plus lente (10 à 40 heures) alors que la fraction du venin résorbée à partir du site d'injection varie d'un venin à un autre. Elle est de 65 % dans le cas du venin de *Vipera aspis* (Audebert *et al.*, 1994) et de 90 % dans le cas du venin de *Walterinnesia aegyptia* (Ismail *et al.*, 1998).

L'administration de l'immunothérapie provoque une redistribution du venin du compartiment extravasculaire vers le compartiment vasculaire, ce même résultat a été observé par Pépin-Cavatta et Collaborateurs, (1997) avec des fragments $F(ab')_2$ administrés par voie intraveineuse.

Les paramètres nécessaires à une meilleure administration de la sérothérapie antivenimeuse (dose minimale effectrice, délai optimal d'administration du sérum antivenimeux après l'envenimation, voie d'administration, types de fragments à utiliser) ont été étudiés par Rivière et collaborateurs (1997). Les résultats obtenus révèlent que pour que l'immunothérapie soit efficace dans les cas d'envenimation vipérine, une quantité neutralisante de sérum antivenimeux doit être injectée par voie intraveineuse sous forme de fragments $F(ab')_2$ dans les minutes qui suivent l'envenimation.

Les travaux de Pépin-Covatta et Collaborateurs (1995), ont montré que les fragments d'anticorps d'un anti-venin injectés par voie intra-musculaire, sont lentement absorbés vers le compartiment central et 50 % d'entre eux atteignent ce compartiment. Leur biodisponibilité est de 95 % et leur concentration plasmatique est immédiatement maximale, après une injection intraveineuse, ce qui pourrait expliquer que l'anti-venin est moins efficace lorsqu'il est utilisé par voie intra-musculaire que par voie intraveineuse.

Une étude comparative des effets neutralisants des fragments Fab et $F(ab')_2$ réalisée par Ismail et Abd-Elsalam (1998) a montré que les fragments $F(ab')_2$ se sont montrés plus efficaces à neutraliser le venin que les fragments Fab. Ces différences d'effets entre Fab et $F(ab')_2$ sont expliqués par les effets pharmacocinétiques. Les fragments Fab ont une vitesse d'élimination plus rapide que celle des fragments $F(ab')_2$, ils sont donc éliminés de l'organisme avant le venin, ce qui explique leur action « fugace » (Karlson-Stiber *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1997).

CONCLUSION
ET
PERSPETIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse a porté sur l'étude des molécules pharmacologiquement actives isolées à partir du venin de *Cerastes cerastes*. Nous rapportons dans ce manuscrit, la purification et l'identification de trois hydrolases; une phospholipase (CC2-PLA₂) et deux protéinases fibrinogénases (CC3-SPase et CCSV-MPase). Leur analyse protéomique a permis de montrer qu'il s'agit de nouvelles molécules identifiées dans le venin de *Cerastes cerastes*.

La biodistribution et les effets de ces trois molécules sur les processus hémostatique, inflammatoire et métabolique ont été également rapportés. L'effet de l'immunothérapie antivenimeuse utilisant deux types de fragments F(ab')₂ et Fab a été également entreprise.

L'analyse protéomique et l'utilisation de certains inhibiteurs spécifiques aux sérine-protéinases et aux métalloprotéinases ont permis de révéler que CC3-SPase est une sérine-protéinase ayant une masse moléculaire estimée à 40 kDa et que CCSV-MPase est une zinc-métalloprotéinase de masse moléculaire estimée à 70 kDa. CC3-SPase appartient alors au groupe III des SVMPs bien qu'elle soit non-hémorragique. La masse moléculaire de la phospholipase CC2-PLA₂ étant estimée à 14 kDa par spectrométrie de masse MALDI.

La recherche des homologues de séquence avec d'autres molécules de type PLA₂ isolées à partir des venins de serpents a été effectuée par LCMS/MS. Cette analyse a montré qu'il existe une homologie de séquence de 51% entre CC2-PLA₂ et la phosphatidylcholine 2-acylhydrolase précédemment purifiée à partir du même venin Algérien *Cerastes cerastes* par Laraba-Djebari et Martin- Eauclair en 1990, (gi |129506|), soit 61/120 résidus d'acide aminés sont communs entre les deux PLA₂.

La caractérisation de ces molécules (CC3-SPase, CCSV-MPase et CC2-PLA₂) a permis de montrer qu'elles sont impliquées dans les perturbations de la coagulation provoquée par le venin. Ce qui a permis de mieux comprendre certains effets du venin et pourrait aider à une meilleure prise en charge des victimes envenimées accidentellement de manière plus efficace en connaissant les symptômes

La caractérisation biologique de ces molécules a permis de montrer que le fibrinogène représentait une cible principale pour les deux protéases CC3-SPase et CCSV-MPase. La CC3-SPase est une $\alpha\beta$ fibrinogénase et induit la formation d'un caillot fragile. La métalloprotéinase, quant à elle, agit uniquement sur la chaîne β du fibrinogène. Le taux du fibrinogène plasmatique semble considérablement diminué lorsque les animaux sont traités avec ces deux molécules. CC3-SPase et CCSV-MPase, de part leur activité d'hydrolyse du fibrinogène pourraient être utilisées comme outils thérapeutiques en tant qu'agents défibrinogénants. La CC3-SPase semble se substituer aux facteurs IIa et VII vu le raccourcissement du temps de

coagulation pour ces plasmas déficients. En plus de ces activités, la CC3-SPase est capable d'induire l'agrégation des plaquettes. La CC2-PLA₂ quant à elle, semble avoir un effet antagoniste à la CC3-SPase.

Les deux molécules CC3-SPase et CC2-PLA₂ induisent également une réponse inflammatoire locale et systémique. Cette inflammation se traduit par une infiltration des leucocytes dans le sang périphérique, une libération de l'interleukine IL-6, une activation du système protéique du complément et une augmentation de l'activité de peroxyde éosinophile pulmonaire. Parmi toutes les cytokines pro-inflammatoires libérées lors des envenimations vipérines, l'IL6 présentant un taux relativement élevé a toujours été considérée comme un marqueur de sévérité des envenimations. La plupart de ces effets ont été neutralisés par les fragments F(ab')₂ anti-venin alors que les fragments Fab anti-venin ne présentent qu'une neutralisation partielle.

La biodistribution du venin et les trois molécules purifiées a montré une diffusion rapide du sérum vers les tissus des animaux traités. Une concentration maximale sérique est atteinte au bout de 3 heures pour le venin et la phospholipase CC2-PLA₂ et 24 heures pour les deux protéinases. Cette étude de distribution a montré également que les cibles principales du venin ainsi que ses trois molécules sont essentiellement les reins, le foie, les poumons, le cœur et le pancréas. Une élimination très lente du venin et des molécules a été observée, en comparaison à leur vitesse de distribution.

Cette étude pourrait contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de fonctionnement des serine protéinases, des métalloprotéinases et des phospholipases. Elle pourrait être utile dans le développement d'agents thérapeutiques liés à des troubles thrombotiques telles que les affections thrombo-emboliques

PERSPECTIVES

Au vu des résultats obtenus, il serait intéressant en continuité de ce travail de :

- Etudier la relation structure-fonction des molécules par les techniques de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ou par cristallographie.
- Approfondir l'étude des mécanismes hémostatiques et inflammatoires induits par ces trois molécules purifiées.
- Utiliser l'action des molécules antagonistes et/ou anti-inflammatoires qui permettraient d'élucider les mécanismes cellulaires des perturbations causées par le venin et/ou ses molécules purifiées.
- Analyser la capacité de la CC2-PLA₂ à inhiber la coagulation sanguine par le biais de sa fixation sur le facteur plasmatique X par Résonance plasmonique de surface.
- Etudier l'action des molécules purifiées sur des cultures cellulaires afin de déterminer leurs cible(s) cellulaire(s) ou moléculaire(s)

D'autre part, il serait également intéressant de :

- Identifier et Purifier d'autres molécules impliquées dans les processus hémostatique et inflammatoires, à partir du venin de *Cerastes cerastes*. Ces nouvelles molécules pourraient contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu lors d'une envenimation ophidienne. Il en résulterait éventuellement la conception de nouvelles molécules d'intérêt pharmacologique ou diagnostique.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A -

Abib, H. (2002). Etude biochimique et histopathologique des effets œdématisant, hémorragique et myonécrotique causés lors d'une envenimation expérimentale avec le venin natif et détoxifié de la vipère à cornes *Cerastes cerastes*. *Thèse de Magister, USTHB, Alger*. 129 p.

Abib, H., Laraba-Djebari, F., (2003). Effect of ^{60}Co gamma radiation on toxicity and haemorrhage, myonecrotic and edema-forming activities of *cerastes cerastes* venom. *can.j.physiol.pharmacol.81: 1141-1147*.

Abroug, F., Ayari, Nouria, S., Amaral, C.F.S, Boudjidria, R., Elatraus, S., (1995). Assesment of left ventricular function in severe scorpion intensive. *Care. Med. 21 : 629-635*.

Acosta De Perez, O. C., koscinczuk, P., Teibler, P., Negerette, M.S., Ruiz, R., Marunak, S., Bogarin, G. (1998). Hemorrhagic and edema-forming activity and histological changes in the mouse foot pad induced by venoms from argentinean *bothrops* and *crotalus* genus. *Toxicon 36: 1165-1172*.

Alexander, G., Grothusen, J., Zepeda, H., Schwartzman, R.J. (1988). Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon 26 (10): 953-960*.

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

Angulo, Y., Chaves, E., Alape, A., Rucardo, A., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. (1997). Isolation and characterization of a myotoxic phospholipase A₂ from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) schlegelii* from Costa Rica. *Arch. Biochem. Biophys 339: 260-266*

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*.

Anderson, S.G., Ownby, C.L. (1997). Systemic haemorrhagic induced by proteinase H from *Crotalus odamanteus* (eastern diamond rattlesnake) venom. *Toxicon 35 (8): 1301-1313*.

Andreas, R.K., Booth, W.J., Gorman, J.J., Castaldi, P.A., Berndt, M.C. (1993). Purification of botrocetin from *Bothrops jararaca* venom: Analysis of botrocetin-mediated interaction between Von Willebraud factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Biochemistry* 18: 8317-8326.

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

Audebert, F., Grosslet, O., Sabouraud, A., Bon, C. (1993). Quantitation of venom antigens from European vipers in human serum or urine by ELISA. *Journal of analytical Toxicology* 17: 236-240.

Audebert, F., Sorkine, M., Robbe-Vincent, A., Bon, C. (1994 a). Viper bites in France; Chemical and biological evaluation: kinetics of envenomation. *Hum and Experimental Toxicology* 13: 683-688.

Audebert, F., Urtizberea, M., Sabouraud, A., Schermann, J.M., Bon, C. (1994 b). Pharmacokinetics of *Vipera aspis* venom after experimental envenomation in rabbits. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 268: 1512-1517.

Aung-Khin, M. (1978). Histological and Ultrastructural changes of kidney in renal failure after viper envenomation. *Toxicon* 16: 71-75.

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 (2): 259-265.

- B -

Babu, A.S., Gowda, T.V. (1991). Effects of modification on enzymatic and toxicological properties of phospholipase A₂ from *Naja naja naja* and *Vipera russelli* snake venom. *Toxicon* 29: 1251- 1262.

Basheer, A.R., El-Asmar, M.F., Sostan, G. (1995). Characterization of a potent platelet aggregation inducer from *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) venom. *Biochim. Biophys Acta* 1250: 97-109.

Bellfleur, J.P., Le Dantec, P. (2005). Prise en charge hospitalière des morsures de serpents en Afrique. *Manuscript N°275, 2-5.*

Bello, C. A., Hermogenes, A. L., Magalhaes, A., Veiga, S. S., Gremski, L. H., Richardson, M., Sanchez, E. F. (2006). *Biochimie 88: 189–200.*

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

Bieber, A. L. (1979). In: Lee CY (ed) Snake venoms. *Springer, Berlin, pp 295–304.*

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

Bon, C., Arocas, V., Braud, S., Francischcti, I., Leduc, M. (2000). Snake venom in thrombosis and haemostatis. *XIIth word congress of the International Society of Toxinologie, Paris, September: 18-22.*

Borkow, G., Gutierrez .J.M., Ovadia, M. (1995). In vitro activity of a BaH-1, the main haemorrhagic toxin of *Bothrops asper* snake venom on bovine endothelial cells. *Toxicon 32: 1387-1391.*

Bortholomew, C., Murphy, J.J., Jankey, W., Hanchiad, B., Fitzgerald, O., Mageeney, K.F. (1977 a). Experimental acute pancreatitis produced by scorpion venom. *Ir. J. Med. Sci: 146-147.*

Bortholomew, C., Murphy, J.J., Mageeney, K.F., Fitzgerald, O. (1977 b). Exocrine pancreatic reponse to the venom of the scorpion *Tityus trintiatis*. *Gut 618 – 623.*

Bortoleo, R.K., Murakami, T., Watnabe, L., Soases, A.M., Arni, R. K. (2002). Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom *Bothrops jararacussu*. *Toxicon 40: 1307-1312.*

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., Parry, M.A.A., Maroun, R., Bon, C., Wisner, A. (2000 a). The contribution of residues 192 and 193 to the specificity of snake venom serine proteinases. *J. Bid. Chem. 275: 1823-1828.*

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

- C -

Castro, H. C., Zingali, R. B., Albuquerque, M. G., Pujol-Luz, M., Rodrigues, C. R. (2004). *Cell Mol Life Sci* 61: 843-856.

Castro, H. C., Rodriguez, C. (2006). *Toxin Rev* 25: 291-381.

Cardoso, J. L.C, Fan, H.W., França, F.O.S., Jorge, M.T., Leite, R.P., Nishioka, S.A., Avila, A., Sano-Martinez, I.S., Tony, S.C.B., Santoro, M.L., Chudzinski, A.M., Castro, S.C.B., Kamiguti, A.S., Klen, E.M.A., Hirata, M.H., Mirandola, R.M.S., Theakston, R.D.G., Warrel, D.A. (1993). Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by Lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. *Q. J. Med* 86: 315-325.

Coldéron, L., Lomonte, B., Gutiérrez, J.C., Tarkowski, A., Hanson, L.A. (1993). Biological and biochemical activities of *Vipera berus* (European viper) venom. *Toxicon* 31 (6): 743-753.

Chakrabarty, D., Datto, K., Gomes, A., Bhattacharya, D. (2000). Haemorrhagic protein of Russell's viper venom with fibrinolytic and esterolytic activities. *Toxicon* 38 (11): 1475-1490.

Chaou, N., Chérifi, F., Laraba-Djebari, F. (2006). Effets de l'immunothérapie antivenimeuse sur les désordres hépatiques induits par une envenimation vipérine. Rencontres en toxicologie, « Toxines et cancer » *Lavoisier, Editions TEC et DOC* 323-326.

Chaves, F., Gutiérrez, J.M., Brenes, F. (1992). Physiological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of snake *Bothrops asper* (tercipelo). *Toxicon* 30: 1099-1109.

Chaves, F., Barboza, M., Gutierrez, J. M. (1995). Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* in mice: *Toxicon* 33: 31-39

Chaves, F., Léon, G., Alvarado, V. H., Gutiérrez, J. M. (1998). Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A₂ isolated from the venom of snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 36: 1861-1869.

Chavez-Olortegui, C., Fonseca, S. C., Dias, M. M., Campolina, D., Amaral, C. F. S., Diniz, C. R. (1994). ELISA for the detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 32: 331-339

Chérifi, F. (2004). Etude pharmacologique et biodistribution du venin de *Cerastes cerastes* dans les différents compartiments tissulaires de la souris envenimée. Thèse de magister, USTHB, 247 pp.

Chérifi, F., Saci, A., Chaou, N., Laraba-Djebari, F. (2005). Application du test ELISA sandwich pour la quantification des venins de *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina* dans les compartiments vasculaire et tissulaires de la souris. *Journal Algérien de Médecine*.

Chérifi, F., Laraba-Djebari, F. (2007). Purification et caractérisation d'une fraction anti-coagulante et protéolytique du venin de *Cerastes cerastes*. Rencontres en toxicologie, «Toxines émergentes : nouveaux risques» *Lavoisier, Editions TEC et DOC*. 234-235.

Chérifi, F., Laraba-Djebari, F. (2008). Caractérisation d'une fraction coagulante isolée du venin de *Cerastes cerastes* Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales, *Editions de la SFET* : 153-154.

Chérifi, F., Laraba-Djebari, F. (2009). Réponse inflammatoire induite par la fraction coagulante C1 isolée du venin de *Cerastes cerastes* (*Editions de la SFET*), *Toxines et Signalisation, E-book RT17*: 165-167.

Chérifi, F., Rousselle, J. C., Namane, A., Laraba-Djebari, F. (2010). Use of nano-liquid chromatography and mass spectrometry to identify a new *Cerastes cerastes* venom phospholipase A₂. *Avancées et nouvelles technologies en Toxinologie - Advances and new*

technologies in Toxinology. Rencontres en Toxinologie – Meeting on Toxinology, 2010. *E-book RT18*: 165-167

Chérifi, F., Rousselle, J. C., Namane, A., Laraba-Djebari, F. (2010). CCSV-MPase, a Novel Procoagulant Metalloproteinase from *Cerastes cerastes* Venom: Purification, Biochemical Characterization and Protein Identification. *Protein J.* (29): 466–474.

Chippaux, J. P., Goyffon, M. (1983). Producers of antivenom sera. *Toxicon* 21: 739-752.

Chippaux, J.P., Goyffon, M. (1997). Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* 36 (6): 823-846.

Chippaux, J. P., Amadi-Eddine, S., Fagot, P. (1999). Diagnostic et surveillance des hémorragies dues aux envenimations vipérines en savane africaine. *Manuscrit N° 1971. Thérapeutique.*

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.

Chiu, H.F., Chen, I. J., Teng, C. M. (1989). Edema formation and degranulation of mast cells by a basic phospholipase A₂ purified from *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. *Toxicon* 27 (1):115-125.

Chow, G., Kini, R.M. (1999). Scientific Standardization Committee Communication: *Inventory of exogenous factors from animal sources that induce platelet aggregation* 1-10.

Condrea, E., Fletcher, J. E., Rapuano, B.E., Yang C.C., Rosenberg, P. (1981). Dissociation of enzymatic activity from lethality and pharmacological properties by carbomylation of lysine in *Naja nigricollis* and *Naja naja atra* snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* 19: 705-720.

Corrêa, M. M., Sampaio, S.V., Lopes, R.A., Moncuso, L.C., Cunha, O.A.B., Franco, J.J., Giglio, J.R. (1997). Biochemical and histopathological alterations induced in rats by *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major Neurotoxin Tityustoxin-I. *Toxicon* 35: 1053-1067.

- D -

De-Faria, L., Antunes, E., Bon, C., De-Aranjo, A. (2001). Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. *Toxicon* 39: 825-830.

Dennis, E.A. (1994). Diversity of group types, regulation and function of phospholipases A₂. *J. Biol.Chem* 269: 13057-13060.

De Roodt, A.R., Dolab, J.A., Hajos, S.E., Gould, E., Dinapoli, H., Troiano, J.C., Gould, J., Dokmetijian, J.C., Carfagnini, J.C., Fernandez, T., Amoroso, M., Serge, C., Vidal, J. (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). Haemorrhagic activity of *Bothrops* venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatine lethality. *Toxicon* 41 (8): 949-958.

- E -

El- Asmar, M.F., Shaban, E., Hagag, M., Swelam, N., Tu, A. (1986). Coagulant component in *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) venom *Toxicon* 24 (11/12) 1037-1044.

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

Escalante, T., Franceschi, A., Rucavado, A., Gutiérrez, J. M. (2000). Effectiveness of batimastat inhibitor of matrix metallo- proteinases, in neutralizing local tissue damage induced of the snake *Bothrops asper*. *Biochem-Pharmacol* 60: 269- 274.

Estevao-Costa, M. I., Martins, M. S., Sanchez, E. F., Diniz, C. R., Chavez-Olortegui, C. (2000). *Toxicon* 38: 139-144.

Evans, J., Ownby, C. L. (1999). Neutralization of edema, haemorrhage and myonecrosis induced by North American *Crotalid* venom in simulated first-aid treatment. *Toxicon* 37: 633-650.

- F -

Faco, D., Litwin, S., Hajos, S. E. (2003). Renal alterations induced in mice by *Bothrops asper*: correlation with metabolic disorders. *Toxicon* 41: 209-214.

Faure, G. (2000). Natural inhibitors of phospholipases A₂. *Biochimie* 82: 833-840.

Faure, G., Fourier, A. (2006). Etude du mécanisme d'action des phospholipases A₂ de venins de serpents par la résonance plasmonique de surface. In: Goudey-Perrière F., Benoit E., Goyffon M., Marchot P. (Eds.), *Toxines et cancer*, Coll. Rencontres en toxinologie, Elsevier, Paris, pp. 313-18

Faure, G., Gowda, V. T., Maroun, R. C. (2007). Characterization of a human coagulation factor Xa-binding site on Viperidae snake venom phospholipases A₂ by affinity binding studies and molecular bioinformatics. *BMC structural biology* (7):82

Faure, G., Saul. F.A. (2008). Caractéristiques structurales et fonctionnelles de deux β -neurotoxines : l'ammodytoxine et la crotoxine. *Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales Rencontres en toxinologie*, 2008. Editions de la SFET, 155- 160.

Fujimura, S., Oshikawa, K., Terada, S., Kimoto, E. (2000). Primary structure and auto-proteolysis of brevilysin H6 from the venom of *Gloydius halys brevicaudus*. *J. Biochem* 128: 167-173.

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 (7): 961-972.

Franceschi, A., Rucavado, A., Mora, N., Gutiérrez, J. M. (2000). Purification and characterization of BaH4, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 38: 63-77.

Freitas, M. A., Geno, P. W., Summer, L. W., Cooke, M. E., Hudenberg, S. A., Ownby, C. L., Kaiser, I. I., Odell, G. U. (1992). *Toxicon* 30: 461-464.

- G -

Gartner, T.K., Ogilvie, M.L. (1984). Isolation and characterization of three Ca⁺²-dependant beta-galactoside specific lectins from snake venoms. *Biochem. J.* 224: 301-307.

Gong, W. M., Zhu, X. Y., Lu, SJ., Teng. (1998). Crystal structure of acutolysin A, a three-disulfide haemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom of *Agkistrodon acutus*. *J. Mol. Biol.* 283: 657-668.

Gopalakrishnakone, P., Ponraj, D., Thwin, M.M. (1997). Myotoxic phospholipases from snake venoms: general myoglobinuric and local myonecrotic toxins (In Venom phospholipases A₂ enzymes: structure, function and mechanism). *Edité par Kini, R.M:* 287-320.

Grandgeorge, M., Véron, J.L., Lutsch, C., Makula, M. F., Riffard, P., Pépin, S., Schermann, J. M. (1996). Preparation of improved F(ab')₂ antivenoms. An example: New polyvalent European viper antivenom (equine). Envenoming and their treatments. *Eds Bon, C., Goyffon, M. Fan edition Marcel Mérieux:* 161-172.

Gruber, U. (1992). Guide des serpents d'Europe, d'Afrique du Nord et du Moyen Orient. *Editions Delachaux et Niestlé. Suisse,* 227.

Gutiérrez, J. M., Chaves, F. (1980). Efectos proteolítico hemorrágico y mionecrotico de los venenos de serpientes costarricenses de los generos *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis*. *Toxicon* 18: 315-321.

Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Bolanos, R., Cerdas, L., Rojas, E., Arroyo, O., Portilla, E. (1981). Neutralisation de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* par un antiveneno polivalente. *Toxicon* 19: 493-500.

Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Lomonte, B., Gené, J. A., Chaves, F., Alvarado, J., Rojas, E. (1990). Standardization of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms. *Toxicon* 28: 1127-1129.

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

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

- H -

Hahn, B. S., Chang, I. M., Kim, Y. S. (1995). *Toxicon* 33: 929-994.

Huang, T. F., Chang, J.Y.H., Ouyang, C. (1984). Characterization of haemorrhagic principles from *Trimeresurus gramineus* snake venom. *Toxicon* 22: 45-52.

Harris, J.B., Grubb, B.D., Maltin, C.A., Dixon, R. (2000). The neurotoxicity of the venom phospholipase A₂ notexin and taipoxin. *Exp. Neurol* 161: 517-526.

Hassan, F.M., El-Banhawy, M.A., Mohallal, E.M., Rahmy, T.R. (1986). Lethality of *pseudo Cerastes persicus* field venom and effect of its sublethal dose on the liver function of envenomed rats. *Egypt. J. Biochimie* 4: 120-148.

Hati, R.N., Mondal, 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., Sarber, S., Bhattacharya, K. K. (1999). Snake venom haemorrhagins. *Crit. Rev. Toxicol* 29: 1-19.

Herzig, R.H., Ratnoff, O.D., Shainoff, J.R. (1970). Studies on a procoagulant fraction of southern copperhead snake venom: the preferential release of fibrinopeptide B. *J. Lab. Clin. Med* 76: 451-465.

Hirabayashi, J., Kusumoki, T., Kasai, K. (1991). Complete primary structure of a galactose specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*. homologies with Ca⁺²-dependant-type lectins. *J. Biol. Chem* 226: 2320-2326.

Hisayoshi, S., Masonori, M., Toshiaki, N. (1983). Purification and properties of a lethal, haemorrhagic protein "mucrotoxin A" from the venom of the Chinese habu snake *Trimeresurus mucrosquamatus*. *Toxicon* 21 (2): 247-255.

Hile, L. A., Shannon, J. D., Bjarnason, J. B., Fox, J. W. (1992). Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinases haemorrhagic toxin-e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen and distegrin-like structures. *Biochemistry* 31: 6203-6221.

Hutton, R.A., Warrel, D.A. (1983). Action of snake venom components on the haemostatic System. *Blood* 7: 176-189.

- I -

Ismail, M., Abd-Essalem, M.A., Al-Ahaibib, M, S. (1997). Pharmacokinetics of ¹²⁵I-labelled *Walterinnesia aegyptia* venom and its specific antivenins: flash absorption and

distribution of the venom and its toxin slow absorption and distribution of IgG, F(ab')₂ and Fab of the antivenom. *Toxicon* 35: 209-214.

Ismail, M., Abd-Essalem, M. A., Al-Ahaibib, M.S. (1998). Pharmacokinetics of ¹²⁵I-labelled *Walterinnesia aegyptia* venom and its specific antivenins: flash absorption and distribution of the venom and its toxin versus slow absorption and distribution of IgG, F(ab')₂ and Fab of the antivenom. *Toxicon* 36: 93-111.

Ito, E., Satake, M., Ofuji, K., Higashi, M., Harigaya, K., McMahon, T., Yasumoto, T. (2003). Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels. *Toxicon* 40: 193-203.

- J -

Jia, L.G., Shimokawa, K., Bjarnason, J.B., Fox, J.W. (1996). Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relationship to the Adams family of proteins. *Toxicon* 34 (11-12): 1269-1276.

Jia, L.G., Wang, X.M., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B., Fox, J.W. (1997). Function of disintegrin-like/cystein-rich domains of atrolysin A: inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonist. *J. Biol. Chem* 272: 13094-13102.

Jin, Y., Lu, Q, M., Li, D-S., Wang, W, Y. (2001). Purification and characterization of jerdofibrase, a serine protease from the venom of *Trimeresurus jerdonii* snake. *Toxicon* 39: 1203-1210.

Johnson, E.K., Ownby, C.L. (1993). Isolation of a myotoxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (brood-banded copperhead) and pathogenesis of myonecrosis induced by it in mice. *Toxicon* 31: 243-255.

Joseph, J.S., Chung, M.C.M., Mirtschin, P.J., Kini, R. M. (2002). Effect of snake venom procoagulants on snake plasma: Implication for the coagulation cascade of snakes. *Toxicon* 40: 175-183.

- K -

Kamiguti, A. S., Hay, C. R. M., Zuzul, M. (1996). *Biochem. J.* 320: 635-641.

Kamiguti, A.S., Zuzel, M., Theakston, R.D.G., (1998). Snake venom metalloproteinases and disintegrins: Interaction with cells. *J. Med. Biol. Res* 31 (7): 853-862.

Kamiguti, A. S. (2005). *Toxicon* 45: 1041-1049.

Karlson-Sriber, C., Person, H., Heath, A., Smith, D., Al-Abdullah, I.H., Sjostrom, L., (1997). First chemical experiences with specific sheep fragments in snake bite. Report of a multicenter study of *Vipera berus* envenoming. *Journal of Internal Medicine* 241: 53-58.

Kini, R.M., Iwanaga, S. (1986). Structure-Function relationships phospholipases II: change density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* 24: 895-905.

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 (3): 265-293.

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 (4): 555-560.

Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murata, R., Ohsaka, A. (1960). Studies on the quantitative method for determination of haemorrhagic activity of habu snake venom. *Jap. J. Met. Sci. Biol* 13: 43-51.

Kornalik, F. (1985). The influence of snake venom enzymes on blood coagulation. *J. Gen. Physiol.* 30: 291-310.

Krisaj, I., Bieber, A.L., Ritonja, A., Gubensek, F. (1991). The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Vipera ammodytes* venom. *Eur. J. Biochem* 202: 1165-1168.

Künkel, D.B., Curry, S.C., Vance, M.V., Ryan, P.J. (1984). Reptile envenomations. *J. Toxicol. Chim. Toxicol* 81: 503-526.

- L -

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: 339-343.

Labib, R.S., Awad, E.R., Faray, N.W. (1981). Proteases of *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) and *Cerastes vipera* (Sahara sand viper) snakes venoms. *Toxicon* 19: 73-78.

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 (*Pseudoechis papuanus*). *Biochem. Biophys. Acta.* 1250: 137-143.

Laraba-Djebari, F. (1984). Contribution à l'étude structurale et biochimique de la phospholipase A₂ du venin de la vipère *Cerastes cerastes*. *Thèse de Magister, USTHB, Alger.* 72 p.

Laraba-Djebari, F., Martin-Eauclaire, M. F. (1990). Purification and characterization of PLA₂ from *Cerastes cerastes* (Horned viper) snake venom. *Toxicon* 34 (23): 145-146.

Laraba-Djebari, F., Martin-Eauclaire, M. F., 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 (11): 1399-1410.

Laraba-Djebari, F, et Martin-Eauclaire, M. F., Maucco, G., Matchot. P. (1995). Afaâcytin an α β -fibrinogenase from *Cerastes cerastes* (Horned viper) venom, activates purified factor X and induces serotonin release from human blood platelets. *Eur. J. Biochem* 233: 756-765.

Laraba-Djebari, F. (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 présentée à l'USTHB, Alger.* 182 p.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

Léon, G., Raja, G., Lomonte, B., Gutierrez, J.M. (1997). Immunoglobulin G and F(ab')₂ polyvalent antivenoms do not differ in their ability to neutralize haemorrhagic edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 35 (11): 1627-1637.

Léon, G., Stiles, B., Alape-Giron, Rajos, G., Gutiérrez, J.M. (1999). Comparative study on the ability of IgG and F(ab')₂ antivenom to neutralize lethal and myotoxic effects induced by *Micrurus nigrocinctus* (coral snake) venom. *Am. J. Trop. Hyg* 61: 266-271.

Léon, G., Valverde, J.M., Raja, G., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M. (2000). Comparative study on the ability of IgG and F(ab')₂ sheep antivenoms to neutralize hemorrhagic edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 38: 233-244.

Leonardi, A., Fox, J. W., Trampus-Bakija, A., Krizaj, I. (2007). *Toxicon* 49: 833–842.

Li, Z.Y., Lian, E. C. (1988). Aggregation of human platelets by acidic mucopolysaccharide extracted from *Stichopus japonicus selenka*. *Thromb Haemost* 59: 435-459.

Li, Z.Y., Yu, T.F., Lion, E.C. (1994). Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophophagus Hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon* 32: 1349-1358.

Liu, S., Sun, M.Z., Greenway, F.T. (2006). *Biochem Biophys Res Commun* 384:1279–1287.

Lizano, S., Lomonte, B., Fox, J.M., Gutiérrez, J.M. (1997). Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor from the plasma snake *Bothrops asper*. *Biochem. JH.* 326: 853-859.

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

Lomonte, B., Gutierrez, J.M., Borkow, G., Ovadia, M., Turkowski, A., Hanson, L.A. (1994a). Activity of haemorrhagic metalloproteinase BaH-1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells *in vitro*. *Toxicon* 32: 505-510.

Lomonte, B., Moreno, E., Tarkowski, A., Hanson, L.A., Maccarana, M. (1994b). Neutralization interaction between heparins and myotoxin II, a Lysine 49 phospholipase A₂ *Bothrops asper* snake venom. *J. Biol. Chem* 269: 29867-29873.

Lomonte, B., León, G., Hanson, L. A (1996). Similar effectiveness of Fab and F(ab')₂ antivenoms in the neutralization of the haemorrhagic activity of *Vipera berus* snake venom in mice. *Toxicon* 34: 1197-1202.

Lomonte, B., Pizzaro-Cerda, J., Angulo, Y., Gorvel, J. P., Moreno, E. (1999). Tyr /Trp substituted peptide 115-129 of a Lys 49 phospholipase (2) express enhanced membrane-damaging activities and reproduces its *in vitro* myotoxic effect. *Biochimie. Biophys. Acta* 1461: 19-26.

Lu, Q. M., Jin, Y., Li, D.S., Wang, W., Xiang, Y.L. (2000). Characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Trimeresurus jerdonii*. *Toxicon* 38 (9): 1226-1236.

Lu, Q. M., Jin, Y., Wei, J. F., Li, D.S., Zhu, S., Wang, W., Xiang, Y.L. (2002a). Characterization and cloning of a novel phospholipase A₂ from the venom of *Trimeresurus jerdonii* snake. *Toxicon* 40: 1313-1319.

Lu, Q. M., Jin, Y., Wei, J. F., Wang, W., Xiang, Y.L. (2002b). Biochemical and biological properties of *Trimeresurus jerdonii* venom and characterization of a platelet aggregation-inhibiting acidic phospholipase A₂. *J. Nat. Toxins* 11: 25-33.

- M -

Mackessy, S.P. (1996). Characterization of the major metalloproteinase isolated from the venom of the northern pacific rattlesnake, *Crotalus viridis oreganus*. *Toxicon* 34: 1277-1285.

Mandelbaum, F. R., Assukura, M. T., Reichel, A. P. (1984). Characterization of two haemorrhagic factors isolated from the venoms of three species of *Bothrops* snakes. *Toxicon* 26: 379-385.

Mandelbaum, F. R. (1990). Snake venom haemorrhagins. *Mem. Inst. Butantan* 52 (1): 35-36.

Markland, F. S. (1997). Snake venom. *Drugs* 54:1-10.

Markland, F. S. (1997). Snake venoms and the haemostatic system. *Toxicon* 36: 1749-1800.

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 (2): 261-272.

Marlas, G. (1985). Isolation and characterization of the alpha an beta subunits of the platelet-activating glycoprotein from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. *Biochimie* 67: 1231-1239.

Marsh, N. A. (1994). Snake venom affecting the haemostatic mechanism: a consideration of their mechanism, practical applications and biological significance. *Blood.Coagul. Fibrinolysis* 5: 399-410.

Maruyama, M., Sugiki, M., Yoshida, E., Shimaya, K., Mihara, 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 / haemorrhagic enzymes from snake (*Bothrops jararaca*) venom. *Enzyme Protein* 47: 124-135.

Maruyama, M., Sugiki, M., Anai, K., Yoshida, E. (2002). N-terminal amino acid sequences and some characteristics of fibrinolytic / haemorrhagic metalloproteinases purified *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 40 (8): 1223-1226.

Matsui, R., Fujimura, Y., Titani, K., (2000). Snake venom proteases affecting haemostasis and thrombosis. *Biochimie. Biophys. Acta* 1477: 146-156.

Mebis, D. (1986). Myotoxic activity of phospholipase A₂ isolated from cobra venoms: Neutralization by polyvalent antivenoms. *Toxicon* 24: 1001-1008.

Mebis, D., Pohlmann, S., Von Tenspolde, W. (1988). Snake venom haemorrhagins: Neutralization by commercial antivenoms. *Toxicon* 26: 453-458.

Ménez, A. (1993). Structures des toxines des animaux terrestres .*Pour la science* 190: 35-42.

Meier, J., Stocher, K. (1991). Effects of snake venoms on haemostatis. *Crit. Rev. Toxicol* 21: 171-182.

Meyer, W.P., Habib, A.G., Onayade, A.A., Yakubu, A., Smith, D.C., Nasidi, A., Dudu, I.J., Warrel, D.A., Theakston, R.D.G. (1997). First clinical experiences with a new ovine Fab *Echis*

ocellatus snake bite antivenom in Nigeria: randomized comparative trial with Institute Pasteur Serum (Ipser) Africa antivenom. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 56: 291-300

Miutinavic, L.B., França, F.O.S., Barbara, K.C., Nunes, J.R., Cardoso, J. L. C. (2003). Haemorrhage causing rapid death after *Bothrops jararacussu* snake bite: a case report. *Toxicon* 42: 331-334.

Mion, C., Olive, F., Hernandez, E., Martin, Y.N., Vieillefosse, A.S., Goyffon, M. (2002). Action des venins sur la coagulation sanguine: diagnostic des syndromes hémorragiques. *Bull. Soc. Pathol. Exot* 95 (3): 132-138.

Mizuno, H., Fujimoto, Z., Koizumi, M., Kono, H., Atodo, H., Morita, T. (1997). Structure of coagulation factors IXIX-binding protein, a heterodimer of C-type lectin domains. *Nature Struct. Biol* 4: 438-441.

Mohamed, A.H., Anwar, N.N.Y., Hanna, (1974 a). Influence of hydrocortisone on the microscopic changes produced by *Naja nigricollis* venom in kidney, liver and spleen. *Toxicon* 12: 45-48.

Mohamed, A. H., Saleh, A.M., Hani- Ayobe, M. (1974 b). Studies an Egyptian *Cerastes cerastes* antivenom. *Toxicon* 12: 952-955.

Mohamed, A.H., Saleh, A.M., Ahmed, S., Basheer, S.R.(1978). Histopathological effects of *Naja haje* snake and a venom gland extract of the scorpion *Buthus quinquestriatus* on the liver, suprarenal gland and pancreas mice. *Toxicon* 16: 253-261.

Mohamed, A.H., Fouad, S., El-Asmar, S., Salem, A. M., Abdel-Aal, A., Hassan-Amr, A., Zahran, F., Abbas, N. (1981). Effects of several snake venoms on serum and tissue Transaminases, Alkaline phophatase and Lactate Deshydrogenase. *Toxicon* 19: 605-609.

Moreno, E., Gutiérrez, J.M. (1988). Body distribution of *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom myotoxin and its relationship to pathological changes. *Toxicon* 26 (4): 403-409.

Mori, N., Nikai, T., Sugihara, H. (1984). Purification of a proteinase (Ac₅-Proteinase) and characterization of haemorrhagic toxins from the venom of the Hundred-PACE snake (*Agkistrodon acutus*). *Toxicon* 22 (3): 451-641

Mukherjee, A. K., Ghossal, S. K., Maity, C. R. (2000). *Toxicon* 38: 163–175.

- N -

Nelson, B.K (1989). Snake envenomation. Incidence. Clinical presentation and management. *Med. Toxicol. Adverse. Drug. Exp.* 4:17-31.

Niewiarowski, S., Kirby, E.P., Stocker, K. (1977a). Thromocytin, a novel platelet activating enzyme from *Bothrops atrox* venom. *Thromb. Res* 10: 863-869.

Niewiarowski, S., Kirby, E.P., Stocker, K. (1977 b). Thromocytin, enzyme activating platelet isolated from *Bothrops atrox*: partial characterization. *Thromb. Res* 10:906-909

Niewiarowski, S., Kirby, E.D, Stocker, K, Kattner, C., Show, E., Budzynski, T.M. (1979 a). Thromocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom: Purification and characterization of the enzyme. *Biochemistry* 18: 3564-3570.

Niewiarowski, S., Kirby, E.D., Budzynski, T.M., Stocker, K. (1979 b). Thromocytin, a serine protease and plasma-clotting factors. *Biochemistry* 18: 3570-3577.

Niewiarowski, S., Mclane, M.A., Kliczewiak, M., Stewart, G.J. (1994). Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors, *Seminars in Haematology* 31: 289-300.

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

Nishida, S., Terashima, M., Shimazu, T., Takasoki, C., Tamiya, N. (1985). Isolation and properties of two phospholipases A₂ from the venom of an Australian elapid snake (*Pseudoechis australis*). *Toxicon* 23: 73-85.

Nishida, S., Fujita, T., Kohno, N., Atoda, H., Morita, T., Takeya, H., Kido, I., Paine, M. J., Kawabata, S., Iwanaga, S. (1995). *Biochemistry* 34: 1771-1778.

Nishikata, M. J. (1984). *Biochem.* 95: 53-61

Nishioka, S.A., Silveira, P.V.P. (1992). A clinical and epidemiological study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47: 805-810.

Nkinin, S.W., Chippaux, J.P., Piétin, D., Doljansky, Y., Trémau, O., Ménez, A. (1997). Genetic origin of venom variability: impact on the preparation of envenomation serum. *Bull. Soc. Pathol. Exot* 90: 277-281.

- O -

Omari-Satoh, T., Yamakawa, Y., Mebs, D (2000). The antihemorrhagic factor, erinocin, from the European hedgehog (*Erinaceus europeans*), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P₃₅ lectin domains. *Toxicon* 38 (11) : 1561-1580.

Oshaka, A. (1979). An approach to the physiological mechanism involved in haemorrhagic principles as a useful analytical tool. Animal, plant and microbial toxins: 123. (In Chen, I. J., Chiu, H.F., Huang, H.T., Teng, C.M. (1984)): Edema formation and degranulation of mast cells by *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. *Toxicon* 22 (1): 17-28.

Oussedik-Oumehdi et Laraba-Djebari, (2008). Irradiated *Cerastes cerastes* venom as a Novel tool for Immunotherapy. *Immunopharmacology and Immunotoxicity* 30: 37-52.

Ouyang, C., J.Y, W., Zan, Y. P., Teng, C. M. (1981). Mechanism of anti coagulant action phospholipase A₂ purified from *Trimeresurus mucrosquamatus* (Formosan habu) snake venom. *Toxicon* 19: 113-120.

Ovadia, M. (1978). Isolation and characterization of three haemorrhagic factors from *Vipera palaestinae* .*Toxicon* 16: 479-487.

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 (5): 877-885.

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

Ownby, C.L., Colberg, T.R., Odell, G.V. (1985): Ability of a mixture of anti myotoxin-a serum and polyvalent (*Crotalidae*) antivenom to neutralize myonecrosis, haemorrhage 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 haemorrhage induced by bilitoxin, a haemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). *Toxicon* 28: 837-846.

- P -

Paine, M.J., Desmond, H.P., Theakston, R. D. G. Crampton, J.M. (1992). Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight haemorrhagic metalloproteinase, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. In sights into the disintegrin gene family. *J. Biol. Chem* 267: 22869-22876.

Pépin-Covatta, S., Lutsch, C., Grandgeorge, M., Lang, J., Schermann, J.M. (1995). Immunoreactivity and pharmacokinetics of horse anti-scorpion venom F(ab')₂-scorpion venom interaction. *Toxicol. Appli. Pharmacol.* **141**: 272-277.

Pépin-Covatta, S., Lutsch, C., Grandgeorge, M., Schermann, J.M. (1997). Immunoreactivity of a new generation of horse: pharmacokinetic following intravenous and intramuscular administration in rabbits. *Pharmaceut. Res.*12: 1470-1473.

Pépin-Covatta, S., Lutsch, C., Grandgeorge, M., Schermann, J.M. (1998). Preclinical assessment of Immunoreactivity of a new purified equine F(ab')₂ against European viper venom *.J. Pharmaceut. Sci.* 87: 221-225.

Perez, J.C., Sanchez, E. E. (1999). Natural inhibitors to haemorrhagins in snake venoms and their potential use in medicine. *Toxicon* 37: 703-728.

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.

Pirkle, H. (1998). Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. *Thromb. Haemost* 65: 444-450.

- Q- R -

Qiu-Min Lu, Yang Jin., Ji-Fu Wei, Dong-Sheng Li., Shao-Wen Zhu., Wan-Yu Wang., Yu-Xiang. (2002). Characterization and cloning of novel phospholipases A from the venom of *Trimeresurus jerdonii* snake. *Toxicon* 40: 1313-1319.

Ramirez, G.A., Fletcher, P.L., Possani, L.D. (1990). Characterization of the venom from *Crotalus molossus nigrescens* gloyd (black tail rattle snake): Isolation of two proteases. *Toxicon* 28: 285-297.

Reid, A. H., Theakston, R. G. D. (1984). Les morsures de serpents. *Bulletin d'O.M.S* 62 (1): 27-38.

Reid, M.S., Smith, S., Lamb, M.A., Brinkhous, K.M. (1989). Role of botrocetin in platelet agglutination: formation of an activated complex of botrocetin and von Willebraud factor. *Blood* 74: 1031-1035.

Retzios, A. D., Markland, F. S. (1994). *Thromb. Res.* 74: 355-367.

Rivière, G., Choumet, V., Saliou, B., Debray, M., Bon, C. (1997). Absorption and elimination of viper venom after antivenom administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285: 490-495.

Rivière, G., Bon, C. (1999). Immunothérapie antivenimeuse des envenimations ophidiennes : vers une approche rationnelle d'un traitement empirique, *Annales de l'Institut Pasteur, Actualités.* 10 (2) :173-182.

Rivière, G., Bon, C. (2000). Immunothérapie antivenimeuse vers une approche rationnelle d'un traitement empirique. *Ann. Inst. Pasteur.* 2 : 53-68.

Roche, M. L. (1999). The distribution and elimination of Bothrops erythromelas venom labelled with ¹³¹I after intravenous injection in mice. *The Journal of Venomous Animals and Toxins* 5: 889-894.

Rodrigues, V. M., Soares, A. M., Guerra-Sa, R., Rodrigues, V., Fontes, M.R., Giglio, J. R. (2000). *Arch. Biochem. Biophys.* 381:213-224

Rodrigues, V.M., Soares, A. M., Andriao-Escarso, S. H., Franceschi, A. M., Rucavado, A., Gutierrez, J. M., Giglio, J. R. (2001). *Biochimie* 83:471-479.

Rucavado, A., Lomonte, B. (1996). Neutralization of myonecrosis, haemorrhage and edema induced by *Bothrops asper* snake venom by homologous and heterologous pre-existing antibodies in mice. *Toxicon* 34 (5): 567-577.

Rucavado, A., Flores-Sanchez, E., Franceschi, A., Megalhaes, A., Gutiérrez, J. M. (1999). Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak haemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon* 37: 1297-1312.

Sadahiro, S., Omori-Satoh, T. (1980). Lack of a haemorrhagic principle in habu snake venom *Trimeresurus flavoridis* from the Okinawa islands. *Toxicon* 18: 366-368.

Samel, M., Subbi, J., Siigur, J., Siigur, E. (2002). Biochemical characterization of fibrinogenolytic serine proteinases from *Vipera lebetina* snake venom. *Toxicon* 40: 51-54.

Santana, G.C., Freire, A.C.T., Freire, A. P. L., Chaves-Olortegui, C., Diniz, C.F., Freira-Maia, L. (1996). Pharmacokinetics of Tityus serrulatus scorpion venom determined by Enzyme-Linked Immuno-Sorbant Assay in the rat. *Toxicon* 34: 1063-1066.

Saul F.A., Prijatelj P., Vuilliez-le Normand B., Villette B., Krizaj I., Raynal B., Faure G. (2008). Crystal structure of two isoforms of ammodytoxin, neurotoxic and anticoagulant phospholipases A₂ from *Vipera ammodytes ammodytes*. in Faure, G., Saul. F. A., 2008, e-Book SFET 2008.

Saumon, G. (1999). L'épithélium alvéolaire lors des oedèmes pulmonaires. *Médecine/ sciences* 15: 778-787.

Sellahawa, K. H., Gunawardena, G., Kumararatine, 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 (3): 260-262.

Selvanayagam, Z., Gnanavendhan, S.G., Ganch, K. A., Rajagopal, D., Subba rao, P.V. (1999). ELISA for the detection of venoms from four medically important snakes of India. *Toxicon* 37: 757-770.

Schmaier, A. H., Claypool, W., Colman, R.W. (1980 a). Crotalocytin: recognition and purification of a timber rattlesnake platelet aggregating protein. *Blood* 56: 1013-1019.

Schmaier, A. H., Colman, R.W. (1980 b). Crotalocytin: characterization of the timber rattlesnake platelet activating protein. *Blood* 56: 1020-1028.

Schwartz, M. W., Pool, W. R., Bieber, A. L. (1984). Major rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) venom: Enzyme activities and purification of Arginine ester hydrolase. *Toxicon* 22(3): 327-338.

Serrano, S. M., Meutele, R., Sampaio, C. A., Fink, E. (1995). Purification, characterization and amino acid sequence of a serine proteinase PA-BJ, with platelet-aggregation activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry* 34: 7188-7193.

Seto, J. G., Perg, J.C., Minston, S.A. (1988). Proteolytic, haemorrhagic and haemolytic activities of snakes venoms. *Toxicon* 26: 282-288.

Shimokawa, K. I., Shannon, J. D., Jia, L.G., Fox, J. W. (1997). Sequence and biological activity of Catrocollastatin-C: a disintegrin-like / cystein-rich two protein from *Crotalus atrox* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 343: 35-43.

Shimokawa, K. I., Shannon, J. D., Jia, L.G., Fox, J. W. (1998). Isolation, sequence analysis and biological activity of atrolysin EID, the non- RGD disintegrin domain from *Crotalus atrox* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 354: 239-246.

Shiomi, K., Yamamoto, S., Yamanako, H., Kikuchi, T., Konno, K. (1990). Liver damage by the crown of thorns (*Acanthaster planci*) lethal foc. *Toxicon* 28 (5): 469-475.

Siigur, E., Samel, M., Tonismagi, K., Subbi, J., Siigur, J., Tu, A. T. (1998). *Thromb Res* 90: 39-49.

Siigur, E., Aaspollu, A., Trummal, K., Tonismagi, K., Tammiste, I., Kalkkinen, N., Siigur, J. (2004). *Biochim Biophys Acta* 1702:41-51.

Silamut, S. M., Parker, C.G., Lollar, P. (1990). Differential proteolytic activation of factor VIII-von Willebrand factor complex by thrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*86: 6508-6512.

Smith, T. A., Figge, H. L (1991). Treatment of snakebite poisoning. *Am. J. Hasp. Pharm* 48:2190-2196.

Slavtchev, R.S., Ben Osman, F. (1969). La vipère à cornes et son venin. *Archives Institut Pasteur de Tunis, Tome XVI:* 83-136.

Soe-Soe., Than-Than., Khin-Ei-Han. (1990). The nephrotoxic action of Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. *Toxicon* 28 (5): 461-467.

Souza, D. H. F., Iemma, M. R. C., Ferreira, L. L., Faria, J. P., Oliva, M. L. V., Zingali, R. B., Niewiarowski, S., Selister- De-Araujo, H. (2000). The disintegrin-like domain of the snake venom metalloproteinase alternagin inhibits $\alpha 2\beta 1$ integrin mediated cell adhesion. *Arch. Biochem. Biophys.* 384: 341-350.

Staiano, N., Villani, G.R., Dimartino, E., Squillacioti, C., Vuotto, P., Dinatale. (1995). Echistatin inhibits the adhesion of murine melanoma cells to extracellular matrix components. *Biochem. Mol. Bio. Inst.* 35: 11-19.

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

Swenson, S., Markland, F. S., (2005). *Toxicon* 45:1021-1039

- T -

Takeya, H., Oda, K., Miyata, T., Omori-Satoh, T., Iwanaga, S. (1990). The complete amino acid sequence of the high molecular mass haemorrhagic protein HR1B isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biol. Chem.* 265: 16068-16067.

Takeya, H., Nishida, S., Miyata, T., Kawada, S., Saisaka, Y., Morita, T., Iwanaga, S. (1992). Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-X). A novel metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin domains. *J. Biol. Chem.* 267: 14109-14117.

Thwin, M.M., Mee, K.M., Kyin, M.M., Than, T. (1988). Kinetics of envenomation with Russell's viper (*Vipera russelli*) venom and antivenom use in mice. *Toxicon* 26: 373-378.

Tu, T. A., Homma, M., Hong, B.S. (1969). Haemorrhagic, myonecrotic, thrombolytic and proteolytic activities of viper venoms. *Toxicon* 9: 175-178.

Tu, T. A., Baker, B., Wongvibulsin, S., Willis, T. (1996) *Toxicon* 34: 1295-1300

- U - V - W - Z -

Usami, Y., Fujimura, Y., Suzuki, M., Ozebi, Y., Nishio, K., Titani, K. (19993). Primary structure of two chain botrecretin, a Von Willebraud factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 90: 928-932.

Van Der Walt, S. J., Joubert, F.J. (1971). *Toxicon* 9: 153-161

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.

Wang, W.J., Huang, T.F. (2002). Purification and characterization of a novel metalloproteinase, Acurhagin from *Agkistrodon acutus* venom. *Thromb. Haemost* 87: 641-650.

Ward, R.J., Alves, A.R., Neto, J.R., Arni, R.K., Casari, G. (1998). A sequence space analysis of Lys-49 phospholipases A₂: clues towards identification of residues involved in a novel mechanism of membrane damage and in myotoxicity. *Protein Engineering* 11: 285-294.

Warrel, D.A. (1993). Venomous bites and stings in the tropical world. *Med. J. Aust* 199: 773-779.

Weis, J.R., Whatler, R.E., Glenn, J.L., Rodges, G.M. (1991). Prolonged hypofibrinogenemia and protein-C activation after envenoming by *Echis carinatus sachureki*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44 (4): 452-460.

When-Hui, L., Zhuang, Q.Y., Zhang, Y. (2003). Cloning and characterization of a blood coagulation factor IX-binding protein from the venom of *Trimeresurus stejnegeri*. *Toxicon* 41 (7): 765-772.

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

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.

Zhow, Q., Dougelmaier, C., Smith, T.B. (1996). The haemorrhagin Catrocollastin inhibits collagen-induced platelet aggregation by binding to collagen via its disintegrin-like domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219: 720-726.

Zingali, R.B., Jandrot-Perrus, M., Guillin, M. C., Bon, C. (1993). Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry* 32: 10794-10802.

Zouari-Kessentini, R., Luis-Jose, L., Karry, A., Kallech-Ziri, O., Srairi-Abid, N., Bazaa, A., Loret, E., Bezzine, S., El-Ayeb, M., Marrakchi, N. (2009). *Toxicon* 53: 444-453

PUBLICATIONS
ET
COMMUNICATIONS

ACTIVITES SCIENTIFIQUES :

1- Publication nationale :

- **CHERIFI, F**, SACI, A, CHAOU, N et LARABA-DJEBARI, F (**2005**) : « Application du test ELISA sandwich pour la quantification des venins de *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina* dans les compartiments vasculaire et tissulaires de la souris ». *Journal Algérien de Médecine*.

2- Publications internationales :

- **CHERIFI, F** et LARABA-DJEBARI, F (**2005**): Effet de l'immunothérapie sur la biodistribution et les effets pulmonaires du venin de *Cerastes cerastes*. Rencontre en Toxinologie, « Toxines et Douleur » Lavoisier Editions TEC et DOC. **231- 234**.
- CHAOU, N, **CHERIFI, F** et LARABA-DJEBARI, F (**2006**): Effets de l'immunothérapie antivenimeuse sur les désordres hépatiques induits par une envenimation vipérine. Rencontres en toxinologie, « Toxines et cancer » Lavoisier, 2006 » » Lavoisier, Editions TEC et DOC **323-326**.
- **CHERIFI, F** et LARABA-DJEBARI, F (**2007**): Purification et caractérisation d'une fraction anti-coagulante et protéolytique du venin de *Cerastes cerastes*. Rencontres en toxinologie, « Toxines émergentes : nouveaux risques » Lavoisier, 2007 » » Lavoisier, Editions TEC et DOC. **234-235**.
- **CHERIFI F.** et LARABA-DJEBARI F. (**2008**): Caractérisation d'une fraction coagulante isolée du venin de *Cerastes cerastes* Toxines et fonctions cholinergiques neuronales et non neuronales 1 Editions de la SFET; **153-154**.
- **CHERIFI F.** et LARABA-DJEBARI F. (**2009**): Réponse inflammatoire induite par la fraction coagulante C1 isolée du venin de *Cerastes cerastes* (Editions de la SFET), Toxines et Signalisation, E-book RT17-2009 ; **165-167**.
- CHELGHOUH H., **CHERIFI. 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**.
- SACI AMEL, HAMZA LOUBNA, BOUKHALFA-ABIB HINDA, CHELGHOUH HAYET, SEBIA-AMRANE FATIMA, OUSSEDIK-OUMEHDI HABIBA, **CHERIFI FATAH** et LARABA-DJEBARI

FATIMA (2009): Caractérisation des Venins de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina* et Purification de Biomolécules Pharmacologiquement Actives » 3rd International SMBBM Congress, IUBMB Special Meeting & 6th FASBMB Congress, Marrakech, April 20-24th, 2009.

- **CHERIFI F**, ROUSSELLE JC, NAMANE A, LARABA-DJEBARI F. (2010): Use of nano-liquid chromatography and mass spectrometry to identify a new *Cerastes cerastes* venom phospholipase A₂. *Avancées et nouvelles technologies en Toxinologie - Advances and new technologies in Toxinology*. Rencontres en Toxinologie- Meeting on Toxinology, 2010. *E-book RT18: 165-167*.
- **CHERIFI F**, ROUSSELLE JC, NAMANE A, LARABA-DJEBARI F. (2010): CCSV-MPase, a Novel Procoagulant Metalloproteinase from *Cerastes cerastes* Venom : Purification, Biochemical Characterization and Protein Identification. *Protein J.* (29): **466-474**.
- **CHERIFI F**, ROUSSELLE JC, NAMANE A, LARABA-DJEBARI F. (2011): Zn²⁺: a required ion for procoagulant metalloproteinase (CCSV-MPase) activities, isolated from *Cerastes cerastes* Venom (Soumis et accepté). *Toxines et Transferts ioniques – Toxins and Ion transfers*. Rencontres en Toxinologie – Meeting on Toxinology, 2011. Editions de la SFET.

3- Communications nationales :

- **CHERIFI, F**, CHAOU, N et LARABA-DJEBARI, F (2005): « Quantification des venins de serpents en présence et en absence d'immunothérapie ». 31ème anniversaire de la création de l'USTHB 23 au 28 Avril 2005 sous le thème « Insertion de l'USTHB dans l'économie du savoir et de l'innovation ».
- **CHERIFI, F**, SACI, A, CHAOU, N et LARABA-DJEBARI, F (2005) : «Application du test ELISA sandwich pour la quantification des venins de *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina* dans les compartiments vasculaire et tissulaires de la souris ». 4^{èmes} journées Scientifiques de l'ANDRS, le 06, 07 et 08 Septembre 2005, la Faculté de médecine de Tlemcen.
- SACI, A, **CHERIFI, F**, CHAOU, N, HAMZA,L et LARABA-DJEBARI, F (2005) : « Cinétique des venins de *Vipera lebetina* et *Cerastes cerastes* et effet sur le muscle squelettique et cardiaque ». 2^{èmes} journées Nationales de Biologie sur les Biotechnologies et Environnement, le 15 et 16 Novembre 2005 à la Faculté des Sciences de l'Université M'hamed Bouguera, Boumerdés.

- CHAOU, N, HAMZA, L, **CHERIFI, F**, SACI, A, et LARABA-DJEBARI, F (**2005**) : « Action de l'immunothérapie sur les effets inflammatoires, hémorragique et histopathologique induits par deux Viperidae *Cerastes cerastes* et *Vipera lebetina* » 1^{ères} journées nationales d'immunologie, le 26 et 27 novembre 2005 à Alger (Palais de la culture Moufdi Zakaria).
- **CHERIFI, F**, CHAOU, N et LARABA-DJEBARI, F (**2006**) : « Quantification et effet des venins de Viperidae dans le poumon en présence et en absence d'immunothérapie ». Communication affichée présentée le 25 Avril 2006 dans le cadre des activités scientifiques organisées par la Faculté des Sciences Biologiques à l'occasion du 32^{ème} anniversaire de la création de l'USTHB.
- CHAOU, N, **CHERIFI, F**, et LARABA-DJEBARI, F (**2006**): « Approches biochimique, immunologique et histologique dans l'étude des venins de Vipères ». Communication affichée présentée le 25 Avril 2006 dans le cadre des activités scientifiques organisées par la Faculté des Sciences Biologiques à l'occasion du 32^{ème} anniversaire de la création de l'USTHB.
- **CHERIFI, F**, CHAOU, N et LARABA-DJEBARI, F (**2006**) : « Actions de deux fragments d'anticorps sous forme de F(ab')₂ anti-venins de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina* sur la physiopathologie du foie après envenimation chez la souris ». 2^{ème} journées nationales d'immunologie, les 25 et 26 novembre 2006 à Alger (Palais de la culture Moufdi Zakaria).
- CHAOU, N, **CHERIFI, F**, HAMZA, L et LARABA-DJEBARI, F (**2007**): « Etude physiopathologique des venins de *Viperidae* corrélée à leur Biodistribution » Communication affichée présentée les 21-26 Avril 2007 dans le cadre des activités scientifiques organisées par la Faculté des Sciences Biologiques à l'occasion du 33^{ème} anniversaire de la création de l'USTHB.
- **CHERIFI, F** et LARABA-DJEBARI, F (**2007**): « Altérations tissulaires et enzymatiques du parenchyme splénique suite à une action sublétales du venin de *Cerastes cerastes* », Communication affichée présentée les 21-26 Avril 2007 dans le cadre des activités scientifiques organisées par la Faculté des Sciences Biologiques à l'occasion du 33^{ème} anniversaire de la création de l'USTHB.
- **CHERIFI, F** et LARABA-DJEBARI, F (**2007**): « Evaluation de l'efficacité de deux fragments d'anticorps sous forme de Fab et F(ab')₂ dirigés contre le venin de *Cerastes cerastes*, à neutraliser les désordres provoqués par ce venin », Communication affichée présentée les 21-26 Avril 2007 dans le cadre des activités scientifiques organisées par la

Faculté des Sciences Biologiques à l'occasion du 33^{ème} anniversaire de la création de l'USTHB.

- HAMZA L., **CHERIFI, F.**, OUSSEDIK-OUMEHDI H. ET LARABA-DJEBARI F (**2008**) : « Neutralisation des Activités Biologiques des Venins de *Viperidae* par différents types d'Anticorps » Communication affichée présentée les 19-24 Avril 2008 dans le cadre des activités scientifiques organisées par la Faculté des Sciences Biologiques à l'occasion du 34^{ème} anniversaire de la création de l'USTHB.
- **CHERIFI F** et LARABA-DJEBARI F (**2008**) : « Biomolécule Anticoagulante de *Cerastes cerastes*: Purification et Caractérisation » Communication affichée présentée les 19-24 Avril 2008 dans le cadre des activités scientifiques organisées par la Faculté des Sciences Biologiques à l'occasion du 34^{ème} anniversaire de la création de l'USTHB.
- **CHERIFI F** et LARABA-DJEBARI F (**2008**) : « Bioanalyse des paramètres hématologiques et métaboliques après administration d'une biomolécule anticoagulante à visée thérapeutique » Communication affichée présentée les 19-24 Avril 2008 dans le cadre des activités scientifiques organisées par la Faculté des Sciences Biologiques à l'occasion du 34^{ème} anniversaire de la création de l'USTHB.
- OUSSEDIK-OUMEHDI H., HAMZA L., **CHERIFI 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 » Communication orale présentée les 19-24 Avril 2008 dans le cadre des activités scientifiques organisées par la Faculté des Sciences Biologiques à l'occasion du 34^{ème} anniversaire de la création de l'USTHB.

4- Communications internationales :

- **CHERIFI, F** et LARABA-DJEBARI, F (**2005**): «Effet de l'immunothérapie sur la biodistribution et les effets pulmonaires du venin de *Cerastes cerastes* ». Communication affichée lors des Rencontres en Toxinologie, (RT13) Paris, les 1 et 2 Décembre 2005.
- CHAOU, N, **CHERIFI, F** et LARABA-DJEBARI, F (**2006**) : «Effets de l'immunothérapie antivenimeuse sur les désordres hépatiques induits au cours d'une envenimation vipérine ». Communication affichée lors des Rencontres en Toxinologie, (RT14) Paris, le 31 Novembre et le 01 Décembre 2006,

- **CHERIFI, F**, CHAOU, N, SACI, A, LARABI, N et LARABA-DJEBARI, F **(2006)**: «Pancreatitis and inflammatory response after experimental envenomation with *Viperidae* venoms (*Cerastes cerastes* and *Vipera lebetina*)". Communication affichée lors des Rencontres de la société Egyptienne des toxines naturelles, Caire, 18-20 Décembre 2006.
- **CHERIFI, F** et LARABA-DJEBARI, F **(2007)** : «Purification et caractérisation d'une Proteinase Anti-Coagulante isolée du venin de *Cerastes cerastes* ». Communication affichée lors des Rencontres en Toxinologie, (RT15) Paris, Décembre 2007.
- MENDIL, A, CHAOU, **CHERIFI, F**, SACI, A, ABIB, L, BEACEF-HEFFAR, BOUKHALFA-ABIB, H, ADI-BESSALEM, S, OUSSEDIK-OUMEHDI, H, HAMZA, L, SAMI-MERAH, S, HAMMOUDI-TRIKI, D et LARABA-DJEBARI, F **(2007)** : « Effet des Venins et leurs biomolécules sur les modifications physiopathologiques induites lors d'envenimations expérimentales ». Communication orale présentée lors de la 1ere Réunion Maghreb-Iran du Réseau International des Instituts Pasteur. Envenimations Scorpioniques et ophidiennes, les 25-26 Janvier2007, Lieu : Institut Pasteur du Maroc.
- MENDIL, A, CHAOU, **CHERIFI, F**, SACI, A, ABIB, L, BEACEF-HEFFAR, BOUKHALFA-ABIB, H, ADI-BESSALEM, S, OUSSEDIK-OUMEHDI, H, HAMZA, L, SAMI-MERAH, S, HAMMOUDI-TRIKI, D et LARABA-DJEBARI, F **(2007)** : « Apport de l'immunothérapie dans le traitement des envenimations expérimentales scorpioniques et ophidiennes » Communication orale présentée lors de la 1ere Réunion Maghreb-Iran du Réseau International des Instituts Pasteur. Envenimations Scorpioniques et ophidiennes, les 25-26 Janvier2007, Lieu : Institut Pasteur du Maroc.
- MENDIL, A, CHAOU, **CHERIFI, F**, SACI, A, ABIB, L, BEACEF-HEFFAR, BOUKHALFA-ABIB, H, ADI-BESSALEM, S, OUSSEDIK-OUMEHDI, H, HAMZA, L, SAMI-MERAH, S, HAMMOUDI-TRIKI, D et LARABA-DJEBARI, F **(2007)** : « Envenimation scorpionique et ophidienne : irradiation gamma autre approche d'optimisation de l'immunothérapie ». Communication orale présentée lors des journées de Radiobiologie Appliquée, qui ont eu lieu au CRNA les 27 et 28 février 2007.
- MENDIL, A, CHAOU, **CHERIFI, F**, SACI, A, ABIB, L, BEACEF-HEFFAR, BOUKHALFA-ABIB, H, ADI-BESSALEM, S, OUSSEDIK-OUMEHDI, H, HAMZA, L, SAMI-MERAH, S, HAMMOUDI-TRIKI, D et LARABA-DJEBARI, F **(2007)** : « Effet des Venins et leurs biomolécules sur les modifications physiopathologiques induites lors d'envenimations expérimentales ». Communication orale présentée lors de la 1ere Réunion Maghreb-Iran du Réseau

International des Instituts Pasteur. Envenimations Scorpioniques et ophidiennes, les 25-26 Janvier 2007, Lieu : Institut Pasteur du Maroc .

- **CHERIFI 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 » Communication orale programmée lors des journées du Réseau International des Instituts Pasteur Jeudi 26 et vendredi 27 juin 2008.
- OUSSEDIK-OUMEHDI H., BOUKHALFA-ABIB H., **CHERIFI F.**, and LARABA-DJEBARI F. **(2008)** " Dermonecrosis and inflammatory response induced induced after *Cerastes cerastes* envenomation" Communication affichée programmée lors de des journées de l'IST 2008 Belgique.
- **CHERIFI F.** et LARABA-DJEBARI F. **(2008)** « Modifications de certains paramètres hématologiques et métaboliques suite à l'administration d'une biomolécule coagulante isolée à partir du venin de *Cerastes cerastes*» Communication programmée lors des Rencontres en Toxinologie, (RT16) Paris, Décembre 2008.
- CHELGHOUH HAYET, **CHERIFI FATAH**, SEBIA-AMRANE FATIMA, BENNACEF-CHAOU NADIA, BOUKHALFA-ABIB HINDA, SACI AMEL, OUSSEDIK-OUMEHDI HABIBA et 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* » Communication présentée lors du Third SMBBM International Congress of Biochemistry in parallel with the IUBMB Special Meeting on Plant stresses and The Sixth FASBMB Congress, Marrakech (Morocco), April 20-25, 2009.
- SACI AMEL, HAMZA LOUBNA, BOUKHALFA-ABIB HINDA, CHELGHOUH HAYET, SEBIA-AMRANE FATIMA, OUSSEDIK-OUMEHDI HABIBA, **CHERIFI FATAH** et LARABA-DJEBARI FATIMA **(2009)** « Caractérisation des Venins de *Cerastes cerastes* et de *Vipera lebetina* : Purification de Biomolécules Pharmacologiquement Bioactives » Communication présentée lors du Third SMBBM International Congress of Biochemistry in parallel with the IUBMB Special Meeting on Plant stresses and The Sixth FASBMB Congress, Marrakech (Morocco), April 20-25, 2009.
- **FATAH CHERIFI**, JEAN-CLAUDE ROUSSELLE, ABDELKADER NAMANE et FATIMA LARABA-DJEBARI **(2010)** « Identification par protéomique d'une nouvelle PLA2 isolée à partir du venin de *Cerastes cerastes* ». Communication orale présentée lors du 2ème Colloque International en Biotechnologie, 26-29 Avril 2010, Oran, Algérie.

- **FATAH CHERIFI**, JEAN-CLAUDE ROUSSELLE, ABDELKADER NAMANE et FATIMA LARABA-DJEBARI **(2010)** « Inflammatory Response and Blood Clotting induced by a novel bioactive thrombin-like isolated from *Cerastes Cerastes* venom and Proteomically analyzed» Communication affichée pour les 1^{ères} Journées Maghrébines et les 5^{èmes} Journées Nationales d'Immunologie, Alger (Hôtel Safir, Zéralda) 5-6 Juin 2010.
- **FATAH CHERIFI**, JEAN-CLAUDE ROUSSELLE, ABDELKADER NAMANE et FATIMA LARABA-DJEBARI **(2011)** « Identification of Three Newly Biomolecules (CC3-SPase, CCSV-MPase and CC2-PLA2) isolated from *Cerastes cerastes* Venom: Proteomic Analysis » Communication pour European Biotechnology Congress 2011, Istanbul du 28 septembre au 01 octobre 2011.
- **CHERIFI F**, ROUSSELLE JC, NAMANE A, LARABA-DJEBARI F. **(2011)**: Zn²⁺: a required ion for procoagulant metalloproteinase (CCSV-MPase) activities, isolated from *Cerastes cerastes* Venom. Communication affichée pour les journées de Toxines et Transferts ioniques–Toxins and Ion transfers. Rencontres en Toxinologie–Meeting on Toxinology, 28 et 29 novembre 2011.

Résumé

Les venins de serpents constituent une des sources naturelles la plus riche en molécules bioactives (Sérine-protéases, métalloprotéases et phospholipases A₂). Les sérine-protéases et les PLA₂ sont connues pour agir sur le système hémostatique en tant qu'agents pro-coagulants, anti-coagulants, pro- ou anti-agrégants des plaquettes. Elles présentent un intérêt en biothérapie dans les maladies thrombotiques et les ischémies cardiaques mais aussi dans le diagnostic. Les métalloprotéases souvent douées également d'activité fibrino(gen)lytique induisent des hémorragies locales et systémiques. Par leur capacité à inhiber l'agrégation plaquettaire en se liant avec une haute affinité au facteur FXa, les PLA₂, présentent quant à elles une activité anti-coagulante. Tous ces effets biologiques ont une action directe sur l'hémostase et permettent de considérer ces biomolécules en tant qu'outils de diagnostic ou de biomarqueurs des pathologies hématologiques.

Le travail réalisé a permis de purifier et de caractériser trois biomolécules (CC3-SPase, CCSV-MPase et CC2-PLA₂) impliquées dans le système hémostatique à partir du venin de *Cerastes cerastes*. Les analyses protéomiques MS et MS/MS, utilisant la banque NCBI^{nr} comme une base de données, ont également été réalisées afin d'identifier ces nouvelles molécules. La structure de ces molécules fortement impliquées dans le système hémostatique a été caractérisée par spectrométrie de masse MALDI et SDS-PAGE.. L'analyse par LC/MS et LCMS/MS de fragments tryptiques des trois molécules purifiées a permis de montrer une homologie de séquence avec d'autres protéines déjà purifiées à partir d'autres venins de serpents. Les résultats obtenus révèlent que la CC2-PLA₂ présente 51% d'homologie de séquence avec la phosphatidylcholine acylhydrolase 2 précédemment purifiée à partir du venin même de la vipère Algérienne *Cerastes cerastes* (gi |129506|), soit 61/120 résidus d'acides aminés sont communs entre les PLA₂. Cette nouvelle phospholipase est également douée d'une activité antiagrégante des plaquettes humaines en plus de son activité hémolytique.

La CCSV-MPase est une Zn²⁺-métalloprotéinase ayant une activité fibrinogénolytique mais non-hémorragique. Cette métalloprotéinase hydrolyse la chaîne Bβ du fibrinogène humain *in vitro*, ce qui résulte la libération du fibrinopeptide B seulement et réduit de manière significative le taux du fibrinogène plasmatique lorsqu'elle est administrée à des animaux.

Par ailleurs, la CC3-SPase de type sérine protéinase et douée d'activité coagulante et hydrolyse le fibrinogène en agissant de la même manière que la thrombine comme une α β fibrinogénase, avec une forte activité agrégeante des plaquettes humaines. En plus, l'activité coagulante de la CC3SPase testée sur des plasmas humains déficients en facteurs facteurs II, VII et VIII montre une activité similaire à celle du facteur II a. Ce résultat suggère que la CC3-SPase pourrait se substituer à un facteur déficient (FII a).

CC3-SPase et CC2-PLA₂ sont impliquées dans l'induction d'une réponse inflammatoire caractérisée par une hyperleucocytose dans le sang périphérique accompagnée d'une libération de médiateurs inflammatoires (IL-6, l'EPO et le système du complément).

Mots clés : Venin; *Cerastes cerastes*; Sérine protéines; Métalloprotéinases; Phospholipases A₂; Protéomique; Hémostase ; Inflammation.

ملخص

تعتبر سموم الأفاعي واحدة من أكبر مصادر الجزيئات الحيوية النشطة التي معظمها لها فائدة كعلاج حيوي أو كمستحضرات صيدلانية بيولوجية لعلاج الحالات الطبية و يمكن أن تستخدم كأدوات تشخيص.

في هذه الدراسة تم عزل ثلاثة جزيئات حيوية من سم الأفعى *Cerastes cerastes* تساهم في نظام تخثر الدم وقد تم دراسة بنيتها و تكوينها من الأحماض الأمينية بفضل مطياف الكتلة من نوع MALDI. وأجري أيضا تحليل البروتين باستخدام NCBIInr كقاعدة بيانات لتحديد هذه الجزيئات الجديدة. أظهر تحليل الجزيئات الثلاثة المعزولة بواسطة LC/MS و MS/MS تسلسل تناظري مع بروتينات أخرى كانت قد عزلت في وقت سابق من سموم ثعبانين أخرى. وقد كشفت النتائج أن CC2-PLA₂ تشترك في 51 % من سلسلة الأحماض الأمينية ل PLA₂ (gi |129506|) المعزولة سابقا من نفس سم الأفعى الجزائرية أي ما يعادل 120/61 من الأحماض الأمينية مشتركة بين الجزيئين على حد سواء. أثبتت هذه الدراسة أيضا أن CC2-PLA₂ لها نشاط مضاد لتكدس الصفائح الدموية مما يؤدي إلى تثبيط تخثر الدم. CCSV-MPase هي بروتيناز جديدة غير نزيقية ذات Zn²⁺ كعامل مساعد لنشاطها قد تم عزلها و دراستها. عند حقنها في فئران المخبر لمدة 24 ساعة لوحظ نقص معتبر في تركيز الفيبرينوجين البلازمي -CCSV-MPase تذيب سلسلة Bβ الفيبرينوجين مما يؤدي إلى التحرير عن بيبتيد B فقط. في هذه الدراسة أيضا، جزيء حيوي ثالث من نوع سيرين بروتيناز CC3-SPase تم عزله من سم الأفعى *Cerastes cerastes*. هذا الجزيء يذيب الفيبرينوجين بنفس طريقة الثرومبين

و لذلك هو α β فيبرينوجيناز و مكندس فعال للصفائح الدموية. بالإضافة إلى ذلك، تم تقييم نشاط تخثر الدم بواسطة CC3SPase باستعمال بلازما ناقصة بعض عوامل التخثر (عوامل الثاني والسابع والثامن). وأظهرت النتائج أن وقت تخثر الدم المحصل عليه باستخدام البلازما ناقصة بعض العوامل (13،82 ثانية) مماثل لذلك التي سجل مع البلازما العادي (13،62 ثانية) ولكن مع جلطة أكثر قابلية للذوبان. هذه النتيجة تثبت أن CC3-SPase لا تقوم تنشيط العامل البلازمي الثالث عشر. إن الأنزيم البروتيني -CC3-SPase يمكن استعماله كعلاج بيولوجي لبعض أمراض اضطرابات الدم و بالأخص استبداله بعض العوامل البلازما الناقصة. ومع ذلك ، فإن الجزيئات المعزولة لها استجابة التهابية التي تتميز بزيادة عدد الكريات البيضاء في الدم المحيطي مع وجود خلايا neutrophiles و كذا تحرير بعض عوامل و وسطاء الالتهاب (IL-6, EPO, complement system).

الكلمات المفاتيح: سم الأفعى, *Cerastes cerastes*, الجزيئات الحيوية, تخثر الدم, بروتيناز, البروتيوميات

ABSTRACT

In this study, three biomolecules (CC2-PLA₂, CCSV-MPase and CC3-SPase) involved in the haemostatic system have been isolated from *Cerastes cerastes* venom. They were structurally characterized by MALDI mass spectrometry and SDS-PAGE. The proteomic analysis using the NCBIInr as a database was also conducted to identify these new molecules. Analysis by LC/MS and MS/MS of tryptic fragments of the three isolated molecules showed sequence homology with other proteins previously purified from other snake venoms. The results revealed that CC2-PLA₂ presents 51% sequence homology with the previously purified PLA₂ (gi |129506|) from the venom of the same Algerian viper *Cerastes cerastes* or 61/120 residues amino acids are common between the both PLA₂. CC2-PLA₂ exhibits an anti-platelet activity leading to a coagulation blockade. CCSV-MPase is a non-haemorrhagic Zn²⁺-metalloproteinase newly purified and characterized. This metalloproteinase reduces significantly the plasmatic fibrinogen level when administered to rats for 24 h. *In vitro*, CCSV-MPase dissolves Bβ chain of human fibrinogen leading to the release of only fibrinopeptide B. Moreover, a third coagulant serine proteinase called CC3-SPase was also isolated from the same venom. This biomolecule acts on fibrinogen in the same manner as thrombin, it would be an α β fibrinogenase and highly triggers human platelet aggregation. In addition, the clotting activity of CC3-SPase was assessed on human deficient plasmas in clotting factors (factors II, VII and VIII). The results showed that the clotting time obtained using a deficient plasma in FII (13.82 sec) is comparable to that obtained with normal plasma (13.62 seconds) but with a more soluble clot which suggested that CC3-SPase does not activate the factor XIII. These results predict also that this proteinase could repair haemostasis abnormalities and may replace some deficient plasma factors. However, the isolated molecules (CC3-SPase and CC2-PLA₂) induce an inflammatory response characterized by leukocytosis in peripheral blood mainly the presence of neutrophil cells accompanied by a release of inflammatory mediators (IL-6, EPO and the complement system).

Keywords: Venom, *Cerastes cerastes*, Serine proteases, Metalloproteinases, Phospholipases A₂ Proteomics, Haemostasis.